

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2015

THESES 2015 TOU3 2044

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue
par

ZENTKOWSKI David

**Prise en charge thérapeutique des
Gliomes : importance de la radiothérapie
et étude de ses effets phénotypiques *in
vitro***

Date de soutenance : **16 juin 2015**

Directeur de thèse : **Dr LEMARIE Anthony**

JURY

Président : **Pr COUDERC Bettina**
1er assesseur : **Dr LAJOIE-MAZENC Isabelle**
2ème assesseur : **Mr LANUSSE Gilbert**
3ème assesseur : **Dr LEMARIE Anthony**

**PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} octobre 2014**

Professeurs Émérites

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ I	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CHATELUT E	Pharmacologie	Mme BARRE A	Biologie
M. FAVRE G	Biochimie	Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
M. HOUIN G	Pharmacologie	Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. PARINI A	Physiologie	M. BENOIST H	Immunologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie	Mme BERNARDES-GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie	Mme COUDERC B	Biochimie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie	M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique	Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. SIÉ P	Hématologie	M. FABRE N	Pharmacognosie
M. VALENTIN A	Parasitologie	M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
		Mme MULLER-STAUMONT C	Toxicologie - Sémiologie
		Mme NEPVEU F	Chimie analytique
		M. SALLES B	Toxicologie
		Mme SAUTEREAU A-M	Pharmacie galénique
		M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
		M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
		Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
		M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P	Pharmacie Clinique	Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Pharmacologie	Mme AUTHIER H	Parasitologie
Mme JUILLARD-CONDAT B	Droit Pharmaceutique	M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F	Pharmacie Clinique	Mme BON C	Biophysique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	Biochimie	M. BOUJILA J (*)	Chimie analytique
Mme THOMAS F	Pharmacologie	Mme BOUTET E	Toxicologie - Sémiologie
		M. BROUILLET F	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C	Physiologie
		Mme CAZALBOU S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S	Bactériologie - Virologie
		Mme COSTE A (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N	Biochimie
		Mme DERA EVE C	Chimie Thérapeutique
		Mme ÉCHINARD-DOUIN V	Physiologie
		Mme EL GARAH F	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F	Toxicologie
		Mme GIROD-FULLANA S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme HALOVA-LAJOIE B	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I	Biochimie
		Mme LEFEVRE L	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A	Biochimie
		M. MARTI G	Pharmacognosie
		Mme MIREY G (*)	Toxicologie
		Mme MONTFERRAN S	Biochimie
		M. OLICHON A	Biochimie
		M. PERE D	Pharmacognosie
		Mme PHILIBERT C	Toxicologie
		Mme PORTHE G	Immunologie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)	Chimie Analytique
		M. SAINTE-MARIE Y	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D	Hématologie
		Mme TOURRETTE A	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M	Mathématiques

(*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires		Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche	
Mme COOL C (**)	Physiologie	Mme PALOQUE L	Parasitologie
Mme FONTAN C	Biophysique	Mme GIRARDI C	Pharmacognosie
Mme KELLER L	Biochimie	M IBRAHIM H	Chimie anal. - galénique
M. PÉRES M. (**)	Immunologie		
Mme ROUCH L	Pharmacie Clinique		
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique		

(**) Nomination au 1^{er} novembre 2014

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Anthony Lemarié qui a su me faire découvrir le monde de la recherche ainsi que la thématique des gliomes. Ce fut une belle rencontre pendant mes études de pharmacie lors de mon stage de M1 où j'ai découvert le fonctionnement de la culture cellulaire. Je te remercie également pour ton aide sans laquelle ce travail n'aurait pas vu le jour. Il permet de faire connaître un peu plus cette maladie au grand public afin de mieux appréhender ce type de cancer cérébral et de mieux la combattre.

Je remercie Madame la Professeur Bettina Couderc d'avoir accepté d'être la présidente de mon jury de Thèse.

Je tiens à vous remercier pour tous les enseignements que vous nous avez transmis à la faculté et qui à travers mes années d'étude de pharmacie m'ont donné envie de réaliser votre M1. Il m'a permis de réaliser mon stage de recherche à l'Institut Claudius Regaud et de découvrir les gliomes afin de réaliser le travail que je vous présente aujourd'hui. Je vous remercie pour tout cela.

Un grand merci à Mme Isabelle Lajoie-Mazenc pour avoir accepté mon invitation en tant que membre du jury. Je connais son attachement pour ces thématiques de résistance tumorale après avoir travaillé avec elle à Claudius Regaud.

Je remercie Monsieur Gilbert Lanusse pour avoir accepté mon invitation en tant que membre du jury. Je vous remercie de m'avoir reçu dans votre officine afin de réaliser mon stage de sixième année. Durant ces six mois j'ai beaucoup appris sur l'officine et je garde encore en mémoire vos conseils qui me serviront encore longtemps. J'ai passé un très bon moment dans votre officine avec un petit regret au moment de partir.

Un grand merci également à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer et qui m'ont accueilli dans leurs différents laboratoires à l'Institut Claudius Regaud. Merci au Pr Elizabeth Cohen-Jonathan Moyal et au Dr Christine Toulas, pour m'avoir permis de réaliser mon stage de M1 au sein de leur équipe de recherche. Merci à Rémi, Emilie, Audrey, Aurélie, Nicolas, Adrien pour leur gentillesse et leur disponibilité et pour les soirées mémorables.

Merci également à Madame Nicole Demouix. Je vous remercie de m'avoir permis de progresser professionnellement au sein de votre officine. Cela m'a permis durant ces dernières années d'acquérir plus de savoir et de compétence en milieu officinal.

Je dédie cette thèse à mes amis

Merci à tous mes amis de pharmacie avec qui j'ai passé des super moments de rigolade, des super vacances en Espagne, au cap d'Agde, à la montagne....

Merci à Aissa, Pierre louis, Simon, Dorothée, Sarah, Jean, Magalie, Yvan, Oliver, Pauline, Jean-Baptiste, Fabien, Karine, Hélène, Anna, Solène. Merci pour votre soutien, votre amitié qui m'est si chère. Bref, merci d'être toujours là !

Je dédie cette thèse aux personnes qui me sont chères

Merci aux personnes qui me sont très chères et qui ont toujours été là avant, pendant et après mes études, ainsi que durant la rédaction de ma thèse.

Merci à Mirela Adela, Manou, Anne, Sébastien, Marie Sandrine, Stéphane, Sylvie, Shaira et à toi Julien. Merci pour votre amour.

Enfin, je dédie cette thèse à ma famille

A mes parents : Merci pour votre amour, votre soutien inconditionnel, votre aide sur tous les plans durant toutes ces années,... bref, pour tout ce que vous avez toujours fait et continuez encore à faire. Merci maman, merci papa, vous êtes des parents extraordinaires.

A Marie-Paule : Merci pour ton amour, tu as su me soutenir pendant toutes ces années, et tu continues à le faire. Merci aussi à tes enfants Boban et Alexandre que je considère comme mes petits frères.

A ma sœur chérie, mon beau frère Patrick et mes neveux Emma et Julien, merci pour votre amour, Carole merci de m'avoir fait découvrir la pharmacie lors de mes années de lycée et même de collègue, ceci a du orienter mon choix.

Enfin, je tiens à remercier mes grands parents, qui ne sont plus de ce monde mais qui ont su me guider de là-haut durant toutes ces années, et je pense qu'ils auraient été très fiers de ma reconversion et de mon parcours.

Jamais je n'aurais pu réaliser ce travail sans vous, je vous en remercie et je vous aime.

Sommaire

Sommaire.....	1
Liste des Abréviations.....	5
Liste des Figures.....	6
Liste des Tableaux.....	8
INTRODUCTION.....	9
I. Les tumeurs cérébrales: cas des gliomes.....	11
1) Les gliomes.....	11
a) Les astrocytomes.....	11
b) Les oligodendrogliomes.....	12
c) Les oligoastrocytomes.....	12
d) Les épendymomes.....	12
e) Epidémiologie.....	13
2) Classification des gliomes.....	14
a) Classification de l'OMS.....	15
b) Classification de Sainte-Anne.....	19
3) Altérations moléculaires et cellulaires retrouvées dans les gliomes.....	20
a) Altérations génétiques et moléculaires.....	20
b) Cellules d'origine des gliomes.....	23
4) Signes cliniques des tumeurs cérébrales.....	25
a) Syndromes d'hypertension intracrânienne.....	25

I.	La céphalée.....	25
II.	Les vomissements.....	26
III.	Les troubles de la vigilance.....	26
IV.	Les troubles visuelles.....	26
b)	Comitialité.....	26
c)	Signes déficitaires.....	26
I.	Les tumeurs frontales.....	28
II.	Les tumeurs temporales.....	28
III.	Les tumeurs pariétales.....	28
IV.	Les tumeurs occipitales.....	28
V.	Les tumeurs hémisphériques profondes.....	29
VI.	Les tumeurs des commissures.....	29
VII.	Les tumeurs de la région sellaire.....	29
5)	Diagnostic.....	30
a)	IRM.....	30
b)	Scanner.....	31
c)	Pet-Scan.....	33
d)	Biopsie.....	34

II. Prise en charge thérapeutique des patients atteints de gliomes....35

1)	Chirurgie.....	36
a)	Sélection des patients.....	36
I.	Critères cliniques.....	36
II.	Critères radiologiques.....	37
b)	Déroulement de l'exérèse.....	38
c)	Réalisation de la cartographie.....	39
d)	Complication per-opératoire.....	40
e)	Nouvelle approche dans la chirurgie des gliomes.....	40

2) Radiothérapie.....	41
a) Volume de radiothérapie.....	41
b) Protocole de radiothérapie.....	42
3) Chimiothérapie.....	44
a) Les anticancéreux.....	45
I. Les agents alkylants.....	45
I.1 Les nitroso-urées.....	45
I.2 Le Témzolomide.....	46
II. Protocole polychimiothérapie.....	48
b) Nouvelle approche thérapeutique.....	48
I. Introduction.....	48
II. Le Bevacizumab ou Avastin™.....	50
III. Le Vandétanib ou Capresla™.....	51
IV. Le Vatalanib.....	52
V. Le Sorafenib.....	52
VI. Le Cilengitide.....	53
VII. Les inhibiteurs de l'EGFR.....	54
VII.1 L'Erlotinib.....	55
VII.2 Le Gefitinib.....	56
VIII. Les inhibiteurs de la mTOR.....	57
VIII.1 Le Temsirolimus.....	58
VIII.2 L'Évérolimus.....	59
VIII.3 Conclusion.....	59
IX. Conclusion.....	60

III. Place de la radiothérapie dans le traitement des GBM et ses effets vis-à-vis des mécanismes de résistance cellulaire.....61

1) Place de la radiothérapie dans le traitement des gliomes.....	61
2) Etude des effets de la radiothérapie sur les cellules de GBM vis-à-vis de leur état de différenciation.....	62

a) Introduction.....	62
b) Matériels et méthodes.....	63
I. Culture cellulaire sous PSM II.....	63
I.1 Culture des cellules souches de glioblastome.....	63
I.2 Culture des cellules différenciées de GBM.....	64
I.3 Procédé de rétro-différenciation « aidée ».....	64
I.4 Passage des cellules.....	64
II. Irradiation.....	65
III. Cytométrie en flux.....	65
III.1 principe de la cytométrie de flux.....	65
III.2 analyse de la morphologie de la population de GSC par cytométrie.....	67
III.3 analyse de la mort cellulaire par cytométrie.....	68
IV. Extraction des ARN messagers.....	68
V. RT-PCR.....	69
VI. PCR quantitative.....	69
c) Résultats.....	70
I. Protocoles de traitement des cellules souches de GBM.....	70
II. Caractérisation cellules de neurosphères et des cellules différenciés de GBM.....	72
III. Effet des rayonnements ionisants sur l'état de différenciation des cellules différenciées de GBM.....	74
IV. Effet des rayonnements ionisants sur le processus de rétro-différenciation « aidée » des cellules de GBM différenciées.....	76
d) Discussion.....	80
3) Article publié dans <i>Cell Death & Disease</i> (nov. 2014).....	82
BIBLIOGRAPHIE.....	85
Titre et résumé en anglais.....	95

Liste des abréviations :

BDAE : Boston Diagnostic Aphasia Examination

BHE : Barrière Hémato Encéphalique

CSC : Cellules Souches Cancéreuses

DO80 : Dénomination orale des Objets

GBM : Glioblastomes Multiformes

GSC : Cellules Souche de Glioblastome (*Glioblastoma Stem Cell*)

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

IRMf : Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle

IPP : Inhibiteur de la Pompe à Proton

LCR : Liquide Céphalo-rachidien

MMR : Réparation des Mésappariements

NS : Neurosphères

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

RI : Rayonnements Ionisants

RT : Radiothérapie

SCM : Milieu pour Cellules Souches (*Stem Cell Medium*)

SNC : Système Nerveux Central

SVF : Sérum de Veau Fœtal (milieu de différenciation)

TMZ : Témazolomide

Liste des Figures

Figure 1: Représentation du taux d'incidence en France des gliomes en fonction de l'âge (Belot *et al.*, 2008).

Figure 2 : Coupe de glioblastome après coloration éosine-hématoxyline. (Carrondo Cottin, 2008).

Figure 3: Evaluation du grade des tumeurs du système nerveux central.

Figure 4 : Altérations génétiques dans les gliomes.

Figure 5 : Représentation du champ visuel avec perte des hémichamps coté gauche lors des tumeurs occipitales touchant le nerf optique coté droit.

Figure 6 : Répartition des différents lobes du cerveau humain.

Figure 7 : Répartition des différentes structures de l'encéphale.

Figure 8 : IRM de glioblastome coté droit, situé dans le lobe pariétal.

Figure 9 : Principe du scanner (Furois, 2005).

Figure 10 : Scanner cérébral montrant un gliome de grade II situé dans le lobe pariétal gauche.

Figure 11 : Réaction d'annihilation de l'atome de Fluor 18 avec émission de photons (Heron, 2011).

Figure 12: Principe des biopsies stéréotaxiques.

Figure 13 : Cartographie fonctionnelle per-opératoire.

Figure 14 : Volumes définis pour l'irradiation de la tumeur.

Figure 15 : Schéma thérapeutique utilisé dans le protocole rapporté par Stupp *et al.*

Figure 16 : Courbe ratio montrant l'augmentation de la médiane de survie chez les patients traités par radiothérapie seule (rouge) et radiothérapie plus TMZ (bleu).

Figure 17 : Mécanisme d'action du Témazolomide (Benouaich-Amiel *et al.*, 2005).

Figure 18 : Protocole de polychimiothérapie PCV.

Figure 19 : Représentation des différentes molécules et voies utilisées dans les nouvelles approches thérapeutiques des traitements du GBM (Scaringi *et al.*, 2013).

Figure 20 : Protocole de traitement associant le Bevacizumab au protocole Stupp dans le cadre de l'étude de phase II par (Lai *et al.*, 2011).

Figure 21 : Voies de signalisation de mTOR avec phosphorylation de S6K et 4E-BP.

Figure 22 : Principe de la cytométrie de flux

Figure 23 : Caractérisation en cytométrie des populations FL1 (souches) et FL0 (différenciées) dans les neurosphères dissociées, selon (Clement *et al.*, 2010).

Figure 24 : Protocoles A, B et C utilisés dans le traitement des cellules de GBM.

Figure 25 : Caractérisation des cellules de neurosphères et des cellules différenciées de GBM.

Figure 26 : Effet des rayonnements ionisants sur l'état de différenciation des cellules différenciées de GBM.

Figure 27 : Effet des rayonnements ionisants sur le processus de rétro-différenciation « aidé » des cellules de GBM différenciées.

Liste des Tableaux

Tableau I : Critères de diagnostic de la classification de l'OMS 2005 (A : Astrocytome, GBM : Glioblastome, O : Oligodendrogliome, OA : Oligoastrocytome) (Figarella-Branger and Bouvier, 2005).

Tableau II : Classification de l'OMS selon le grade des gliomes (A : Astrocytome, O : Oligodendrogliome, OA : Oligoastrocytome)

Tableau III : Séquences des amorces de PCR

Introduction:

Les gliomes sont les tumeurs du système nerveux central les plus fréquentes, Elles sont constituées de cellules se rapprochant phénotypiquement des cellules gliales c'est à dire des astrocytes et des oligodendrocytes. En terme d'épidémiologie, les gliomes représentent 1,3% des cancers et se situent au 15ème rang des cancers de l'homme et de la femme (Dutertre *et al.*, 2010). Leur développement peut apparaître vers tous les âges, mais on retrouve un pic chez l'homme et chez la femme vers l'âge de 70 ans. En ce qui concerne le nombre de décès, il est estimé en France pour 2005 à 3019 et représente la 14ème cause de décès (Dutertre *et al.*, 2010). La classification des gliomes actuelle repose sur le degré (ou grade) croissant de malignité qui est défini par des critères histologiques et de localisation. La classification reconnue au niveau mondial est la classification de l'OMS qui permet de définir quatre grades de malignité (Kleihues and Sobin, 2000). Cette classification nous permet d'appréhender la médiane de survie des patients allant de dix ans dans le cas d'un gliome de grade I et environ un an dans le cas d'un gliome de grade IV. Ainsi, suivant la connaissance du grade de malignité et des différents critères qui suivent c'est à dire le type de tumeur, sa taille, sa localisation, son évolution, son agressivité, l'âge du patient et son état physique, différents possibilités de traitement pourront être alors proposées au patient. A l'heure actuelle le traitement des gliomes repose sur l'association de une, deux ou des trois modalités suivantes: la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Cependant, malgré un traitement bien conduit, les gliomes et particulièrement les gliomes de grade IV (ou GBM) restent des tumeurs très radio et chimiorésistants. En effet les GBM récidivent de manière quasi systématique et pour 10% de ces tumeurs la récurrence se fait à distance du site initial. Depuis plusieurs années les équipes de recherche se penchent sur l'étude des cellules d'origine des gliomes. Cette origine demeure globalement **inconnue** et on ne sait pas non plus où ces tumeurs prennent naissance, que ce soit à partir de cellules gliales matures différenciées, de cellules souches neurales ou de progéniteurs gliaux ayant subis différentes mutations et altérations responsables du processus de cancérogenèse. Mais il a notamment été identifié une population de cellules dites souches cancéreuses (CSC), en premier lieu dans le cas des leucémies myéloïdes aiguës (Bonnet and Dick, 1997), puis dans des tumeurs solides comme le cancer du sein (Al-Hajj *et al.*, 2003), le

cancer du colon (Ricci-Vitiani *et al.*, 2007), du pancréas (Li *et al.*, 2007), de la prostate (Sadri-Ardekani *et al.*, 2009) et dans les glioblastomes (Singh *et al.*, 2003). Au sein des GBM, ces cellules souches (GCS) semblent avoir une forte part de responsabilité dans la récurrence et la résistance aux traitements actuels (Assanah *et al.*, 2006) (Cheng *et al.*, 2010). Afin de montrer le rôle des GCS dans le processus de radiorésistance et de la récurrence, ce mémoire de Thèse présentera également une étude préliminaire réalisée lors de mon stage de M1 avec l'équipe de recherche des Pr. Moyal et Dr. Toulas au sein du département « Signalisation, Oncogenèse et Innovation Thérapeutique » de l'INSERM U563 et qui a donné lieu au final à une publication scientifique, également jointe. La problématique soulevée par cette équipe de recherche était de montrer que la radiothérapie pouvait potentialiser la radiorésistance des GBM en induisant des altérations phénotypiques dans ces cellules conduisant à un retour vers un état plus indifférencié, voire souche.

I. Les tumeurs cérébrales : cas des gliomes

1) Les gliomes

Les gliomes sont des tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes, qui prennent naissance dans le SNC avec parfois, très minoritairement, des formes extracrânielles secondaires d'un gliome métastasé. Les gliomes sont constitués de cellules cancéreuses ayant un phénotype se rapprochant des cellules gliales. On distingue parmi ces gliomes :

- ✓ Les astrocytomes, dérivant des astrocytes, cellules impliquées dans la cicatrisation des lésions du système nerveux et dans le soutien et la protection des neurones. Ils jouent un rôle de transporteur de molécules et d'approvisionnement en lactate des neurones. Ils permettent aussi l'échange de neurotransmetteurs au niveau des synapses et participent de façon majeure à la barrière hémato-encéphalique.
- ✓ Les oligodendrogliomes, dérivant des oligodendrocytes, cellules ayant pour principale fonction la synthèse de myéline.
- ✓ Les oligoastrocytomes, gliomes mixtes issus de l'association de cellules dérivant d'astrocytes et d'oligodendrocytes.
- ✓ Les épendymomes, dérivant de cellules provenant du revêtement des ventricules cérébraux.

a) Les astrocytomes

Ces tumeurs de lignée astrocytaire représente 80-90% des gliomes. Ce sont des tumeurs qui se développent majoritairement au niveau de la substance blanche et parfois de cellules du cortex. Elles sont très malignes et très infiltrantes avec une importante vascularisation. Leur croissance est plus ou moins rapide suivant le grade de malignité (Stupp *et al.*, 2007). On retrouve parmi les astrocytomes tous les grades de malignité allant de l'astrocytome pilocytique (malignité la plus faible) au GBM multiforme (malignité la plus élevée).

Le développement de ces tumeurs peut survenir vers tous les âges, mais suivant le type de malignité on retrouve des pics de fréquence relativement spécifiques. Pour les astrocytomes de bas grade un pic est observé vers l'âge de 20 à 45 ans et de haut grade vers 40 à 50 ans.

b) Les oligodendrogliomes

Ce sont des tumeurs de lignée oligodendrocytaire qui représentent 5% des gliomes. Leur évolution est lente, avec une vascularisation peu développée (Philippon, 2004). Ce sont des tumeurs localisées essentiellement au niveau des hémisphères cérébraux, dans la substance blanche avec extension au cortex. On retrouve un pic de survenue vers l'âge de 40 ans avec une dominance masculine quelque soit le grade.

c) Les oligoastrocytomes

Les oligoastrocytomes sont des gliomes mixtes, qui touchent à la fois les astrocytes et les oligodendrocytes. Il existe deux types de gliomes mixtes : les oligoastrocytomes de bas grade (grade II) et les oligoastrocytomes anaplasiques (grade III). L'âge moyen des gliomes mixtes se situe vers 35-40 ans. Ces derniers représentent environ 5 % des gliomes.

d) Les épendymomes

Les épendymomes représentent 5% des gliomes, ils touchent la lignée cellulaire épendymaire localisée au niveau des cavités ventriculaires cérébrales. Ces tumeurs sont plus fréquentes chez les enfants et les jeunes adultes.

e) Epidémiologie

Les gliomes représentent 1.3 % des cancers et se situent au 15^{ème} rang des cancers chez l'homme et la femme (Dutertre *et al.*, 2010). Leurs taux d'incidence est de 5.7 chez l'homme et de 4.2 chez la femme. Les gliomes se situent au 14^{ème} rang des décès avec un nombre de décès estimés en France en 2005 à 3019 (Dutertre *et al.*, 2010). Les gliomes sont des tumeurs survenant à tout âge mais on retrouve un pic de 25/100000 chez l'homme et de 16/100000 chez la femme de 70 ans (**Figure 1**). Les gliomes de grade I ou astrocytome pilocytique sont des tumeurs rares, environ 10% des gliomes. Ils touchent principalement les enfants de moins de 20 ans (75%) ou les adultes jeunes entre 20 et 35 ans. Ce sont des tumeurs d'évolution lente avec un caractère bénin et curable par la chirurgie. Les gliomes de grade II représentent 20 % des gliomes et touchent une population jeune se situant entre 30 et 40 ans (Dutertre *et al.*, 2010). Les gliomes de grade III quand à eux représentent 20 % des tumeurs gliales et touchent une population plus âgés compris entre 40 et 50 ans (Dutertre *et al.*, 2010). Enfin on retrouve les gliomes de grade IV ou glioblastomes qui eux représentent 50 % des gliomes et sont les plus fréquents et les plus agressifs. La moyen d'âge des glioblastomes est comprise entre 50 et 70 ans (Dutertre *et al.*, 2010). Les différents grades des gliomes nous renseignent sur l'évolution de la tumeur. On distingue les tumeurs de bas grades avec une évolution lente (grade I et II) qui engendre une survie du patient plus longue et les tumeurs de haut grades avec une évolution rapide (grade III et VI) qui engendre une survie plus court.

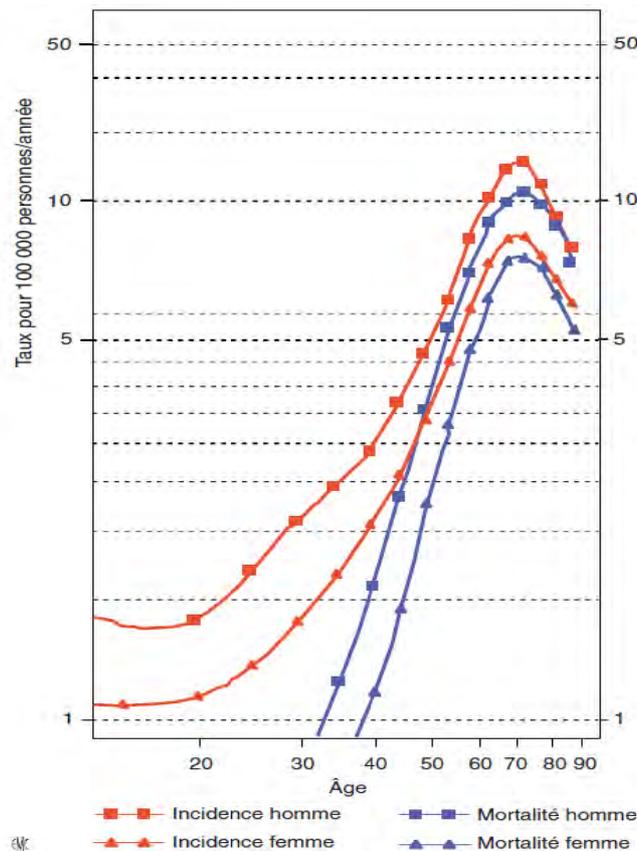


Figure 1: Représentation du taux d'incidence en France des gliomes en fonction de l'âge de 1980 à 2005 (Belot *et al.*, 2008).

2) Classification des gliomes

La classification des gliomes repose sur le degré (ou grade) de malignité de manière croissante. Pour définir ce degré de malignité les critères utilisés sont des critères histologiques et de localisation. Quelque soit la tumeur, elle possède ses particularités propres en terme d'histologie, de localisation et de pronostic. Ce qui suit montre que même si chaque critère a une signification propre, ils sont étroitement liés entre eux.

- ✓ L'histologie est associée à l'origine tissulaire de la tumeur et son degré de malignité.
- ✓ La topographie est associée à l'agressivité de la tumeur en terme de conséquences neurologiques et d'accessibilité au traitement chirurgical.
- ✓ Le pronostic est lié au degré d'extension de la tumeur au moment du diagnostic autant que son grade histologique.

Malgré les progrès réalisés en imagerie et en anatomopathologie, la classification des tumeurs du SNC reste difficile et est sujet à controverse.

a) Classification de l'OMS

La classification de l'OMS est une classification qui permet d'obtenir un modèle universel pour le classement des gliomes (Kleihues and Sobin, 2000). Cependant, cette classification souffre d'un défaut de reproductibilité (Mittler *et al.*, 1996) (Coons *et al.*, 1997), elle ne fait pas de distinction entre les cellules tumorales et celles du parenchyme résiduel infiltré, elle ne tient pas compte de l'hétérogénéité tumorale ni des données de la clinique et de l'imagerie. Révisée en 2007, elle se base sur deux critères essentiels.

- ✓ Le type cellulaire présumé, c'est-à-dire les similarités cytologiques entre cellules gliales matures « normales » et cellules tumorales.
- ✓ Le grade histopronostique ou degré de malignité. Quatre grades de malignité croissante sont individualisés. Ce grade est fonction de la présence ou non de critères de malignité tels que l'atypie cytonucléaire, les mitoses, la prolifération endothélio-capillaire et la nécrose (**Figure 2**).

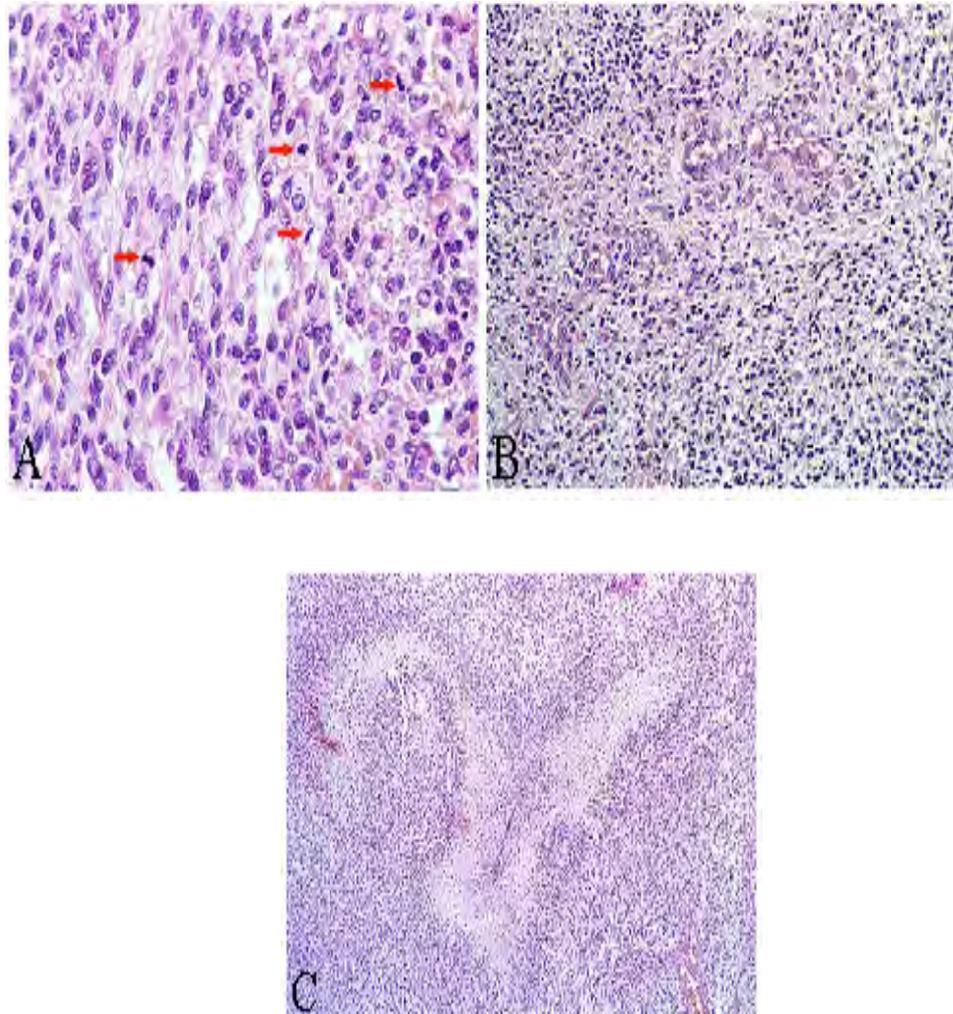


Figure 2 : Coupe de glioblastome coloration éosine-hématoxyline. (A) présence de mitoses (flèches rouge). (B) mise en évidence de la prolifération endothélio-capillaire (coloration rose). (C) présence de foyers nécrotiques entourés de cellules tumorales (Carrondo Cottin, 2008).

Le **tableau I** résume les différents critères cytologiques utilisés pour le diagnostic des gliomes selon la classification de l'OMS 2005

Grade	Différenciation	Densité cellulaire	Atypies cytonucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération
A II	Elevée	Modérée	occasionnelles	≤ 1	Absente	Absente
A III	Anaplasie focale ou dispersée	Augmentée diffusément ou focalement	Présentes	rare	Absente	Absente
GBM (A IV)	Faible	Elevée	Marquées	Marquée	Présente	Elevée
O II	Elevée	Modérée	Possibles	Occasionnelle	Absente	Absente
O III	Anaplasie focale ou dispersée	Augmentée	occasionnelles	Possiblement forte	Possible	Possible
OA II	Elevée	Faible ou modérée	occasionnelles	Absente ou faible	Absente	Absente
OA III	Elevée	Augmentée	présentes	Possiblement forte	Possible	Possible

Tableau I : critères diagnostiques de la classification de l'OMS 2005 (A : Astrocytome, GBM : Glioblastome, O : Oligodendrogliome, OA : Oligoastrocytome) (Figarella-Branger and Bouvier, 2005)

Le **tableau II** présente les quatre grades de malignité de la classification de l'OMS. Cette classification a essentiellement une signification pronostique et ne peut être considérée réellement comme des étapes de « malignisation ».

Grade du gliome	Astrocytome	Oligodendrogliome	Gliome mixte	Médiane de survie
I	A.pilocytique			10 ans
II	Astrocytome	Oligodendrogliome	Oligoastrocytome	6 à 8 ans
III	A.anaplasique	O.anaplasique	OA.anaplasique	1,5 à 2,5 ans
IV	Glioblastome			0,5 à 1 an

Tableau II : Classification de l'OMS selon le grade des gliomes (A : Astrocytome, O : Oligodendrogliome, OA : Oligoastrocytome)

Suivant le grade des tumeurs, on distingue des tumeurs d'évolution lente dites **de bas grade**. Dans ces tumeurs de bas grade, on retrouve les gliomes de grade I et de grade II qui, suivant l'extension de la tumeur, sont de meilleur pronostic. En effet pour le grade I les tumeurs sont circonscrites et donc de meilleur pronostic. Pour des tumeurs de grade II leur délimitation est imprécise et l'extension est diffuse (appelée très infiltrante). Ces tumeurs seront de moins bon pronostic car l'exérèse chirurgicale ne pourra être complète.

Les tumeurs d'évolution rapide sont dites **de haut grade**. En effet l'apparition de foyers anaplasiques dans une tumeur de bas grade lui confère un grade III. Si ces foyers anaplasiques sont présents dans une grande partie ou dans l'ensemble de la tumeur, on parle alors de grade IV. La **figure 3** résume les critères permettant de classer les tumeurs selon leur grade.

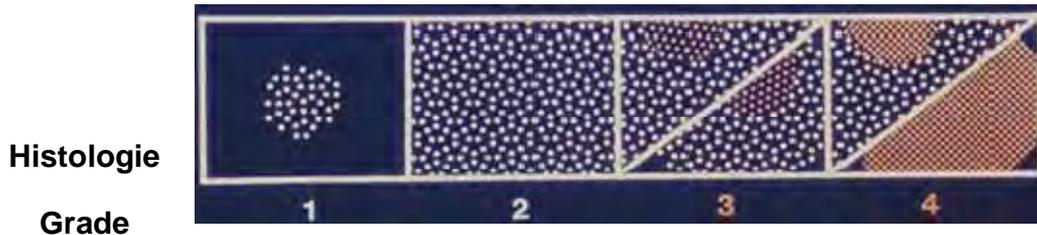


Figure 3 : Evaluation du grade des tumeurs du système nerveux central. La représentation histologique des tumeurs ci-dessus montre la différence entre les foyers tumoraux suivant le grade (cellules tumorales représentées par des points) et la présence ou non de foyer anaplasiques (coloration rosée)

b) Classification Sainte-Anne

Il existe une autre classification non reconnue par la communauté scientifique, la classification Sainte-Anne, mise en place par le Pr. Daumas-Duport à l'hôpital Sainte-Anne (Daumas-Duport *et al.*, 1997). Cette classification repose sur deux critères : l'hyperplasie des cellules endothéliales et la prise de contraste en imagerie. Un tissu tumoral solide n'est formé que des cellules tumorales qui s'accompagnent d'une microangiogenèse, se traduisant par une prise de contraste à l'imagerie. Par contre pour des cellules tumorales isolées, le parenchyme est morphologiquement et fonctionnellement intact, il n'existe pas de vaisseaux néoformés. Il n'y a donc pas de prise de contraste à l'imagerie.

On retrouve parmi les gliomes infiltrants trois catégories, les oligodendrogliomes (ou oligoastrocytomes) de grade A ou B et le glioblastome. Le système d'évaluation du grade est mixte, il se base sur l'histologie et la neuroradiologie (Daumas-Duport *et al.*, 1997).

- ✓ **Le grade A**, caractérisé par l'absence d'hyperplasie endothéliale et la prise de contraste (survie médiane de 11 ans).
- ✓ **Le grade B**, comporte soit une hyperplasie endothéliale et/ou une prise de contraste (survie médiane de 3,5 ans).

L'hyperplasie endothéliale est définie par au moins la présence dans un champ du microscope (objectif x10) de vaisseaux dont les cellules endothéliales possèdent des

noyaux qui se touchent : elle caractérise la micro-angiogenèse. De façon schématique, les oligodendrogliomes purement infiltrants sont toujours de grade A, les oligodendrogliomes de structure mixte, solide et infiltrante peuvent être de grade A ou B, le grade B étant plus fréquent. Un système de graduation mixte, histologique et neuroradiologique permet de pallier la représentativité des prélèvements. Les oligoastrocytomes possèdent les mêmes caractéristiques à l'imagerie que les oligodendrogliomes et ne sont donc pas discriminés dans cette classification.

3) Altérations moléculaires et cellulaires retrouvées dans les gliomes

a) Altérations génétiques et moléculaires

En ce qui concerne les altérations moléculaires des gliomes de grade II et III, ces altérations varient suivant le type de gliomes mais on retrouve ces altérations de manière similaire dans des proportions différentes. Les mutations des gènes les plus connues de ces gliomes sont: IDH1-R132H codant une enzyme l'isocitrate déshydrogénase de type 1, p53 facteur de transcription régulant la mitose et la mort cellulaire et une co-délétion 1p19q qui se résume par la perte de deux allèles sur le bras court du chromosome 1 et long du chromosome 19. La perte de ces allèles aurait pour conséquence l'inactivation de différents gènes suppresseurs de tumeur. Une des premières mutation retrouvée est la mutation d' IDH1-R132H de manière très fréquente dans environ 75 % des cas d'astrocytomes de grade II (Capper *et al.*, 2009). Cette mutation se retrouve aussi dans 80 % des cas pour les astrocytomes de grade III, les oligoastrocytomes et oligodendrogliomes de grade II et III (Capper *et al.*, 2010). La deuxième mutation présente est celle du gène p53. Dans le cas des astrocytomes et oligoastrocytomes de grade II elle est fréquente : 53 % à 88 % pour les différents types d'astrocytomes et 44 % pour les oligoastrocytomes (Okamoto *et al.*, 2004). Cette mutation est présente dans des proportions de manière inversée dans le cas des oligodendrogliomes de grade II et

III où elle est très rare (moins de 5%) (Levy *et al.*, 2014). La troisième altération moléculaire retrouvée dans les gliomes de bas grade est la co-délétion 1p/19q. Dans le cas des astrocytomes de grade II cette mutation est rare de l'ordre de 7% (Okamoto *et al.*, 2004). Par contre pour les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade II, la mutation est présente à 63 % pour les oligodendrogliomes et 36 % pour les oligoastrocytomes (Okamoto *et al.*, 2004). En ce qui concerne les gliomes de grade III une co-délétion 1p/19q se retrouve dans 60 à 80 % des cas des oligodendrogliomes, 20 à 30 % des cas pour les oligoastrocytomes et moins de 5 % des cas des astrocytomes (Delattre *et al.*, 2012).

A la différence des gliomes de grade II et III, les gliomes de grade IV ou GBM comportent un plus grand nombre d'altérations génétiques. Parmi les GBM on distingue deux sous types principaux. Les **GBM primaires** (GBM I), qui se développent rapidement de novo, représentent 90% des cas et apparaissent chez le sujet âgé. Les **GBM secondaires** (GBM II) qui progressent à partir de lésions préexistantes (astrocytomes de grade II le plus souvent ou de grade III) et sont plus fréquents chez les patients jeunes. On retrouve par ordre de fréquence, la perte d'hétérozygotie sur le chromosome 10q qui se manifeste dans 70 et 63 % des glioblastomes primaires et secondaires respectivement (Rasheed *et al.*, 1995). De manière fréquente on retrouve d'autres altérations chromosomiques sur le chromosome 7, 9p et 19q. Après les altérations chromosomiques il existe d'autres altérations moléculaires qui touchent des récepteurs et facteurs de transcription. La surexpression du récepteur à l'**EGFR** (*Epidermal Growth Factor Receptor*) ainsi que la mutation du gène **PTEN** (*Phosphatase-TENSine homolog*) sont des mutations typiques des GBM primaires et se manifeste dans 30 à 50 % et 15 à 40 % respectivement. Alors qu'une mutation du gène p53 est plus spécifique des GBM secondaires (>65 %, contre 20 à 30 % des GBM primaires) (Tohma *et al.*, 1998) (Watanabe *et al.*, 1996).

Ensuite d'autres altérations génétiques sont présentes comme la perte de l'expression de p14^{ARF} (75 %), une amplification de CDK4/6 (*Cyclin dependant*

kinase 4/6) (18 %) ou une mutation de l'IDH1 (*Isocitrate déshydrogénase 1*) (Nakamura *et al.*, 2001) (Rasheed *et al.*, 1995).

Il a été montré que la modification de ces gènes entraîne des modifications des voies de signalisation cellulaires impliquées dans le développement des GBM. Ces voies de signalisation interviennent dans différents processus cellulaires comme la survie, la prolifération, la différenciation, le contrôle du cycle cellulaire ou encore l'apoptose. Parmi ces voies on retrouve la voie TP53/MDM2/p14^{ARF} qui est fortement impliquée dans l'évolution des GBM secondaires (Watanabe *et al.*, 1996). La voie p16^{INK4a}/CDK4/Rb1, quand elle a elle, intervient dans les GBM primaires et secondaires, avec dans 90 % des cas une anomalie d'au moins un des acteurs impliqués dans cette voie (Nakamura *et al.*, 2001).

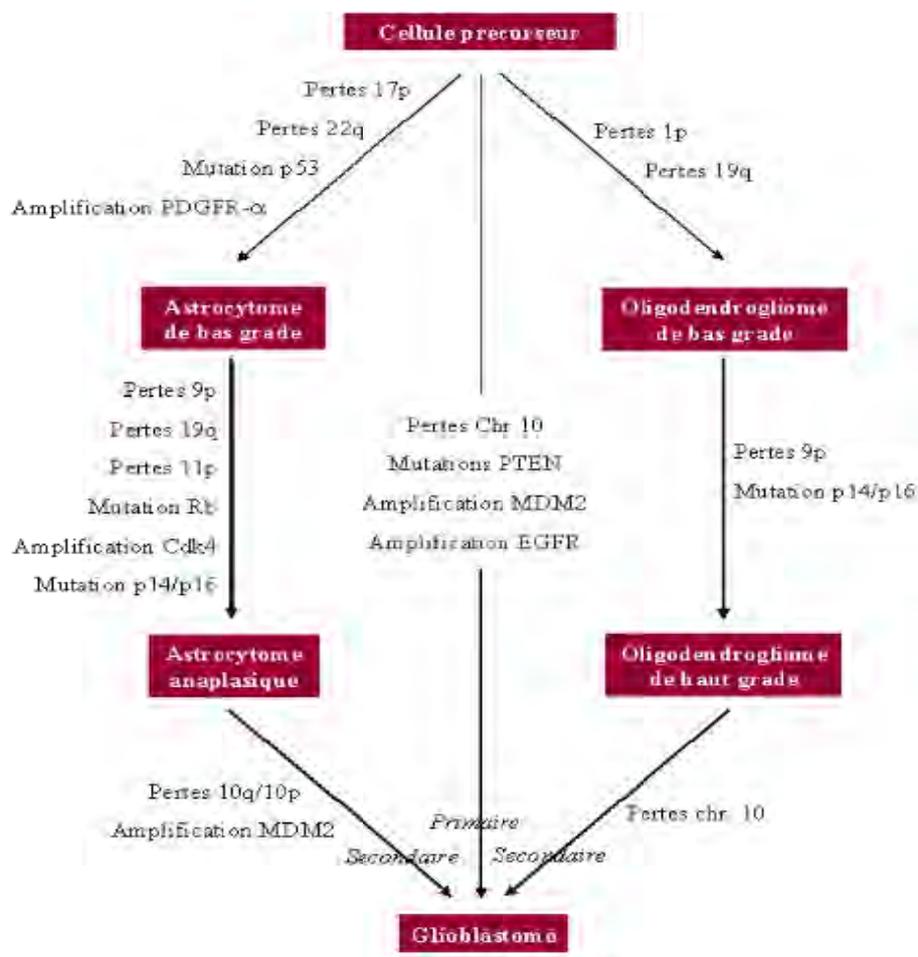


Figure 4 : Altérations génétiques impliquées dans les gliomes

b) Cellules d'origine des gliomes

En ce qui concerne les gliomes, les cellules qui en sont l'origine restent globalement **inconnues** et on ne connaît pas non plus où ces tumeurs prennent naissance, que ce soit à partir de cellules gliales matures dédifférenciées, de cellules souches neurales ou de progéniteurs gliaux. Des expériences sur des modèles murins ont été réalisées afin d'identifier le précurseur mais dans tous les cas les trois types cellulaires ont induit des gliomes (Sanson and Taillibert, 2004).

Depuis plusieurs années, il a été identifié une population de cellules dites cellules souches cancéreuses (CSC), en premier lieu dans le cas des leucémies myéloïdes aiguës (Bonnet and Dick, 1997), puis dans des tumeurs solides comme le cancer du sein (Al-Hajj *et al.*, 2003), le cancer du colon (Ricci-Vitiani *et al.*, 2007) du pancréas (Li *et al.*, 2007), de la prostate (Sadri-Ardekani *et al.*, 2009) et dans les gliomes au sein des glioblastomes (Singh *et al.*, 2003). Ces CSC seraient fortement responsables de la récurrence, de la résistance aux traitements et particulièrement impliquées dans la physiopathologie des glioblastomes (Assanah *et al.*, 2006) (Cheng *et al.*, 2010). La mise en évidence de ces CSC dans les glioblastomes est sujette à controverse, notamment quand à leur origine. Certains auteurs pensent qu'elles dérivent de cellules souches saines devenues cancéreuses. D'autres pensent qu'elles acquièrent un phénotype souche à partir de cellules plus différenciées déjà cancéreuses (Cheng *et al.*, 2010) (Jiang and Uhrbom, 2012). Les cellules souches de glioblastome (GSC) sont des cellules tumorales exprimant des marqueurs de cellules souches neurales normales et qui ont la capacité de pousser sous la forme de neurosphères, s'autorenouveler et se différencier en cellules tumorales exprimant des marqueurs de cellules astrocytaires, oligodendrogiales et neuronales (Singh *et al.*, 2004a). La particularité des GSC est la capacité d'induire une tumeur chez l'animal athymique par des expériences de xénogreffes (Singh *et al.*, 2004a). Le premier marqueur souche utilisé pour mettre en évidence les GSC était CD133 mais les GSC sont des cellules très hétérogènes qui ne peuvent être définies que par un seul marqueur (Clement *et al.*, 2009). De nouveaux marqueurs ont été utilisés pour

mieux caractériser les GSC. On retrouve des marqueurs membranaires comme A2B5, CD15 (*3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine*), CD44 (*lymphocyte homing receptor*), ITG α 6 (*intégrine α 6*) ou des marqueurs intracellulaires tels que Gli1 (*Glioblastoma family zinc finger 1*), Nestine, Nanog, Olig2 (*Oligodendrocyte lineage transcription factor 2*) ou encore Sox 2 (Cheng *et al.*, 2010). De plus les marqueurs intracellulaires Nanog, Olig2 et Sox2 sont des protéines du groupe des SCTF (Facteurs de Transcription des Cellules Souches), qui participent activement à l'établissement et au maintien du statut souche.

Dans les propriétés fonctionnelles des GSC on retrouve des propriétés migratoires et invasives associées à une surexpression importante de protéines pro-invasives (métalloprotéinases ou intégrines) (Ortensi *et al.*, 2013). On a observé une participation des GSC dans l'angiogenèse tumorale par la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (VEGF *vascular endothelial growth factor*, SDF1 *stromal cell-derived factor 1*) (Bao *et al.*, 2006b) (Wurth *et al.*, 2014), ainsi qu'un rôle dans l'immunosuppression par la sécrétion de cytokines immunosuppressives (Interleukines IL-4, IL-6 et IL-10) et l'activation de macrophages de type M2 pro-tumoraux (Albesiano *et al.*, 2010) (Wu *et al.*, 2010).

La survie et le maintien à l'état souche des GSC sont fortement liés à leur microenvironnement. Il est montré que leur localisation est bien spécifique au niveau des niches périvasculaires ou nécro-hypoxiques (Lathia *et al.*, 2011) Dans les niches périvasculaires les GSC interagissent avec les cellules endothéliales en sécrétant des facteurs de croissance endothéliaux (VEGF), permettant ainsi le bon développement des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Ce processus d'échange va permettre en retour aux cellules endothéliales d'interagir avec les GSC afin de favoriser leur maintien à l'état souche, notamment par l'interaction du ligand/récepteur Dll4 (*Delta like ligand 4*) / Notch (Calabrese *et al.*, 2007). Quand aux niches hypoxiques la présence de facteurs de transcription tel que les HIFs (*Hypoxia-inducible factors*) HIF1 α et HIF2 α permet le maintien des GSC à l'état souche (Li *et al.*, 2009). Les HIFs permettent de réguler l'expression de différents gènes cibles qui contrôlent l'expression des marqueurs souches, la prolifération,

l'autorenouveaulement et le métabolisme des GSC (Heddlestone *et al.*, 2009). On retrouve aussi une surexpression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 (Liu *et al.*, 2006) ou encore l'activation de systèmes de maintenance de l'état pluripotent comme Akt, Notch, Hedgehog ou STAT3 (Cheng *et al.*, 2010) ou encore l'activation de systèmes de réparation des dommages à l'ADN (Bao *et al.*, 2006a).

Par ces différentes propriétés, les GSC échappent aux mécanismes de contrôle de prolifération et de différenciation, ce qui permet le développement de tumeurs malignes, provoque une forte résistance aux thérapies utilisées à ce jour ainsi qu'une récurrence de la maladie. L'objectif aujourd'hui est d'étudier les différents mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans le maintien, l'expansion et la résistance aux thérapies des GSC, dans le but de pouvoir cibler par de nouvelles thérapies les cellules tumorales différenciées et souches

4) Signes cliniques des tumeurs cérébrales

a) Syndrome d'hypertension intracrânienne

Une hypertension intracrânienne survient lors de la croissance d'une tumeur cérébrale ou consécutivement à un blocage des voies d'écoulement du LCR responsable d'une hydrocéphalie. Elle se manifeste par différents signes cliniques comme des céphalées, des vomissements, des troubles de la vigilance et des troubles visuels.

i. La céphalée

Ce signe clinique important n'est pas toujours présent. En début de maladie elle est intermittente, survient le matin ou réveille le patient dans la nuit. Elle se localise le plus souvent du côté de la tumeur et est déclenchée par des mouvements de la tête, par l'effort, la toux, les changements de position et s'aggrave en position couchée. Avec l'évolution de la maladie la céphalée a tendance à devenir permanente (Geraud, 2008).

ii. Les vomissements

Ce sont des signes évocateurs d'une hypertension intracrânienne lorsqu'ils sont brutaux, en jets le matin au réveil et provoqués par des mouvements de la tête. Ces vomissements calment la céphalée mais ils peuvent être suivis par des nausées (Geraud, 2008).

iii. Les troubles de la vigilance

L'augmentation de l'hypertension intracrânienne entraîne des troubles de la vigilance et se traduit par une lenteur dans la formation et l'enchaînement des idées, une tendance à l'apathie et à la somnolence, une indifférence et troubles mnésiques, une confusion puis obnubilation et une torpeur progressive avec un risque de coma (Geraud, 2008).

iv. Les troubles visuels

Signe clinique inconstant, l'œdème papillaire est à rechercher par un fond d'œil. Il se manifeste dans les formes sévères par des troubles visuels: baisse de l'acuité visuelle, épisode d'éclipse visuelle, diplopie par atteinte du nerf *abducens*. En l'absence de prise en charge, les troubles peuvent évoluer vers une cécité irréversible par atrophie optique (Geraud, 2008).

b) Comitialité

Les crises d'épilepsies sont des signes cliniques fréquents dans les gliomes (Geraud, 2008). Elles sont partielles ou généralisées et révèlent 20 à 40 % des tumeurs cérébrales. Elles sont plus fréquentes pour les gliomes de bas grade. Elles sont évocatrices de tumeur lorsqu'on l'associe à un syndrome d'hypertension intracrânienne, si elles débutent à l'âge adulte. Ceci justifie la réalisation systématique d'un IRM cérébrale sans et avec injection de gadolinium (voir chapitre I.4.a.).

c) Les signes déficitaires

Signes de localisation tumorale, liés directement à la compression ou à l'infiltration du parenchyme cérébrale par la tumeur, ils peuvent être la première manifestation clinique

ou succéder à des phénomènes épileptiques. Leur apparition se fait de manière progressive et varie de quelques semaines à quelques mois avec une extension du déficit dit "en tache d'huile ". Le type de signe dépend de la localisation tumorale (Geraud, 2008).

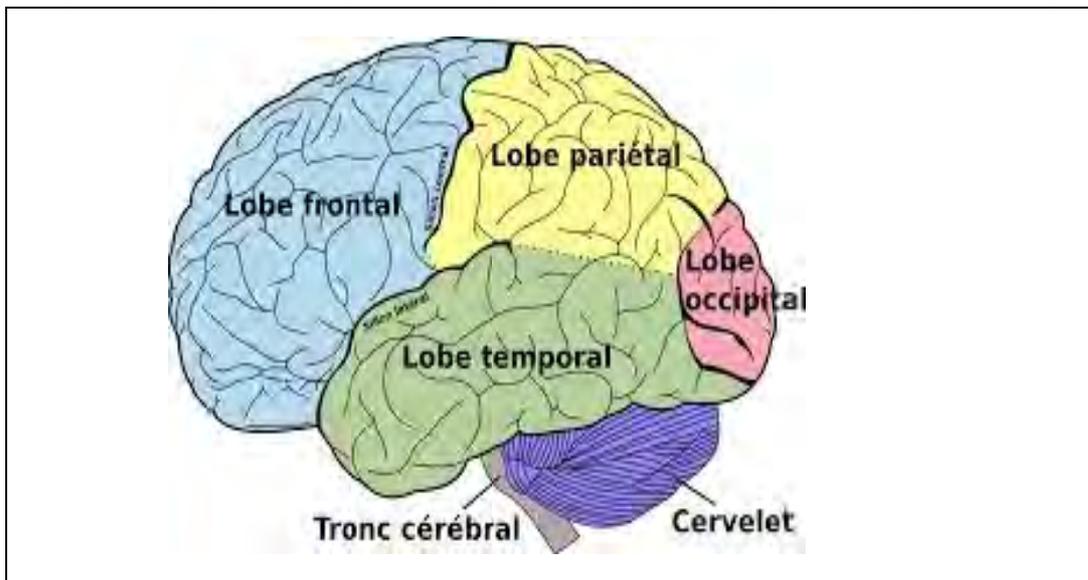


Figure 5 : Répartition des différents lobes du cerveau humain

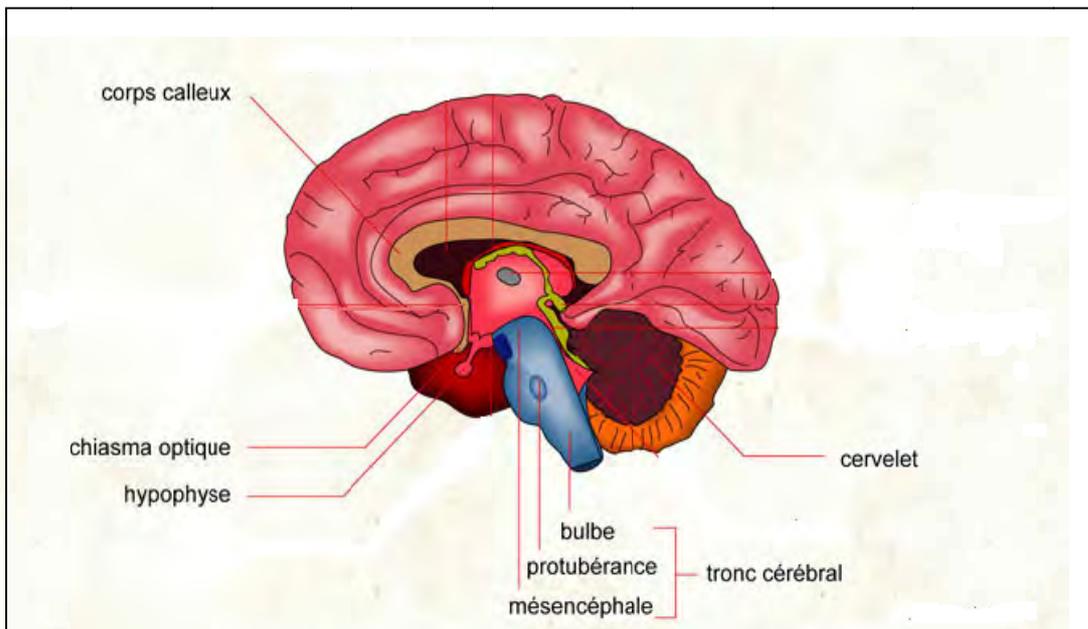


Figure 6 : Répartition des différentes structures de l'encéphale

I. Les tumeurs frontales

Les tumeurs frontales (**Figure 5**) se manifestent par des signes cliniques de type troubles psychiques : réduction progressive de l'activité, troubles de l'attention et de la mémoire des faits récents, désintérêt, indifférence affective, pouvant passer par des phases d'euphorie et d'excitation et troubles du langage lorsque l'hémisphère dominant est concerné. Si ces tumeurs ont une localisation fronto-calleuse (**Figure 6**), les signes cliniques peuvent se traduire par un état confusionnel pseudo-démontiel et des troubles de l'équilibre. Il est à remarquer que l'apparition de ces signes cliniques est souvent tardive (Geraud, 2008).

II. Les tumeurs temporales

Les signes cliniques des tumeurs temporales (**figure 5**) sont différents suivant l'hémisphère dominant ou mineur. Chez une personne droitier, l'hémisphère dominant correspond à l'hémisphère gauche, on retrouvera des troubles du langage, compréhension, répétition. Pour une tumeur localisée dans le lobe temporal droit cette fois, les signes sont peu spécifiques et tardifs, on peut retrouver une hypertension intracrânienne (Geraud, 2008).

III. Les tumeurs pariétales

Pour une tumeur pariétale (**Figure 5**), on retrouve surtout des signes cliniques sensitifs, qui touchent la sensibilité discriminative : astéréognosie (incapacité de reconnaître les objets par le toucher avec la main controlatérale à la lésion pariétale). Il existe aussi dans certains cas une atteinte du champ visuel controlatéral (Geraud, 2008).

IV. Les tumeurs occipitales

Dans le cas d'une tumeur occipitale (**Figure 5**), le principal symptôme retrouvé est une atteinte du champ visuel du type hémianopsie latérale homonyme (perte de vision de l'hémichamp des deux yeux opposé à la lésion soit pour une lésion droite perte des hémichamps coté gauche) (Geraud, 2008). (**Figure 7**).

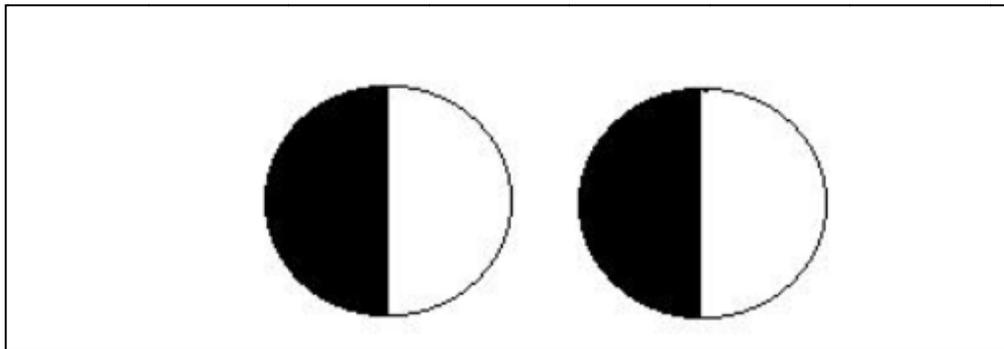


Figure 7 : représentation du champ visuel avec perte des hémichamps coté gauche lors des tumeurs occipitales touchant le nerf optique coté droit.

V. Les tumeurs hémisphériques profondes

Il s'agit de tumeurs qui touchent les noyaux gris centraux, avec des atteintes motrices de type hémiplégie ou hémiparésie (déficit partielle de la force musculaire). On peut également retrouver des signes sensitifs, comme des douleurs, anesthésies ou hémihypoesthésies (diminution de la sensibilité de la moitié du corps).

VI. Les tumeurs des commissures

Localisées au niveau du corps calleux (**Figure 6**), ces tumeurs provoquent principalement des troubles de la mémoire mais restent longtemps asymptomatiques (Geraud, 2008).

VII. Les tumeurs de la région sellaire

La région sellaire concerne l'axe hypothalamo-hypophysaire et le chiasma optique (**Figure 6**). On retrouve surtout des troubles endocriniens et des troubles visuels (Geraud, 2008).

5) Diagnostic des gliomes

L'imagerie et les biopsies permettent de confirmer le diagnostic d'une tumeur cérébrale. Ils existent différents types de techniques d'imagerie utilisées (IRM, Pet-Scan, Scanner) avec chacune leurs qualités et leurs limites. Aujourd'hui l'IRM tend à remplacer l'utilisation du Pet-Scan car ce dernier repère moins précisément que l'IRM les structures cérébrales sollicitées. Les biopsies sont indissociables de l'imagerie et permettent de confirmer le diagnostic sur le type de tumeurs. On retrouve deux façons de réaliser une biopsie, soit sous anesthésie locale (biopsie stéréotaxique), ou sous anesthésie générale, suivant la localisation de la tumeur.

a) IRM

L'IRM ou imagerie par résonance magnétique est un examen radiologique indolore, non invasif et très fiable. Il utilise la résonance des noyaux des atomes d'hydrogène contenus dans l'eau du corps humain sous l'action d'ondes dites de « radiofréquence ». Les données ainsi obtenues sont transmises à un ordinateur pour former des images en 2D ou 3D (Furois, 2005). L'IRM peut être réalisée avec ou sans produit de contraste (**Figure 8A, 8B**). Le produit de contraste utilisé est le Gadolinium, ion métallique toxique que l'on chélate avec une molécule de haut poids moléculaire pour former le chélate de Gadolinium, non toxique. Cette molécule ne passe pas la barrière hémato-encéphalique (BHE) en condition physiologique mais seulement lorsque celle-ci se trouve altérée comme dans le cas des gliomes. L'utilisation d'un produit de contraste permet d'obtenir une IRM dynamique de contraste (IRMD). Contrairement à un IRM classique qui montre la tumeur, l'IRMD permet d'évaluer la micro-vascularisation au sein de la tumeur (**Esnault, 2013b**). Pour évaluer cette micro-vascularisation on injecte un volume constant de produit de contraste dans le sang et on évalue le K_{trans} . Ce dernier est un index de perméabilité à la perfusion et mesure l'échange du chélate de Gadolinium entre le plasma sanguin et le milieu extravasculaire. Ceci est très utile pour estimer et comparer les réponses à la chimiothérapie avant et après traitement. Une diminution du K_{trans} de

50% indique une réponse thérapeutique cliniquement significative (**Esnault**, 2013b). Un autre type d'IRM est utilisée, l'IRM fonctionnelle (IRMf). L'IRMf permet de détecter l'activation des différentes aires du cerveau. Elle se base sur la mesure de l'effet BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent) (**Figure 8C**). La stimulation des aires du cerveau va provoquer une consommation d'oxygène et donc une augmentation de l'afflux sanguin. Ce dernier permet de mesurer l'oxygénation, soit le rapport oxy/désoxyhémoglobine. La désoxyhémoglobine est paramagnétique et pourra être détectée par l'IRM. Cette technique est très utile pour repérer les régions cognitive et sensitivomotrice en pré-opératoire de la chirurgie des gliomes. La durée de l'examen varie de 30 à 40 minutes en fonction du nombre de clichés.

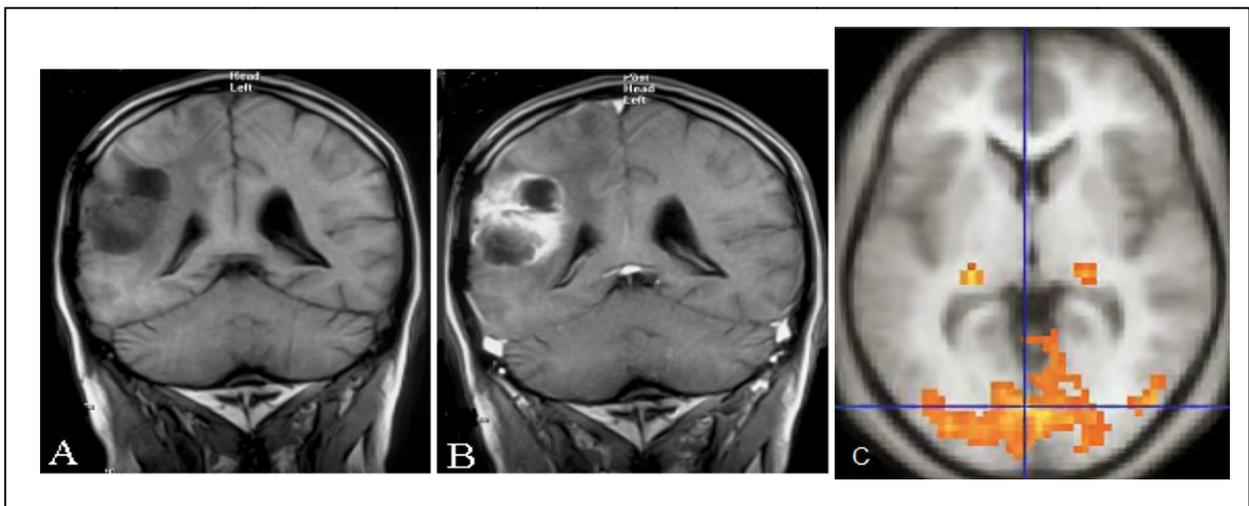


Figure 8 : IRM de glioblastome coté droit, situé dans le lobe pariétal. Sans produit de contraste (A). Avec injection de produit de contraste (B). IRMf montrant les aires de la vue stimulée (en orange) (C).

b) Scanner

Le scanner ou tomodensitométrie, très utile dans le diagnostic des tumeurs du cerveau, utilise les rayons X. En effet, suivant les tissus, le niveau d'absorption des rayons X est différent et se traduit par des niveaux de gris différents. Pour améliorer le niveau de contraste, on injecte au patient un produit de contraste iodé. Le scanner est constitué d'un tube émetteur des rayons X en rotation autour du patient (**Figure 9**). Les rayons X

qui traversent le patient finissent leur course sur un détecteur qui mesure l'intensité du faisceau. Ces données seront traitées par ordinateur pour former une image. L'image ainsi obtenue permettra de localiser précisément les foyers tumoraux (**Figure 10**) (Furois, 2005).

L'examen dure environ 15 à 45 minutes. Si le patient présente une allergie à l'iode, un traitement à base d'antihistaminique et de cortisone devra être préconisé en amont de l'examen.

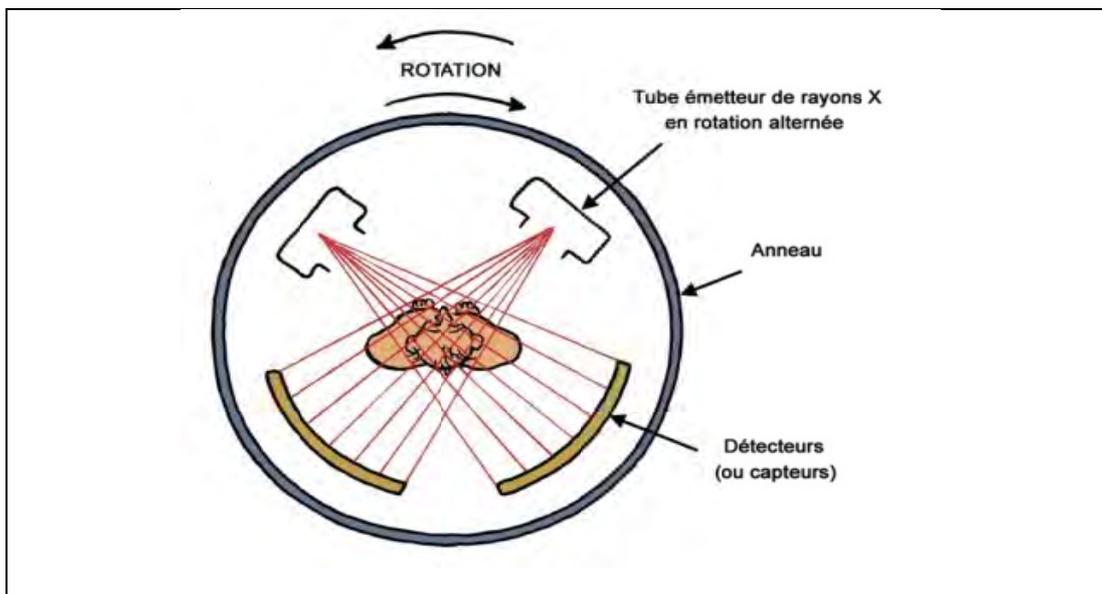


Figure 9: principe du scanner (Furois, 2005).

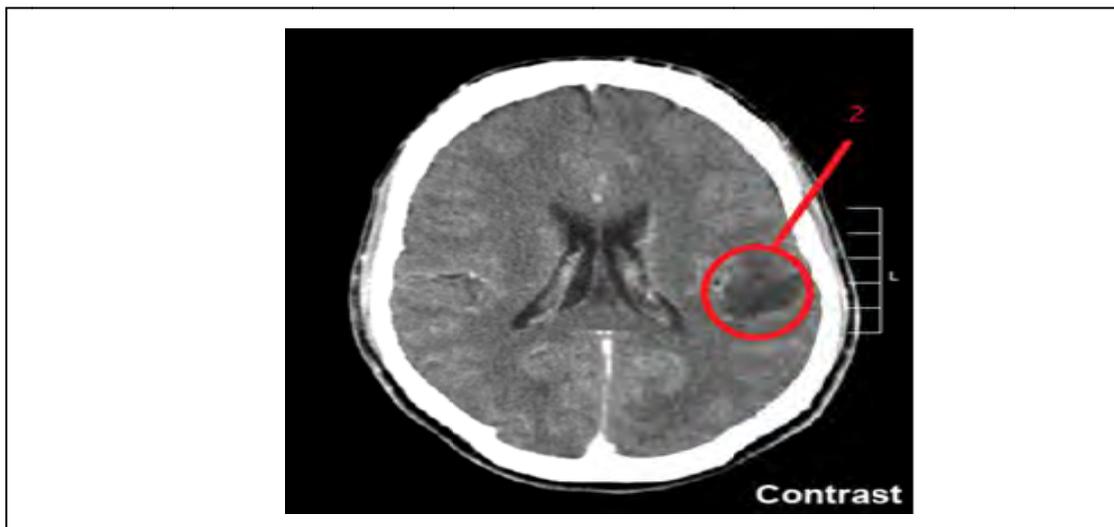


Figure 10 : Scanner cérébral montrant un gliome de grade II (2) situé dans le lobe pariétal gauche

c) Pet-Scan

Le Pet-Scan ou TEP pour tomographie à émission de positons est un examen qui utilise le rayonnement gamma pour reconstituer une image. Cette technique est invasive et nécessite l'injection d'un marqueur radioactif par voie sanguine. Le marqueur le plus couramment utilisé pour la détection des tumeurs du cerveau est le 18-FDG ou 18-FluoroDéoxyGlucose, isotope radioactif couplé à un dérivé du glucose (**Esnault, 2013c**).

Le principe repose sur la formation d'un positon lors de la désintégration de l'isotope radioactif. Lorsque le positon interagit avec un électron, il y a émission de deux photons gamma à 180 degrés l'un de l'autre (**Figure 11**) (Heron, 2011). Une caméra à positon détecte les photons émis par les positons afin de reconstituer une image. Le 18-FDG a une structure proche du glucose et sera capté par les cellules qui en sont fortement consommatrice comme les cellules cancéreuses, très glycolytiques. Cet examen ne remplace pas l'IRM ou le scanner, mais il est complémentaire pour la suspicion de récurrence et permet de mettre en évidence des petites tumeurs non visibles à l'IRM ou au scanner.

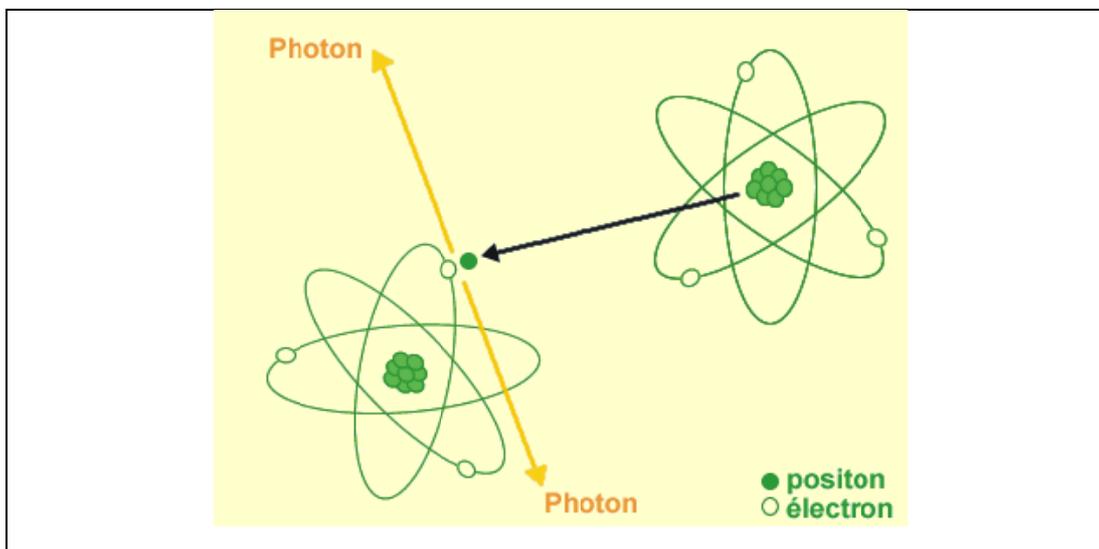


Figure 11 : réaction d'annihilation de l'atome de Fluor 18 avec émission de photons (Heron, 2011)

Il existe d'autres marqueurs utilisés en TEP dans la détection des gliomes, notamment le 18-F-Dopa ou 18 Fluoro Désoxyphenilalanine. Le 18-F-Dopa est un acide aminé, précurseur de la dopamine converti en dopamine dans la région du striatum par la Dopa Décarboxylase et qui sera ensuite diffusée hors du corps strié (Karunanithi *et al.*, 2013). Lors de l'examen le patient doit être à jeun et au repos complet. Une heure après l'injection du radioélément, l'examen débute et dure 30 minutes environ. Pendant toute la durée de l'examen le patient doit rester totalement immobile.

d) Biopsie

Une biopsie est un acte chirurgical, qui consiste à prélever un petit échantillon de tissu tumoral en vue d'établir un diagnostic. Cet acte est indispensable pour confirmer les éléments diagnostiques obtenus par l'imagerie. Suivant la localisation de la tumeur, on réalisera une biopsie sous anesthésie locale ou générale (Esnault, 2013a).

Une biopsie sous anesthésie locale est réalisée lorsque la tumeur n'est pas accessible. Pour réaliser la biopsie, on utilise un cadre stéréotaxique (**Figure 12**) posé autour du crâne qui permet de repérer avec précision, au millimètre près, un point ou cible dans le cerveau (la tumeur). Le cadre est maintenu en deux temps successifs : on réalise un IRM (ou scanner) afin de repérer le site de la tumeur, qui est traduit en coordonnées spatiales à partir des graduations du cadre. Une fois la zone ciblée repérée, le chirurgien réalise un trou dans le crâne (trépanation) pour introduire une aiguille d'aspiration et prélever un échantillon. Le tout est envoyé à l'anatomopathologiste pour analyse (Esnault, 2013a).

Pour une tumeur accessible, on réalise une exérèse sous anesthésie générale. On procède à l'ouverture de la boîte crânienne afin de retirer la tumeur en partie ou dans sa totalité. Un échantillon, ou biopsie, sera ensuite envoyé à l'anatomopathologie pour confirmer la nature de la tumeur.

Dans le cas de tumeur asymptomatique à évolution radiologique imperceptible, une simple surveillance radiologique et clinique est décidée sans biopsie ou chirurgie (Carpentier, 2008).

La biopsie est un acte invasif et comporte des risques hémorragiques et infectieux minimes. D'autres complications peuvent être retrouvées lors de l'exérèse de la tumeur dues à sa localisation.

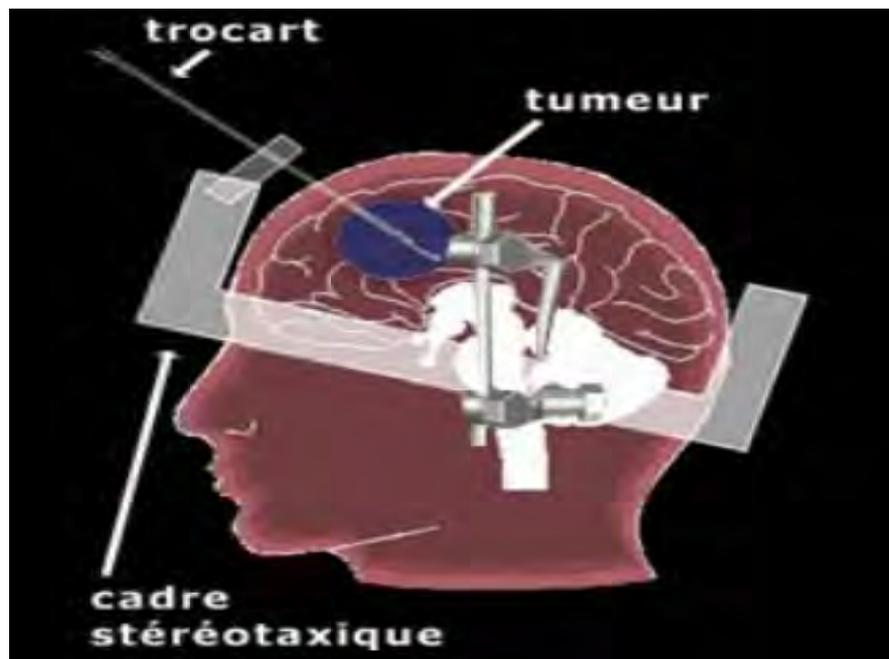


Figure 12: Principe des biopsies stéréotaxiques

II. Prise en charge thérapeutique des patients atteints de gliome

La prise en charge thérapeutique des gliomes reste difficile, d'une part par la localisation de la tumeur située dans le cerveau, un organe très fragile et sensible, et d'autre part des lésions neuronales irréversibles provoquées par la tumeur. La décision de la stratégie thérapeutique est multidisciplinaire, elle est faite lors de la réunion de concertation pluridisciplinaire réalisée par le comité pluridisciplinaire, constitué de différents acteurs de santé : Médecin généraliste, anesthésiste, neurologue, neurochirurgien, oncologue médical, oncologue radiothérapeute, pathologiste, radiologue. Cette stratégie

thérapeutique repose généralement sur un traitement symptomatique et un traitement étiologique.

Le traitement symptomatique repose sur la diminution des signes cliniques induits par la présence de la tumeur. L'œdème cérébral est traité par corticothérapie (SOLUPRED®, CORTANCYL®, MEDROL®, SOLUMEDROL®, SOLUDECADRON®) et les crises d'épilepsies par des antiépileptiques (KEPPRA®, DEPAKINE®, LAMICTAL®, TRILEPTAL® ou TEGRETOL®) en période péri-opératoire et/ou post-opératoire. D'autres complications comme des troubles digestifs peuvent survenir chez les patients recevant de fortes doses de corticoïdes et/ou avec des antécédents d'ulcère. Dans ce cas, des inhibiteurs de la pompe à proton (IPP) ou des inhibiteurs des récepteurs H2 seront prescrits. D'autre part les complications thromboemboliques sont plus fréquentes chez les sujets atteints de gliomes, ce qui accroît l'importance de les surveiller, de les prévenir et de les traiter si elles apparaissent.

Quant au traitement étiologique, il est instauré pour traiter la tumeur elle-même. Ce traitement est constitué de 3 éléments : chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie ou d'une association des trois modalités. La décision d'utiliser une ou plusieurs modalités dépendra :

- Du type de tumeur
- De la taille et de la localisation de la tumeur
- De l'évolution et de l'agressivité de la tumeur
- De l'âge et de l'état physique du patient

1) La chirurgie

a) Sélection des patients

La sélection des patients pouvant bénéficier d'une exérèse est murement réfléchie. Elle s'appuie sur des critères cliniques et anatomo-fonctionnels.

I. Critère clinique

L'examen clinique pré-opératoire est essentiel afin de pouvoir réaliser ensuite une cartographie cérébrale par stimulation corticale fiable juste avant l'exérèse de la tumeur.

Elle permet d'évaluer les fonctions motrices, sensibles et du langage. On évalue la motricité et la sensibilité sur une échelle de 1 à 5. Lorsqu'elles sont inférieures ou égales à 3/5, la cartographie du cerveau est peu fiable, et cela contre-indique l'exérèse de la tumeur (Guyotat *et al.*, 2005). L'évaluation du langage fait appel à des orthophonistes qui utilisent le *Boston Diagnostic Aphasia Examination* (BDAE). Le BDAE est un outil multifactoriel qui permet d'évaluer: la compréhension, la fluence verbale, la génération des mots, le calcul, un test de latéralité et la dénomination orale des objets (DO80) (Mazaux and Orgogozo, 1982). Cette dernière épreuve (DO80) est importante car elle est reproductible en per-opératoire. Si l'on constate plus de 25% d'erreurs de dénomination d'objets, la cartographie per-opératoire est contre-indiquée car les aires du langage ne pourront être préservés et il sera donc important de rediscuter la prise en charge thérapeutique du patient.

II. Critère radiologique

Les critères anatomo-fonctionnels sont évalués en pré-opératoire à l'aide de l'IRM qui est l'examen le plus pratiqué pour des raisons de coût et de simplicité. L'IRM nous renseigne sur le type de gliome et son grade. L'IRMf permet de compléter le bilan sur la localisation de la tumeur. La localisation dans l'espace permet de situer la tumeur dans une zone fonctionnelle motrice, somato-sensorielle et/ou du langage. Le but des critères radiologiques est de se rapprocher le plus possible des tests cliniques effectués en per-opératoire. Ceci est envisageable avec l'IRMf pour évaluer les aires motrices et sensibles mais plus difficile avec les aires du langage. Il se trouve que le test de base en per-opératoire DO80 n'est pas un modèle d'activation spécifique d'une localisation en IRMf (FitzGerald *et al.*, 1997). Une fois ce bilan clinique et radiologique réalisé, on peut convenir ou non d'une intervention chirurgicale. Une discussion avec le patient doit être faite afin de l'informer des risques et des bénéfices d'une telle intervention.

Chez les patients de 70 ans et plus, dans le cas des glioblastomes, la chirurgie est préconisée avec les mêmes critères cliniques et anatomo-fonctionnels. Mais contrairement aux patients de moins de 70 ans, des facteurs de mauvais pronostic comme une broncho-pneumopathie chronique obstructive, un déficit moteur ou cognitif,

un trouble phasique ou une taille tumorale supérieure à 4 cm peuvent contre-indiquer la chirurgie (Levy *et al.*, 2014). Dans ce cas, soit un protocole standard seul associant radio et chimiothérapie (Stupp *et al.*, 2005), une radiothérapie seule ou une chimiothérapie seule peuvent être indiqués (Glantz *et al.*, 2003) (Chinot *et al.*, 2004).

b) Déroulement de l'exérèse

En premier lieu, on doit installer le patient le plus confortablement possible. Les positions couramment utilisées sont le décubitus dorsal avec l'épaule surélevée et la tête tournée ou en décubitus latéral. La tête est fixée dans une têtère à prise osseuse. Pour une tumeur localisée dans une zone motrice, lors de la mise en place des champs opératoires, la face et les membres supérieurs et inférieurs controlatéraux resteront visibles. Ceci permet de contrôler la survenue de mouvements ou de crises comitiales pouvant être observés pendant la cartographie motrice lors de l'intervention chirurgicale. Pour une tumeur située dans les aires sensitives et/ou du langage, le champ visuel et le pharynx doivent être dégagés, pour que le patient puisse communiquer visuellement ou oralement afin d'effectuer le repérage des aires somato-sensorielles et du langage, lors de la cartographie des aires du langage et sensitives (Mazaux and Orgogozo, 1982).

Lorsque le patient est bien installé on réalise la craniotomie. Dans un premier temps on commence par faire une anesthésie générale au patient afin d'ouvrir le crâne pour retirer le volet osseux et pratiquer une incision de la dure-mère. Une fois que la tumeur est accessible on réalise une seconde anesthésie qui peut être générale ou locale. C'est la localisation de la tumeur qui oriente le choix d'une anesthésie générale ou locale. Lorsque la tumeur ne se situe pas dans une aire fonctionnelle, l'exérèse est réalisée sous anesthésie générale de manière traditionnelle. Si la tumeur se situe dans une zone fonctionnelle motrice, sensitive ou du langage, l'exérèse est réalisée sous anesthésie locale. La chirurgie se déroule en deux étapes : on réalise dans un premier temps la cartographie cérébrale afin de repérer et de préserver les zones fonctionnelle et dans un second temps on procède à l'exérèse tumorale.

Dans les deux cas l'exérèse tumorale sera la plus large possible toute en respectant les risques d'un handicap neurologique.

Suivant le grade des gliomes l'exérèse sera différente : Pour un gliome de bas grade, l'exérèse doit être la plus large possible afin de retarder le passage à l'anaplasie et ainsi faire disparaître les crises d'épilepsie. Ceci n'est pas toujours le cas chez des patients ayant un bilan pré-opératoire qui oblige à subir une exérèse partielle. Dans ce cas il sera alors proposé en première intention une chimiothérapie afin de réduire le volume tumoral dans le but ensuite de pratiquer une exérèse totale. Maintenant, dans le cas où un bilan pré-opératoire contre-indique l'exérèse, une seule biopsie stéréotaxique est réalisée afin de proposer une radiothérapie et/ou chimiothérapie (Carpentier, 2008).

Dans le cas des gliomes de haut grade, l'exérèse doit être la plus large possible afin d'augmenter l'espérance de vie. Pour les gliomes de grade III l'exérèse inclut la prise de contraste radiologique ainsi que l'infiltrat tumoral vu à l'IRM tout en préservant les fonctions neurologiques. Alors que dans le cas des GBM l'exérèse se limite à la prise de contraste radiologique sans se préoccuper de l'infiltrat tumoral (Carpentier, 2008).

Dans un troisième temps, une fois l'exérèse terminée, on réalise une nouvelle stimulation des aires fonctionnelles afin de contrôler les aires motrices, sensibles et/ou du langage. Ce contrôle permet d'évaluer le risque d'un déficit neurologique en post-opératoire et de rassurer le patient sur sa récupération (Guyotat *et al.*, 2005).

c) Réalisation de la cartographie

La réalisation de la cartographie se fait à l'aide d'une sonde monopolaire (Jaaskelainen and Randell, 2003) (Taylor and Bernstein, 1999) ou bipolaire, cette dernière étant plus précise (Haglund *et al.*, 1993) (Kombos *et al.*, 1999). La stimulation du parenchyme cérébral est débutée à une intensité de 1 mA. Puis on augmente l'intensité de 1 en 1 mA jusqu'à obtenir une réponse, mais sans dépasser le seuil maximal de 8 mA (Guyotat *et al.*, 2005). Le seuil maximal correspond à l'intensité susceptible de déclencher des crises comitiales, qui rendraient la cartographie moins précise. Pour tester les fonctions cognitives, la sonde doit rester au contact du parenchyme environ 4 secondes. Les stimulations sont pratiquées tous les centimètres carrés sur l'ensemble de la surface corticale.

Les fonctions somato-sensorielles sont testées lors de la stimulation par une description des troubles de la sensibilité par le patient. L'évaluation du langage est plus complexe,

elle se fait par l'épreuve de base qui est le test DO80, par projection d'images toutes les 5 secondes sur un écran d'ordinateur. Chaque aire corticale est testée trois fois avant l'exérèse, afin d'éviter des faux négatifs. Chaque aire fonctionnelle reconnue sera marquée par une étiquette et préservée lors de l'exérèse (**Figure 13**).

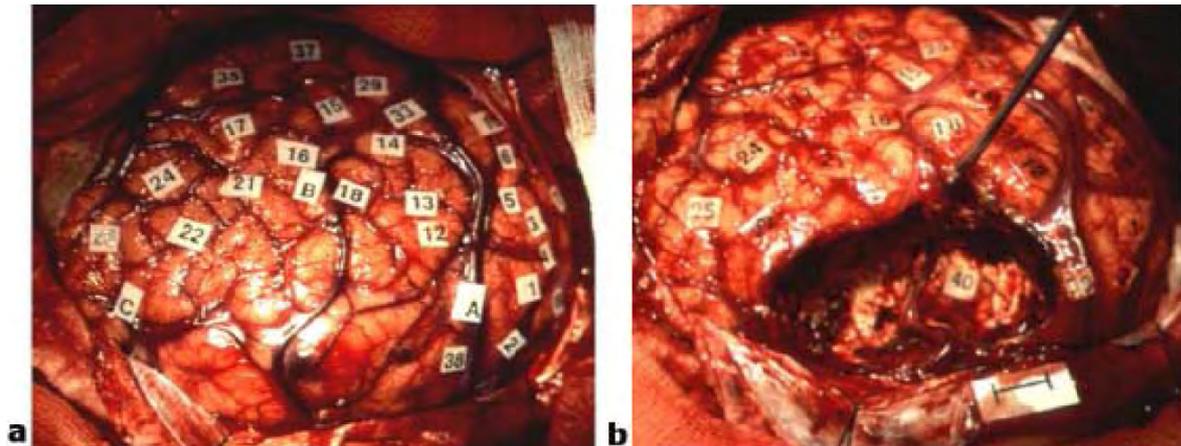


Figure 13 : Cartographie fonctionnelle per-opératoire. a) Cartographie fonctionnelle des zones corticales avant le début de la résection. b) Cartographie corticale et sous-corticale (étiquette 40) durant la résection

d) Complications per-opératoires

Le risque de complications est retrouvé lors des anesthésies locales, avec des risques de surdosage en anesthésique rendant le patient somnolent se qui rend la cartographie peut fiable. Un risque de crise d'épilepsie survient dans 5 à 20 % des cas, manifestation stoppée par l'irrigation du cortex avec du sérum physiologique froid (Sartorius and Berger, 1998). D'autres complications plus graves mais exceptionnelles peuvent apparaitre: dépression respiratoire due à un surdosage en morphinique ou un œdème per-opératoire majeur durant l'exérèse de la tumeur.

e) Nouvelle approche dans la chirurgie des gliomes.

L'utilisation de la fluoresence lors de la chirurgie ameliore la qualité de l'exérèse des gliomes et la survie des patients sans recidive (Stummer *et al.*, 2006). Elle utilise l'acide

5-aminolévulinique (5-ALA) qui est un précurseur de l'hémoglobine, métabolisé en porphyrine fluorescente. Cette porphyrine s'accumule dans les gliomes et est détectée par microscopie à fluorescence permettent de détecter des ilots tumoraux persistants (Carpentier, 2008)

2) Radiothérapie

La radiothérapie est systématiquement proposée sauf contre-indication ou âge avancé dans un délai de 4 à 6 semaines après la chirurgie. Les sources utilisées pour la radiothérapie des gliomes sont les rayons X. La dose s'exprime en gray (Gy), où 1 Gy correspond à une énergie de 1 joule absorbée dans une masse de 1 kilo. L'utilisation des rayons X a comme avantage de sous-doser l'irradiation des plans superficiels et donc d'agir plus en profondeur. Pour que la radiothérapie soit optimale il convient de cibler au mieux la zone à irradier en définissant le volume anatomique à irradier.

a) Volume de radiothérapie

Le volume de radiothérapie correspond au volume anatomique dans lequel on veut éradiquer la tumeur. Il existe plusieurs volumes cibles pouvant être individualisés et qui tiennent compte de la probabilité d'envahissement tumoral (Kantor *et al.*, 2001), de la dose que l'on souhaite y délivrer et du risque encouru lors de l'irradiation. Actuellement le volume cible est défini de façon protocolaire et, en traçant les limites sur l'imagerie, coupe par coupe, il existe différentes façons de le définir : soit en prenant une marge de sécurité autour de la prise de contraste tumoral au scanner ou à l'IRM, soit en se référant à l'œdème péri-tumoral. On définit ainsi le Gross Tumor Volume (GTV), Clinical Target Volume (CTV) et le Planning Target Volume (PTV) (Chavaudra and Bridier, 2001) (**Figure 14**).

- GTV: volume prenant le **contraste** au scanner ou à l'IRM avec la cavité opératoire (Chavaudra and Bridier, 2001).
- CTV: correspond au GTV augmenté d'une marge concentrique de 10 mm, qui peut être modifiée si nécessaire pour chaque patients en

fonction de la situation particulière de la tumeur par rapport aux organes à risque (OAR) et aux structures voisines et en tenant compte des voies d'extension possibles et des barrières anatomiques. Ceci est considéré comme le protocole standard (Chavaudra and Bridier, 2001).

- PTV: volume autour du CTV qui prend en compte les incertitudes de repositionnement, généralement de 3 à 5 mm (Chavaudra and Bridier, 2001).

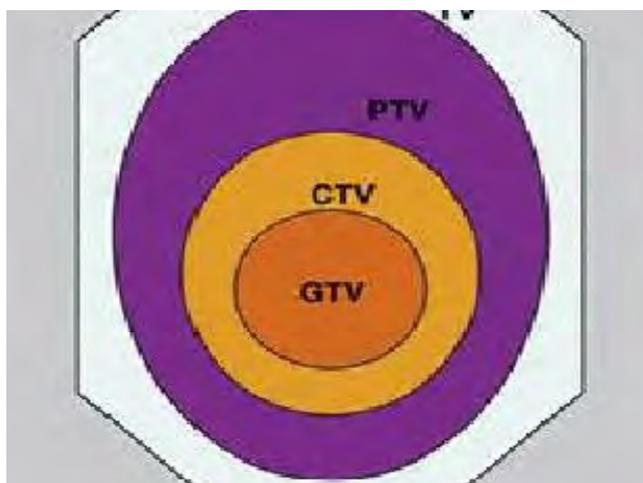


Figure 14: volumes définis pour l'irradiation de la tumeur

b) Protocole de radiothérapie

Le protocole de radiothérapie standard dans le cas des gliomes de grade III et IV comporte une dose de 60 Gy, dose maximale pouvant a priori être reçue par le patient pour des raisons de toxicité sur le SNC. Les 60 Gy reçus par le patient sont fractionnés en 5 fractions de 2 Gy par semaine, du lundi au vendredi, sur un intervalle de 6 semaines, ce qui limite la toxicité au niveau du tissu sain. Pour les gliomes de grade II, le protocole de radiothérapie se situe à des doses inférieures comprises entre 45 Gy (5 jours par semaine sur 5 semaines) et 50,4 Gy (5 jours par semaine pendant 5,6 semaines). Il a été montré dans deux études sur les gliomes de grade II, comparant des doses de 45 (versus 59,4 Gy) et 50,4 Gy (versus 64,8 Gy) que de plus fortes doses n'augmentaient pas la survie globale (Karim *et al.*, 1996) (Shaw *et al.*, 2002) mais qu'il était retrouvé une radio-nécrose plus forte dans les 2 ans post-radiothérapie (Shaw *et al.*, 2002).

La radiothérapie est associée le plus souvent à la chimiothérapie afin d'augmenter l'efficacité du traitement. L'association de ces deux modalités a un effet additif et peut donner dans le meilleur des cas une potentialisation des effets. Une étude de phase III menée en 2005 sur 573 patients atteints de GBM par Stupp (Stupp *et al.*, 2005) associe la radiothérapie et un agent alkylant le Témzolomide (TMZ), comparativement à la radiothérapie seule (**Figure 15**) (Stupp *et al.*, 2005). Cette étude montre une augmentation de la médiane de survie de 12,1 mois (radiothérapie seule) à 14,6 mois pour la radiothérapie associée au TMZ (**Figure 16**) (Stupp *et al.*, 2005).

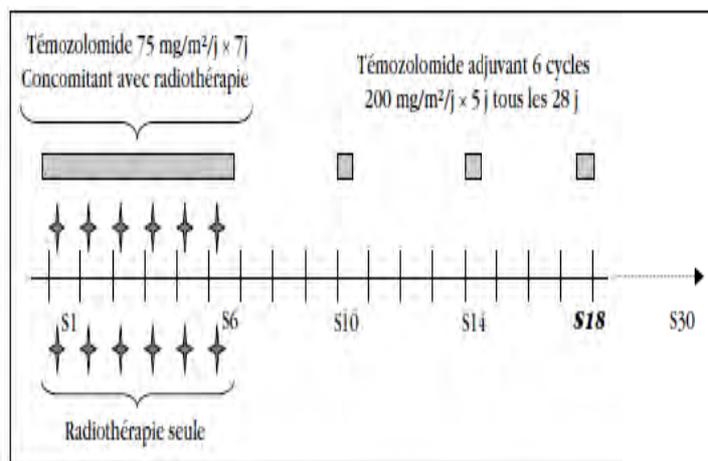


Figure 15 : Schéma thérapeutique utilisé dans le protocole rapporté par Stupp (Stupp *et al.*, 2005). Radiothérapie focalisée 60 Gy (30 x 2 Gy), 5j/7j sur 6 semaines, associée au Témzolomide et suivie de 6 cycles (maximum) de Témzolomide seul; S : semaines

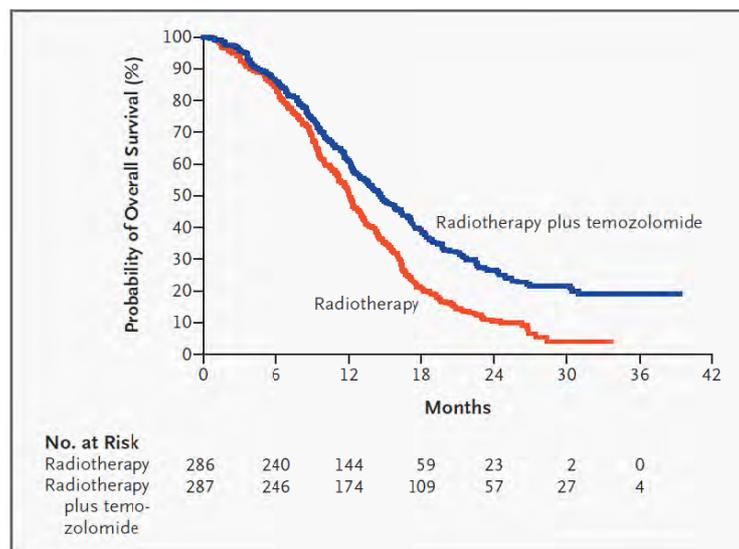


Figure 16 : Courbe ratio montrant l'augmentation de la médiane de survie chez les patients traités par radiothérapie seule (rouge) et radiothérapie plus TMZ (bleu) (Stupp *et al.*, 2005)

3) Chimiothérapie

Le pronostic des tumeurs, malgré un traitement associant la chirurgie et la radiothérapie, reste faible. L'association de la chimiothérapie dans le traitement des gliomes a permis d'augmenter la médiane de survie de manière significative. Une étude publiée par le Glioma Meta-analysis Trialist (GMTG) (Stewart, 2002) démontre l'intérêt d'associer la radiothérapie à une chimiothérapie par rapport à la radiothérapie seule. Initialement, cette association était réservée au traitement des récives. Cependant la sensibilité des gliomes face à la chimiothérapie reste faible pour différentes raisons dont les plus importantes sont:

- Le premier est la BHE. En effet, la structure anatomique des capillaires cérébraux qui constitue la BHE est constituée de cellules endothéliales pourvues de jonctions intracellulaires serrées et dépourvues de pores. Cette structure a pour conséquence de limiter la perméabilité des médicaments. Lorsque la tumeur se développe, l'ultrastructure des capillaires cérébraux se modifient dans le sens d'une rupture de la barrière vasculaire. Cette rupture n'est que partielle et l'on comprend qu'elle ne laisse passer qu'en partie les agents anticancéreux (Lang, 1979) (Frenay *et al.*, 1995). .
- La seconde est la résistance des cellules tumorales aux agents anticancéreux, phénomène de résistance produit par des mécanismes indépendants comme:
 - ✓ La methylguanine-methyltransférase (MGMT) est une enzyme de réparation de l'ADN. Une concentration importante de cette enzyme provoque une chimiorésistance, c'est le cas notamment pour le Témazolomide (Esteller *et al.*, 2000). En effet, les lésions créées par des agents provoquant des cassures des brins d'ADN, comme les agents alkylants ou les nitroso-urées voient leurs effets diminués. Il a été montré que les patients ayant une méthylation du gène codant pour la

MGMT ont une survie plus longue après chimiothérapie que les non méthylés (Hegi *et al.*, 2005).

- ✓ Les systèmes MultiDrug Resistance, ou MDR, provoquent une chimiorésistance, par l'action d'une p-glycoprotéine (PGP ou GP170 membranaire) présente à la surface des cellules endothéliales des capillaires cérébraux et tumoraux (Fojo *et al.*, 1987). Cette p-glycoprotéine est capable d'augmenter l'efflux cellulaire des agents anticancéreux en dehors de la cellule. En ce qui concerne les gliomes l'expression de PGP n'est pas retrouvée aux niveaux des cellules endothéliales. Par contre la PGP est exprimée de manière inconstante dans les cellules gliales tumorales elles même (Matsumoto *et al.*, 1991).

a) Les anticancéreux

Le traitement des patients par chimiothérapie repose sur l'administration locale ou systémique d'un agent cytotoxique. La voie systémique est la voie la plus utilisée. En effet l'utilisation des agents cytotoxiques doit tenir compte de l'état général du patient, de l'état de sa fonction hématopoïétique et des risques de complications infectieuses compte tenu de leur grande toxicité.

Il existe différents types d'anticancéreux utilisés à l'heure actuelle suivant le type de gliome. Après différents essais cliniques, il a été mis en évidence que certaines drogues augmentaient la médiane de survie de manière significative. Dans le cas des GBM on retrouve l'utilisation en première ligne des agents alkylants alors que pour les gliomes anaplasiques, on utilise l'association de plusieurs drogues.

I. Les agents alkylants

I.1 Les nitroso-urées

Le traitement de première intention des GBM a longtemps été les nitroso-urées, avec une faible majoration du taux de survie se limitant le plus souvent à 18 mois, ainsi qu'un faible impact sur la médiane de survie (Walker *et al.*, 1978). Les nitroso-urées

sont des molécules provoquant une alkylation de la molécule d'ADN, au niveau de l'azote N7 de la guanine et en N1 et N3 de l'adénine ou en N3 de la cytosine. L'alkylation se produit pendant la phase S du cycle cellulaire lors de la réplication de l'ADN, ce qui a pour conséquence de bloquer le cycle de ces cellules en phase G2. Cette alkylation peut se faire entre deux molécules d'ADN de manière intra-brins ou inter-brins, ce qui induit des lésions et provoque la mort cellulaire (Pourquier, 2011). Les nitroso-urées sont des molécules lipophiles, ce qui leur permet donc de passer la BHE facilement. En conséquence, elles représentent un intérêt majeur pour le traitement des tumeurs cérébrales (Brion, 2003). En terme d'effets indésirables, on retrouve une myélotoxicité retardée de 5 à 6 semaines, qui touche les trois lignées cellulaires, provoquant une anémie, une neutropénie et une thrombopénie. D'autres effets indésirables fréquents sont les nausées et vomissements qui surviennent dans les deux heures suivant l'administration de la chimiothérapie. Les principales molécules utilisées sont:

- ✓ **La carmustine (Bicnu™)** ou BCNU pour « Bis-Chloroéthyl-Nitroso-Urée »,
- ✓ **La lomustine (Bélustine™)** ou CCNU pour « Chloroéthyl Cyclohexyl Nitroso-Urée »,
- ✓ **La fotémustine (Muphoran™)**

Les nitroso-urées restent utilisées seules ou en association dans le cadre du protocole polychimiothérapeutique (PCV) dans le cas des gliomes de grade III. En effet il a été démontré que la présence d'une codélétion 1p-19q était étroitement liée à la chimiosensibilité (Cairncross *et al.*, 1998). Cette étude a mené à la réalisation d'autres études qui montrent une augmentation significative sur la médiane de survie de 14.7 ans contre 7.3 ans dans le protocole radiothérapie-PCV contre radiothérapie seule (Cairncross *et al.*, 2012).

I.2 Le Témzolomide

Le Témzolomide (TMZ) est l'agent alkylant le plus utilisé dans le traitement des GBM en première intention et en situation de récurrence. C'est un agent alkylant de deuxième génération de la classe des imidazotétrazines, molécule qui passe facilement la BHE et qui propose un profil d'effets indésirables faible. Une étude de phase II menée par Stupp

(Stupp *et al.*, 2002) sur 64 patients visant à évaluer la toxicité du protocole thérapeutique (**Figure 15**) décrit si dessus, démontre une toxicité acceptable. Les effets secondaires marquants étaient une neutropénie, une thrombopénie ou les deux chez 6% des patients et une lymphopénie très fréquente survenant chez 79% des patients (Stupp *et al.*, 2002). Son mécanisme d'action est une alkylation sur les bases de guanine en position O6 et N7, ce qui entraîne l'apoptose des cellules tumorales par l'intermédiaire du système de réparation des mésappariements (MMR). En effet, l'alkylation induit une erreur d'appariement, qui lors des réplifications suivantes active le MMR de manière répétitive (**Figure 17**) (Benouaich-Amiel *et al.*, 2005). Son administration se fait par voie orale de manière concomitante à la radiothérapie, soit une dose de 60 Gy fractionnée à 2 Gy x 5 jours sur 6 semaines et une dose de TMZ de 75 mg/m²/j pendant 7 jours par semaine pendant 6 semaines. Puis 6 cycles (maximum) de façon adjuvante au traitement initial à une dose de 200mg/m² x 5 jours tous les 28 jours (Stupp *et al.*, 2005) (**Figure 15**)

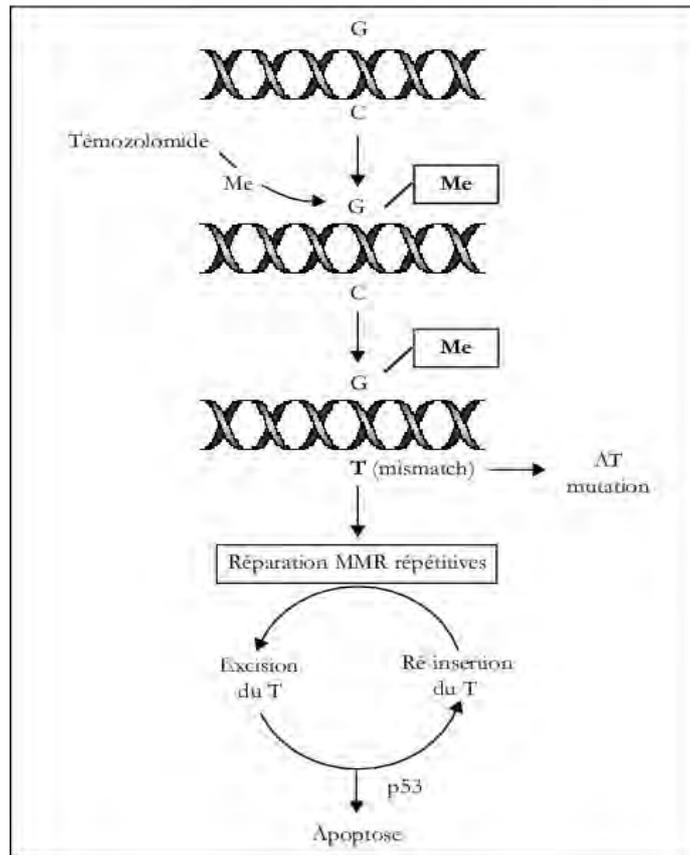


Figure 17. Mécanisme d'action du Témzolomide (Benouaich-Amiel *et al.*, 2005)

II. Protocole polychimiothérapeutique

Le protocole de polychimiothérapie ou protocole PCV, est l'association de plusieurs agents cytotoxiques. Il résulte de l'utilisation de deux agents alkylants la Procarbazine et le Lomustine associé à la Vincristine, un agent de poison du fuseau mitotique. L'indication du protocole PCV donne un meilleur résultat dans le traitement des oligodendrogliomes anaplasiques que dans les astrocytomes de haut grade (van den Bent *et al.*, 2006). L'apparition d'effets indésirables reste acceptable avec l'apparition d'une myélotoxicité touchant les trois lignées cellulaires. La prise du traitement se fait en deux cures d'une durée de 29 jours, soit la première cure à J1 et la seconde à J56 (**Figure 18**) (About *et al.*, 2013).

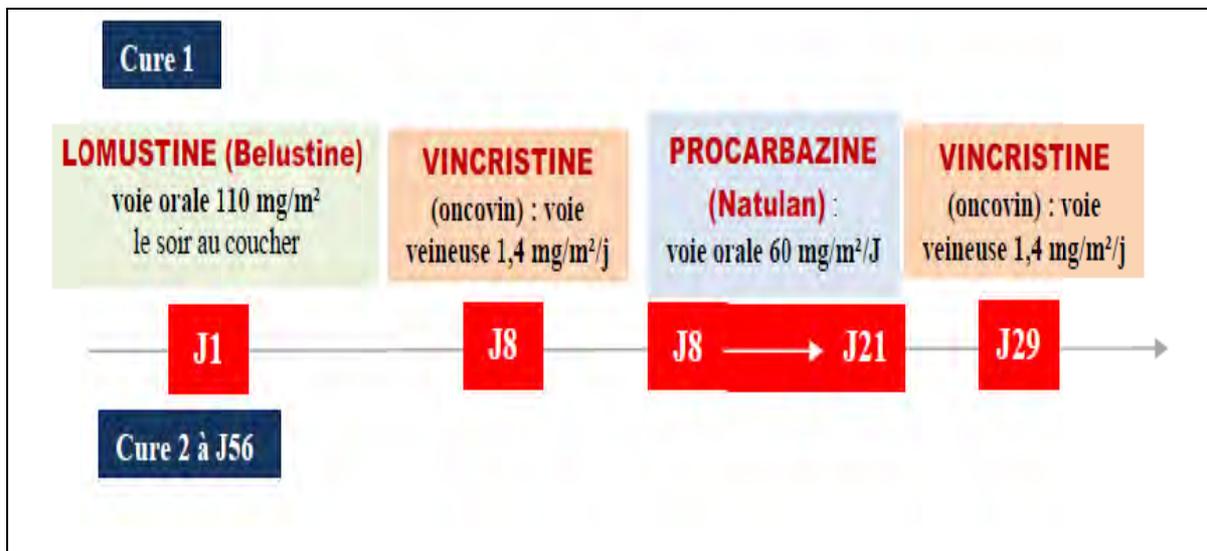


Figure 18 : Protocole de polychimiothérapie PCV

b) Nouvelles perspectives thérapeutiques

I. Introduction

A l'heure actuelle plusieurs essais cliniques sont en cours d'évaluation, avec des thérapies ciblées utilisées seules ou en association avec la radiothérapie et/ou avec la chimiothérapie conventionnelle. Plusieurs cibles impliquées dans la gliomagenèse sont à l'étude, notamment des inhibiteurs de voies moléculaires de transduction du signal dans les GBM. On retrouve des inhibiteurs de tyrosine kinase et des anticorps monoclonaux

dirigés contre le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le récepteur des facteurs de croissance plaquettaire (PDGFR) (**Figure 19**). En fonction des études, certaines molécules ont montré des résultats encourageants sans pour autant apporter un réel bénéfice sur la médiane de survie des patients.

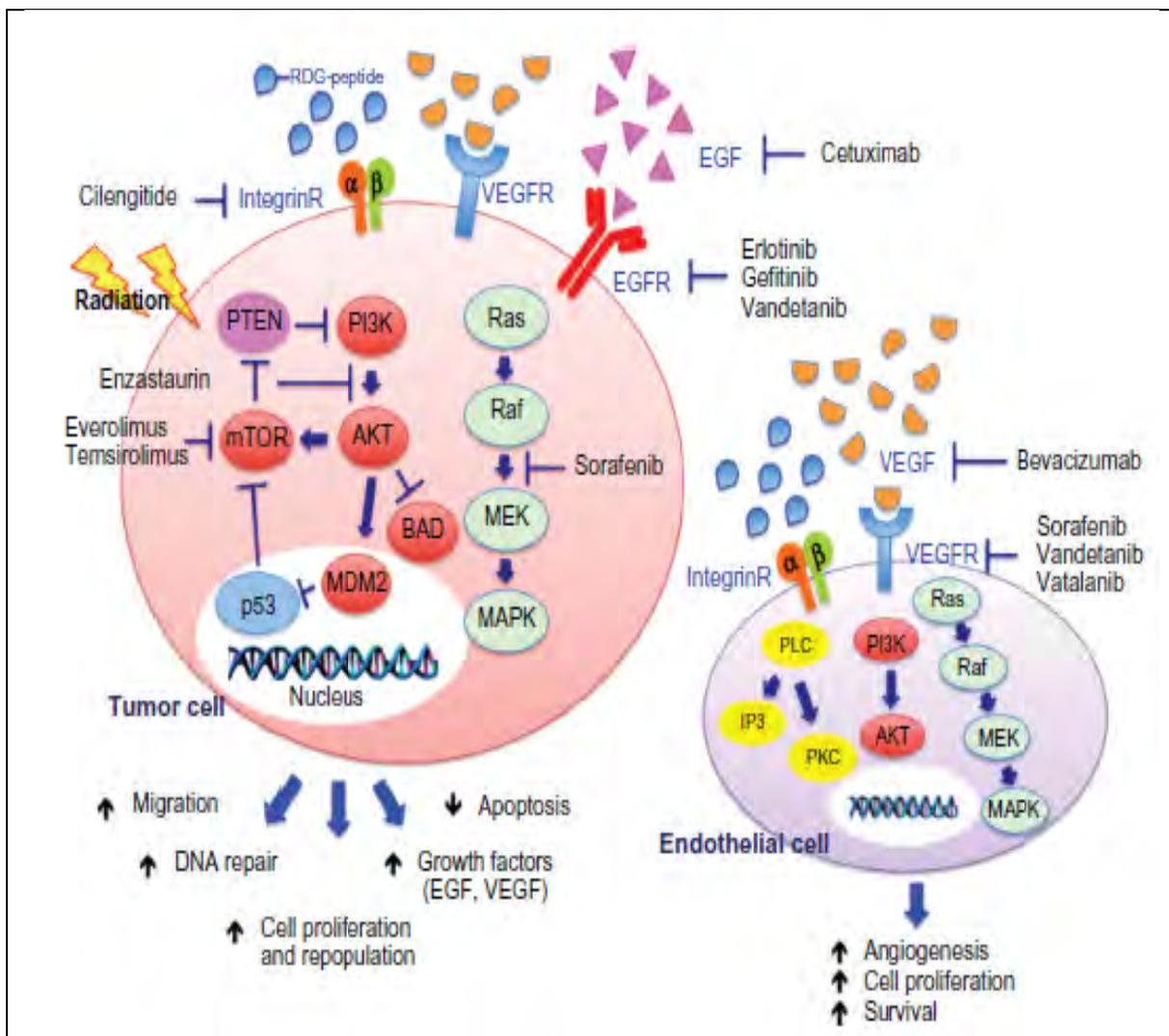


Figure 19 : Représentation des différentes molécules et des voies utilisés dans les nouvelles approches thérapeutiques des traitements des GBM (Scaringi *et al.*, 2013).

II. Le Bevacizumab ou Avastin™

Le Bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF (**Figure 19**), bloquant l'interaction du VEGF avec son récepteur. Plusieurs études sur des lignées cellulaires de GBM ont montré une augmentation dose-dépendante du taux de VEGF après une seule dose de rayonnement, qui conduit à une augmentation de l'angiogenèse tumorale et serait responsable de la radiorésistance des cellules endothéliales et tumorales (Gorski *et al.*, 1999) (Gupta *et al.*, 2002). Une étude de phase II menée par Lai et al (Lai *et al.*, 2011) sur 70 patients atteints de GBM, associait le Bevacizumab par voie IV à une dose de 10 mg/kg tous les 14 jours pendant toute la durée du traitement à la radiothérapie focalisée 60 Gy (30 x 2 Gy, 5j/7j sur 6 semaines) et au TMZ pendant toute la durée du traitement suivant le protocole Stupp et al (Stupp *et al.*, 2005). (**Figure 20**). La durée du traitement a été évaluée en fonction de la progression de la tumeur avec un maximum de 24 cycles de TMZ après la radiothérapie. Les résultats ont montré une survie médiane de 19,6 mois et un taux de survie sans progression de 13,6 mois. Cette étude a été comparée à une étude témoin sur 110 patients traités par un traitement standard qui obtenait une médiane de survie de 21,1 mois et un taux de survie sans progression de 7,6 mois. Ce traitement montre une amélioration du taux de survie sans progression mais aussi une absence d'amélioration de la survie globale. Dans l'ensemble, les résultats obtenus montrent que le traitement Bevacizumab associé à la radiothérapie et le TMZ est bien toléré chez les patients avec une toxicité acceptable. Ces résultats préliminaires ont mené à une étude de phase III qui a été publiée en 2014 par Chinot et al (Chinot *et al.*, 2014). La méthode utilisée au cours de cette étude est la suivante : Deux groupes de patients ont été constitués. Le premier groupe (458 patients nouvellement diagnostiqués pour un GBM), a reçu une dose de Bevacizumab de 10 mg/Kg par voie intraveineuse toutes les 2 semaines en association au protocole standard de Stupp (Stupp *et al.*, 2005). A la fin du protocole standard, une dose de 15mg/Kg de Bevacizumab seule a été injectée toutes les 3 semaines, jusqu'à progression de la maladie ou l'apparition d'effets indésirables inacceptables. Le second groupe constitué de 463 patients quant à lui recevait un placebo (à la place du Bevacizumab) suivant les mêmes modalités. Les résultats ont montré une survie sans progression plus longue soit 10,6 mois dans le groupe Bevacizumab contre 6,2 mois dans le groupe placebo. Comme

dans l'étude de phase II menée par Lai (Lai *et al.*, 2011), la survie globale à 1 an est peu améliorée soit 72,4% dans le groupe Bevacizumab contre 66,3% dans le groupe placebo et à 2 ans soit 33,9% dans le groupe Bevacizumab contre 30,1% dans le groupe placebo. Par contre une toxicité de grade 3 se retrouve de manière plus importante dans le groupe Bevacizumab de l'ordre de 66,8% contre 51,3% pour le groupe placebo. En conclusion l'association du Bevacizumab avec le protocole standard de Stupp ne montre pas d'amélioration significative pour la survie des patients atteints de GBM, mais nous montre une amélioration de la durée de vie sans récurrence pouvant être néanmoins associée à une toxicité plus élevée (Chinot *et al.*, 2014).

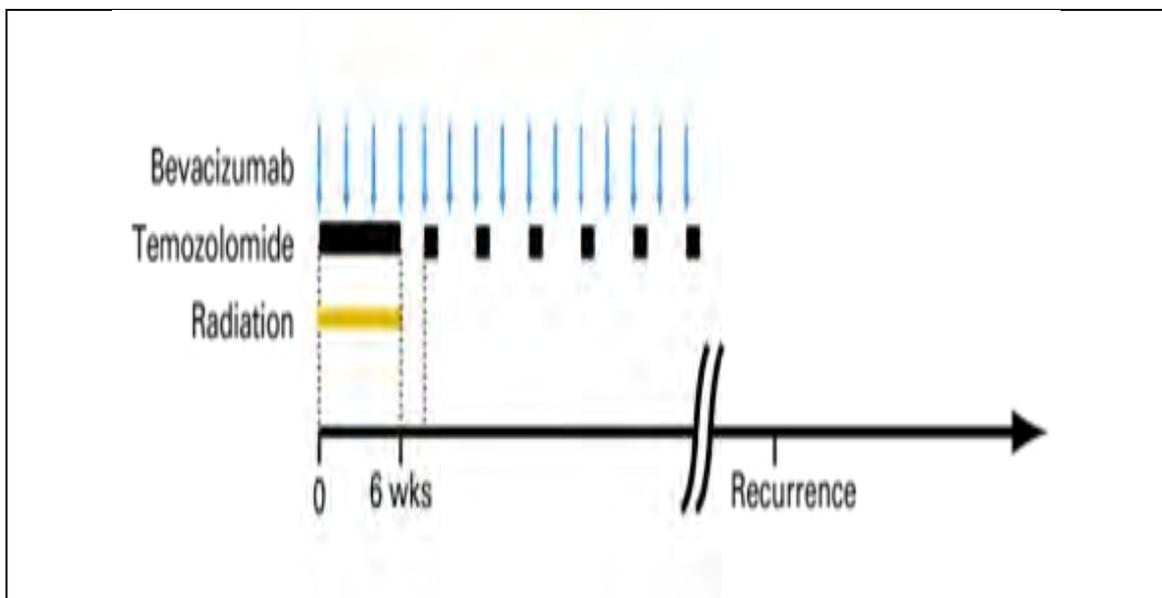


Figure 20 : Protocole de traitement associant le Bevacizumab au protocole Stupp dans le cadre de l'étude de phase II menée par Lai et al (Lai *et al.*, 2011).

III. Le Vandétanib ou Capresla™

Le Vandétanib est un inhibiteur multi-cible : il agit à la fois sur le VEGFR et l'EGFR et présente une activité antitumorale en bloquant l'angiogenèse tumorale et la prolifération cellulaire (**Figure 19**). Des études précliniques montrent que le Vandétanib associé à la radiothérapie inhibe la croissance tumorale de façon dose-dépendante (Winkler *et al.*, 2004) (Ansiaux *et al.*, 2009). Quelques études de phase I ont été mises en place dont une par Drappatz et al (Drappatz *et al.*, 2010). Concernant cette étude, qui inclut 13 patients

nouvellement diagnostiqués pour un GBM, le protocole mis en place était pour 6 patients une dose de 200 mg/jour de Vandétanib associée à la radiothérapie et au TMZ selon le protocole standard. Au bout de 12 semaines de thérapie 3 patients sur 6 ont développé des effets secondaires associés à une dose létale toxique (DLT). Les 7 autres patients quant à eux ont été traités avec une dose plus faible de 100 mg/jour, sans développer de DLT. La dose maximale tolérée a donc été établie à 100 mg/jour. Les résultats de cette étude ont montré une survie globale de 11 mois et une survie sans progression de 8 mois. Une étude de phase II est en cours, dans laquelle les patients sont inclus soit dans le bras Vandétanib + TMZ et radiothérapie soit dans le bras TMZ + radiothérapie.

IV. Le Vatalanib

Le Vatalanib est un antagoniste du récepteur VEGFR (**Figure 19**). Deux études de phase I ont été réalisées: la première, menée par Brandes et al (Brandes *et al.*, 2010) sur 19 patients atteints de GBM, montre une médiane de survie sans progression de 6,8 mois et de survie globale de 1,3 mois. La seconde étude de phase I réalisée sur 19 patients par Gerstner et al (Gerstner *et al.*, 2011), montre une médiane de survie sans progression de 7,2 mois et de 16,2 mois pour la survie globale. Les essais de phase II prévus ont été interrompus en raison d'essais clinique de phase III décevants, réalisé sur des patients atteints d'un cancer colorectal métastasé.

V. Le Sorafenib

Le Sorafenib est également un inhibiteur d'activité tyrosine kinase. Cette molécule agit en bloquant la phosphorylation de plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase comme le VEGFR, PDGFR et c-kit ou en bloquant directement l'activité sérine- thréonine kinase de différentes molécules comme les RAFs (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*). L'inhibition des ces voies de signalisation contribue à réduire l'angiogenèse et active l'apoptose des cellules tumorales in vitro (Siegelin *et al.*, 2010) (Yang *et al.*, 2010) (Carra *et al.*, 2013). Une étude de phase I menée sur 18 patients, dont 11 avaient un GBM nouvellement diagnostiqué et 7 un GBM en récurrence, a été initiée par Den et al (Den *et al.*, 2013). Le protocole établi était le suivant : une dose de 200 mg de Sorafenib deux fois par jour ou de 400 mg deux fois par jour combinée à la radiothérapie et le TMZ montrait une toxicité

hématologique de grade 3 et 4 chez 22% des patients recevant une dose de 200 mg et de 55% chez ceux recevant une dose de 400 mg, nécessitant l'arrêt du traitement. Les doses retenues pour l'étude de phase II ont donc été de 200 mg deux fois par jour combinées à la RT et au TMZ contre une dose de 400 mg deux fois par jour combinée à la RT seule. Les résultats obtenus lors de cette phase I montrent un médiane de survie de 18 mois chez les 11 patients atteints d'un GBM nouvellement diagnostiqué et de 24 mois pour les patients atteints d'un GBM en récurrence. En conclusion, l'étude de phase I réalisée par Den et al (Den *et al.*, 2013) montre que l'association de Sorafenib à une dose de 200 mg combinée avec la RT et le TMZ ou avec une dose de 400 mg combinée avec la RT seule peut être utilisée en toute sécurité en vue d'une étude de phase II.

Une nouvelle étude de phase I réalisée par Hottinger et al (Hottinger *et al.*, 2014) a été publiée en 2014. L'objectif de cette étude était de démontrer la toxicité du Sorafenib en vue de son utilisation en association avec la RT et le TMZ. L'étude comprenait 17 patients nouvellement diagnostiqués pour un GBM. La dose retenue était 200 mg deux fois par jour de Sorafenib combiné à la RT et le TMZ. Sur les 17 patients, 2 patients ont développé une thrombocytopénie, 1 patient souffrait de diarrhées et 1 patient avait une hypercholestérolémie. La survie sans progression était de 7,9 mois avec une survie globale de 17,8 mois. Les auteurs ont conclu que les effets indésirables induits par le Sorafenib étaient importants.

D'autres études seront sûrement nécessaires afin d'envisager une utilisation dans une étude de phase II.

VI. Le Cilengitide

Le Cilengitide est un pentapeptide cyclique de faible poids moléculaire qui inhibe des intégrines bien spécifiques ($\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$) ayant notamment un rôle important dans l'angiogenèse des gliomes. Une étude de phase I/II portant sur 52 patients souffrant d'un GBM nouvellement diagnostiqué a été réalisée par Stupp et al (Stupp *et al.*, 2010). Le protocole était le suivant : association de 500 mg de Cilengitide deux fois par semaine plus RT et TMZ (selon le protocole standard) pendant toute la durée de la chimiothérapie. Les résultats étaient les suivants : la médiane de survie était de 16,1 mois et 6 mois sans

progression. Une autre étude de phase II sur 112 patients atteints de GBM nouvellement diagnostiqués a été réalisée par Nabors et al. (Nabors *et al.*, 2012). Une dose de 500 mg ou de 2000 mg de Cilengitide était administrée deux fois par semaine en association à la RT et le TMZ. La toxicité retrouvée pendant l'utilisation du Cilengitide à la dose de 500 mg et 2000 mg était une toxicité hématologique ou non de grade 3 ou 4. Chez 58% des patients recevant une dose de 500 mg et 34% des patients recevant une dose de 2000 mg, les effets indésirables étaient une toxicité hématologique (Nabors *et al.*, 2012). A la fin des six cycles de chimiothérapie adjuvante de TMZ, le Cilengitide a été administré en monothérapie jusqu'à progression de la tumeur. La médiane de survie était de 19,7 mois avec une tendance plus favorable chez les patients recevant une dose à 2000 mg et une médiane de survie sans progression de 9.9 mois sans différences entre les deux groupes. Ces résultats ont conduit à la réalisation d'un essai clinique de phase III réalisé par Stupp et al (Stupp *et al.*, 2014) sur 545 patients présentant un MGMT méthylé afin d'évaluer l'efficacité et la sécurité du Cilengitide en comparaison avec le traitement standard RT plus TMZ (GBM nouvellement diagnostiqué). Les résultats obtenus lors de cette étude ne montrent pas de différence sur la survie globale entre le groupe Cilengitide et le groupe témoin, qui est de 26,3 mois pour les deux groupes (Stupp *et al.*, 2014). En ce qui concerne la toxicité du Cilengitide les deux groupes ont développé des effets indésirables hématologiques ou non hématologiques de grade 3 ou 4, dans des proportions voisines (Stupp *et al.*, 2014). Les auteurs ont conclu que l'ajout du Cilengitide avec le TMZ plus RT n'améliore pas les résultats cliniques sur la survie des patients. Des résultats similaires peu concluants ont été obtenus chez des patients porteurs d'un MGMT non méthylé (Nabors *et al.*, 2015). Le développement du Cilengitide comme médicament anticancéreux a donc été arrêté (Stupp *et al.*, 2014).

VII. Les inhibiteurs de l'EGFR

La famille des récepteurs à l'EGFR est une cible thérapeutique potentielle intéressante dans le traitement des GBM. L'EGFR est une glycoprotéine transmembranaire et appartient à la superfamille des récepteurs à tyrosine kinase. Elle se compose d'un domaine extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire. La fixation de son ligand sur le domaine extracellulaire induit une cascade de phosphorylations et une succession

d'activations enzymatiques, responsables de la stimulation de la prolifération cellulaire, de processus de survie et de migration (Yarden, 2001). Le récepteur à l'EGFR est fortement exprimé dans beaucoup de tumeurs y compris dans les gliomes (Salomon *et al.*, 1995). Pour 40% des glioblastomes on retrouve une forte amplification et surexpression du gène EGFR (Libermann *et al.*, 1985) (Wong *et al.*, 1987) qui induit la croissance de la tumeur, la migration, l'invasion (Lund-Johansen *et al.*, 1990) ainsi qu'une forte résistance aux rayonnements ionisants (Barker *et al.*, 2001). Ceci a orienté les recherches vers de nouvelles cibles thérapeutiques afin de bloquer les voies de signalisation de l'EGFR avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou d'inhibiteurs d'activité tyrosine kinase.

Deux molécules sont en cours d'évaluation pour le GBM dans des essais clinique de phase I et II : le Gefitinib et l'Erlotinib. Le mécanisme d'action de ces deux molécules est assez similaire. Leur action se fait sur le site de liaison à l'ATP dans la partie intracellulaire du récepteur à l'EGFR. Cette liaison réversible provoque une inhibition de la transduction du signal en aval de la cascade enzymatique (Mendelsohn and Baselga, 2006). Deux études de phase II réalisées par Van den bent et al en 2009 pour l'Erlotinib (van den Bent *et al.*, 2009) et par Rich et al en 2004 (Rich *et al.*, 2004) pour le Gefitinib ont permis d'évaluer la réponse des patients atteints de GBM en récurrence vis-à-vis du traitement en monothérapie. Ces études n'ont pas montré une différence significative dans de la survie globale des patients atteints de GBM par rapport à un traitement standard. Par contre des études précliniques in vitro et in vivo ont permis de démontrer que ces molécules avaient la capacité d'améliorer la radiosensibilité des GBM (Bianco *et al.*, 2002) (Harari and Huang, 2002).

VII.1 L'Erlotinib

Des essais cliniques de phase II ont été réalisés afin de démontrer l'efficacité et la toxicité de l'Erlotinib lors de son association avec le traitement standard proposé par Stupp et al. Ces études ont montré des résultats différents en termes de survie et de toxicité. La première, réalisé par Prados et al (Prados *et al.*, 2009) sur 65 patients atteints de GBM nouvellement diagnostiqués, suivait le protocole suivant : Une dose d'Erlotinib de 100 mg par jour était administrée chez les patients non traités par des antiépileptiques (groupe A)

ou une dose de 200 mg par jour était administré chez les patients recevant un traitement antiépileptique (groupe B) pendant toute la durée de la chimiothérapie suivant le protocole standard de Stupp et al. Deux semaines après la fin de la chimiothérapie le traitement adjuvant par TMZ a été poursuivi et les doses d'Erlotinib ont été augmentées à 150 mg par jour pour le group A et 300 mg par jour pour le groupe B. Les résultats obtenus ont montré une toxicité liée à l'Erlotinib acceptable et tolérable de grade 3 ou 4, de type diarrhée, éruption cutanée, fatigue ainsi qu'une toxicité hématologique (Prados *et al.*, 2009). En terme de survie, les résultats obtenus sont, pour la survie globale, de 19,3 mois et de 8,2 mois pour la survie sans progression (Prados *et al.*, 2009). La seconde étude de phase II réalisé par Brown et al en 2008 (Brown *et al.*, 2008) sur 93 patients sans traitement antiépileptique et nouvellement diagnostiqués pour un GBM, montre des résultats différents en terme de toxicité et de survie. Le protocole était le suivant : L'Erlotinib a été délivré une semaine avant le début du traitement par chimioradiothérapie (protocole Stupp) à une dose de 150 mg par jour. Son administration fut poursuivie à la même dose pendant tout la durée du traitement adjuvant par TMZ jusqu'à progression de la maladie. Les résultats obtenus montrent une toxicité accrue de grade 5 chez deux patients qui ont développé une pneumonie et une infection non liée à une neutropénie (Brown *et al.*, 2008). En terme de survie les résultats sont peu différents des résultats obtenus lors de l'utilisation du protocole standard, avec une survie sans progression de 7,2 mois et une survie globale de 15,3 mois.

En conclusion, suivant les études de phase II réalisées, la toxicité l'Erlotinib n'est pas la même, ainsi que la survie globale des patients qui diffère assez fortement tout en restant assez proche des résultats retrouvés pour le protocole standard. On peut penser que la dose d'Erlotinib délivrée pendant la chimioradiothérapie joue un rôle important en terme de toxicité et donc dans la survie globale des patients. D'autres études seront nécessaires afin de tirer des conclusions pour une éventuelle utilisation en thérapeutique.

VII.2 Le Gefitinib

Les études sur le Gefitinib sont peut nombreuses. Dernièrement une étude de phase I/II à été réalisée afin d'évaluer l'innocuité et son efficacité par Chakravarti et al (Chakravarti *et al.*, 2013). L'étude de phase I comprenait 31 patients dont 18 patients sous traitement

antiépileptique (groupe A) et 13 patients sans traitement antiépileptique (groupe B). Le groupe A a reçu une dose de 750 mg et le groupe B une dose de 500 mg en association avec la RT à une dose de 60 Gy en 30 fraction de 2 Gy. Puis le Gefitinib a été administré en monothérapie pendant 18 mois ou jusqu'à progression de la maladie ou jusqu'à que la toxicité soit inacceptable. Les doses maximales tolérées étaient 750 mg pour le groupe A et 500 mg pour le groupe B avec une toxicité de grade 3 ou 4 non hématologique ou hématologique (Chakravarti *et al.*, 2013). La phase II réalisée par Chakravarti et al (Chakravarti *et al.*, 2013) sur 147 patients sans traitement antiépileptique nouvellement diagnostiqués d'un GBM, a suivi le même protocole avec l'utilisation d'une unique dose de 500 mg de Gefitinib. La toxicité observée était la même que durant l'essai clinique de phase I. Les résultats obtenus concernant la survie sans progression était de 4,9 mois et la survie globale de 11,5 mois, contre 11 mois lors de l'utilisation d'un traitement par RT seule. En conclusion, l'ajout du Gefitinib avec la RT est bien toléré, mais n'augmente pas de manière significative la survie globale des patients. D'autres études doivent être envisagées, peut-être avec l'ajout de TMZ, afin de voir les effets sur la survie globale.

VIII. Les inhibiteurs de la voie mTOR

mTOR (*mammalian target of rapamycin*) est une serine-thréonine kinase. C'est une protéine qui rentre dans la constitution de 2 complexes différents (mTORC1 et mTORC2). L'activation de mTOR se fait par l'activation de la cascade enzymatique PI3K/Akt. Cette activation provoque une inactivation du facteur d'initiation de la traduction 4E-BP (4E-binding protein) et l'activation de S6K1 (protéine kinase ribosomale) par des phosphorylations, ce qui favorise la prolifération et la croissance cellulaire (**Figure 21**) (Fingar *et al.*, 2002). Les inhibiteurs de la mTOR qui sont utilisés actuellement sont l'Évérolimus et le Temsirolimus. Ces deux médicaments sont déjà utilisés dans le traitement d'autres cancers, dont le cancer du rein ou le cancer du sein avancé.

Deux essais de phase I ont été réalisés afin d'évaluer l'innocuité et l'efficacité des inhibiteurs de la mTOR dans le traitement des GBM.

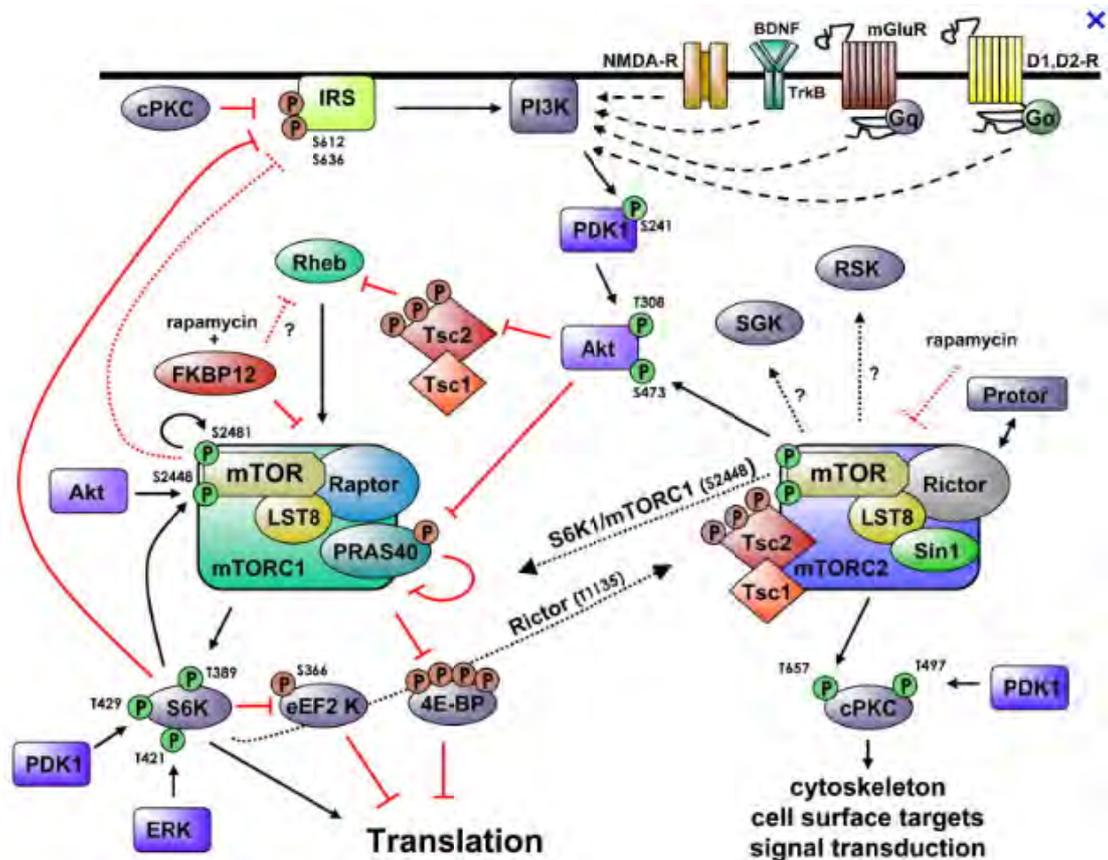


Figure 21 : Voies de signalisation de la mTOR avec phosphorylation de S6K et 4E-BP

VIII.1 Le Temsirolimus

Le premier essai clinique réalisé par Sarkaria et al (Sarkaria *et al.*, 2010) pour le Temsirolimus était le suivant : Au total, 25 patients nouvellement diagnostiqués d'un GBM ont été inclus dans l'essai clinique. Dans un premier temps 12 patients ont reçu une dose de 25 mg une fois par semaine en IV, une semaine avant le début du protocole standard de Stupp puis une fois par semaine pendant toute la durée du traitement. La dose de Temsirolimus a été augmentée à une dose finale de 75 mg/semaine. Au niveau de la toxicité, 6 patients ont développé une infection et trois sont décédés. La dose létale était de 75 mg/semaine au cours du traitement adjuvant par TMZ.

Dans un second temps, 13 patients supplémentaires ont reçu une dose de 25 mg/semaine augmentée à 75 mg/semaine, une semaine avant et pendant le traitement par RT et TMZ. L'administration de Temsirolimus a cette fois-ci été stoppée au début du traitement adjuvant par TMZ. Deux patients sont décédés au cours du traitement. La dose recommandée a été fixée à 50 mg/semaine. Au niveau de la toxicité, une toxicité de grade 3 et 4 hématologique et non hématologique est survenue (Sarkaria *et al.*, 2010). La médiane de survie observée chez les 12 premiers patients était de 13,3 mois et pour les 13 autres patients de 10,2 mois (Sarkaria *et al.*, 2010).

VIII.2 L'Évérolimus

La deuxième étude de phase I réalisée par Sarkaria et al (Sarkaria *et al.*, 2011) sur 18 patients nouvellement diagnostiqués pour un GBM était la suivante : L'Évérolimus a été administré par voie orale une fois par semaine à la dose de 30 mg pour arriver à une dose de 70 mg/semaine. La première dose a été administrée une semaine avant le début du traitement standard par RT et TMZ puis pendant toute la durée du traitement adjuvant par TMZ jusqu'à 6 mois ou jusqu'à progression de la maladie ou une toxicité inacceptable. Aucun patient n'a dû interrompre le traitement et la toxicité est restée acceptable avec une toxicité de grade 3 et 4 non hématologique et hématologique. La dose recommandée est de 70 mg par semaine d'Évérolimus. Les résultats obtenus ont montré une stabilité de la maladie chez 15 patients, 1 patient était en régression, 1 patient était en progression et 1 patient avait une réponse partielle (Sarkaria *et al.*, 2011).

b) Conclusion

Au vu du petit nombre de patients dans ces deux essais, aucune conclusion ne peut être faite à ce jour. D'autres études de phase II doivent être réalisées.

XI. Conclusion

Le travail effectué par les équipes de recherche dans la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques et la prise en charge des GBM, ne semble pas montrer pour le moment de réelle avancée. En terme de survie globale, les résultats obtenus sont modestes, on retrouve en effet peu de différences entre le protocole standard proposé par Stupp et al en 2005 et les nouveaux essais cliniques de phase II et III. Ces résultats modestes peuvent s'expliquer en partie par une mauvaise compréhension des mécanismes moléculaires de résistance au sein des différentes sous-populations cellulaires présentes au niveau de la tumeur. En effet les molécules utilisées ne ciblent la plupart du temps qu'une seule voie de signalisation moléculaire, ce qui pourrait engendrer des phénomènes de résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie. On pourrait ainsi poser l'hypothèse que les cellules cancéreuses de GBM utilisent d'autres voies de signalisation afin de maintenir leur survie et d'accroître leur nombre. De plus, ces thérapies pourraient ne cibler qu'une partie des cellules de la tumeur, au détriment de certaines sous-populations plus résistantes, comme les cellules cancéreuses dites « souches » (CSC). Une meilleure compréhension des voies de signalisation et des mécanismes de résistance, en particulier dans ces sous-populations, permettrait très probablement de mettre en œuvre des thérapies ciblées innovantes visant à la fois les cellules cancéreuses, constituant l'essentiel de la tumeur, ainsi que les cellules souches de GBM, connues pour favoriser la récurrence de ces tumeurs cérébrales très agressives (Cheng *et al.*, 2010).

III. Place de la radiothérapie dans le traitement des GBM et ses effets vis-à-vis des mécanismes de résistance cellulaire.

1) Place de la radiothérapie dans le traitement des gliomes

La radiothérapie, associée à la chimiothérapie, reste aujourd'hui le traitement de première intention en complément de la chirurgie, quand celle-ci est possible. Pourtant les GBM restent des tumeurs très radiorésistantes. Cette radiorésistance peut être expliquée par différents mécanismes cellulaires. On retrouve notamment des modifications des mécanismes de réparation de l'ADN et des altérations des voies de mort cellulaire par apoptose, en particulier les processus de survie dépendants de la voie de signalisation d'EGFR (Milano and Magne, 2003) (Barker *et al.*, 2001). La radiosensibilité dépend aussi particulièrement du cycle cellulaire : on retrouve en effet une plus grande radiosensibilité pour les cellules en phase G2/M (Cadirola and Dutrillaux, 1984). Malgré des résultats relativement modérés sur la médiane de survie, son association avec la chimiothérapie (Témozolomide) a néanmoins permis d'augmenter sensiblement la survie globale des patients souffrant de gliomes. La radiothérapie reste donc à l'heure actuelle un traitement indispensable dans le traitement des GBM. Cependant, malgré ce traitement, la récurrence survient quasi systématiquement, très majoritairement au niveau du site initial où la tumeur a pris naissance et dans 10% des cas à distance (mais toujours au niveau cérébral). Parmi les hypothèses pouvant expliquer ces récurrences, il a été montré que les GBM sont des tumeurs très hétérogènes. Il existe en effet au sein des GBM différentes sous-populations cellulaires, dont une sous-population de cellules cancéreuses aux propriétés souches (*GBM Stem-like Cell*, GSC), possédant une très forte radiorésistance et chimiorésistance et très tumorigènes (Cheng *et al.*, 2010). Le caractère souche de ces cellules pourrait ainsi être fortement associé à la récurrence quasi-systématique des GBM. Différentes équipes de recherche travaillent actuellement sur le fait que la radiothérapie pourrait traiter efficacement la majeure partie des cellules au sein de la tumeur tout en étant capable au contraire de

potentialiser les mécanismes de résistance et de récurrence en favorisant le développement et la survie de cette population de GSC au sein de la tumeur. C'est ce que nous allons voir dans la partie suivante à travers une étude réalisée lors de mon stage de M1 (2010) avec l'équipe de recherche des Pr. Cohen-Jonathan Moyal et Dr. Toulas dans l'équipe « Radiorésistance tumorale, des voies de signalisation à l'essai clinique » de l'INSERM UMR 1037 du CRCT (Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse) (ex unité Inserm U563). Ces expérimentations préliminaires ont abouti 4 ans après à la publication d'un article scientifique dont je suis co-auteur et figurant à la suite de ce rapport de M1..

2) Etude des effets de la radiothérapie sur les cellules de GBM vis-à-vis de leur état de différenciation.

a) Introduction

L'étiologie des GBM est mal connue et différentes hypothèses ont été proposées. Celle de l'origine génétique consiste notamment en l'implication possible de mutations des gènes du système de réparation MMR (*MisMatch Repair*) qui augmenterait le risque tumeur cérébrale (Quigley *et al.*, 2007). Cependant, différentes études et observations, notamment cette capacité à récidiver à distance, suggèrent la présence, au sein de la tumeur, de cellules tumorales encore plus résistantes à la radiothérapie et très tumorigènes, capables de résister au traitement radio-chimiothérapeutique puis de migrer en dehors de la zone initiale. Depuis quelques années, de nombreuses études montrent en effet qu'il existe au sein des GBM une population de cellules ayant des caractères souches, les GSC, localisées au niveau de niches périvasculaires subventriculaires (Altaner, 2008; Gilbertson and Rich, 2007). Ces GSC peuvent se caractériser par l'expression du marqueur souche CD 133, ainsi que par d'autres caractéristiques propres aux cellules souches de GBM : formation de neurosphères, auto-renouvellement, multipotence et potentiel tumorigénique accru (Rich, 2009; Singh *et al.*, 2004b). Ces GSC présentent notamment une plus forte activité des systèmes de réparation de l'ADN (Bao *et al.*, 2006a), et une expression augmentée d'ABC

transporteurs entraînant un efflux important de molécules thérapeutiques (Hirschmann-Jax *et al.*, 2004), ce qui leur permettrait d'être fortement résistantes aux différents traitements. Ainsi, grâce à leur chimio et radiorésistance et à leur fort potentiel tumorigène, les GSC pourraient être les acteurs principaux des récives après traitement.

Par ailleurs, il a été récemment postulé que les traitements conventionnels radio- et chimiothérapeutiques, déjà impuissants à cibler ces GSC, pourraient même augmenter le nombre de ces cellules souches cancéreuses, conduisant ainsi à un risque accru de récive (Charles and Holland, 2009). Il a également été montré que l'hypoxie pouvait induire la rétro-différenciation de cellules tumorales, notamment dans le cancer du sein (Helczynska *et al.*, 2003), les neuroblastomes (Jogi *et al.*, 2003) et récemment dans les GBM, via l'activation des facteurs de transcription HIFs (*Hypoxia Inducible Factors*) (Heddleston *et al.*, 2009). De plus, il a été démontré que l'irradiation des cellules de GBM entraînait l'accumulation de HIF1 α (Tabatabai *et al.*, 2006), favorisant probablement un état pseudohypoxique transitoire et la stimulation des voies de signalisation liées à l'hypoxie. L'équipe dans laquelle j'ai réalisé ce travail a donc émis l'hypothèse que différents signaux de stress induits dans les cellules de GBM lors de leur irradiation pouvaient entraîner, au moins en partie, leur rétro-différenciation vers un état de cellules souches cancéreuses, provoquant alors une augmentation des GSC dans la tumeur.

b) Matériels et méthodes

i. Culture cellulaire sous PSM II

i.1 Culture des cellules souches de glioblastome

Les GSC sont cultivées sous forme de neurosphères dans une association de GSC et de cellules dites « non souches » en suspension. Leur croissance se fait dans un milieu spécifique, le milieu SCM qui est une association de DMEM F12 (milieu de base pour les cellules neuronales), d'Hepes à 30 mmol/L (tampon utilisé pour maintenir le pH à 7.4) ainsi que d'un additif B27 (Invitrogen) dilué au 1/50^{ème}, une association de facteurs de croissance utilisée pour la croissance des cellules souches neuronales. A ce milieu sont ajoutés deux facteurs de croissance spécifiques pour garder le caractère souche des

cellules : l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et le FGF (*Fibroblast Growth Factor*) à 15 ng/mL final. Les cellules sont maintenues dans un incubateur en atmosphère humide à 37°C avec 5% de CO₂ pour permettre leur croissance.

i.2 Culture des cellules différenciées de GBM

La culture des cellules différenciées se fait à partir des neurosphères qui ont été au préalable dissociées. Leur dissociation se fait mécaniquement à l'aide d'une micropipette (type P1000) par aspiration et refoulement du milieu. Il faut au préalable centrifuger les neurosphères 5 min à 1000 rpm à 4°C afin de séparer les cellules du milieu SCM. Le culot est ensuite remis en suspension dans un 1 mL de DMEM F12 avant d'être ensemencé dans une flasque T25 ou T80 avec du milieu DMEM F12 contenant 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF). L'adhérence, la différenciation et la croissance de ces cellules se fait à 37°C avec 5% de CO₂.

i.3 Procédé de rétro-différenciation « aidée »

Les cellules de GBM différenciées pendant au moins 10 jours de culture en milieu SVF sont lavées préalablement avec du PBS 1x stérile (*Phosphate Buffered Saline*) après aspiration du milieu puis mises en présence pendant 8 jours supplémentaires de milieu SCM identique au milieu de culture des GSC. Leur culture se déroule dans l'incubateur à 37°C avec 5% de CO₂.

i.4 Passage des cellules

Le passage ou repiquage des cellules permet de diviser une population de cellules (neurosphères ou cellules différenciées de GBM) arrivées à confluence ou trop denses. Dans le cas des neurosphères, il faut au préalable dissocier mécaniquement les neurosphères dans 1 mL de milieu DMEM F12. Celles-ci sont ensuite repiquées au 1/3 dans une flasque T80 et complétées à 10 mL de milieu SCM. Le repiquage des cellules différenciées se fait par aspiration du milieu, rinçage par 3 mL de PBS et décollement du tapis cellulaire par 2 mL d'une solution de trypsine. Après 5 min d'incubation à 37°C dans l'incubateur, les cellules sont reprises dans 7 mL de milieu SVF pour être repiquées au 1/3 dans une nouvelle flasque T80 puis complétées à 10 mL de milieu SVF.

ii. Irradiation

L'irradiation des cellules se fait à l'aide d'un irradiateur pour cellules et petits animaux (Gamma-cell Nordion 40) à une dose de 4 Grays (dose établie pour notre protocole), à température ambiante. Les cellules irradiées sont ensuite remises en culture dans l'incubateur.

iii. Cytométrie de flux

iii.1 Principe de la cytométrie de flux

Le cytomètre de flux (FACScalibur, Becton Dickinson, San José, Etats-Unis) permet d'analyser individuellement chaque cellule ou noyau circulant dans un flux liquide et passant devant le faisceau d'un laser émettant à 488 nm (**Figure 22A**). En utilisant des phénomènes de diffraction, l'appareil peut caractériser les cellules selon leur taille (FSC : diffraction à grand angle), leur granulométrie (SSC : diffraction à petit angle) (**Figure 22B**) et leur fluorescence (FL1, FL2 et FL3). La fluorescence émise par les cellules est filtrée puis collectée par trois photomultiplicateurs capables de détecter trois longueurs d'ondes d'émission différentes (FL1 : 530 ± 15 nm, FL2 : 585 ± 20 nm et FL3 : >650 nm). Les signaux collectés sont ensuite amplifiés, numérisés, traités et mis en mémoire (Logiciel CellQuest, Becton Dickinson).

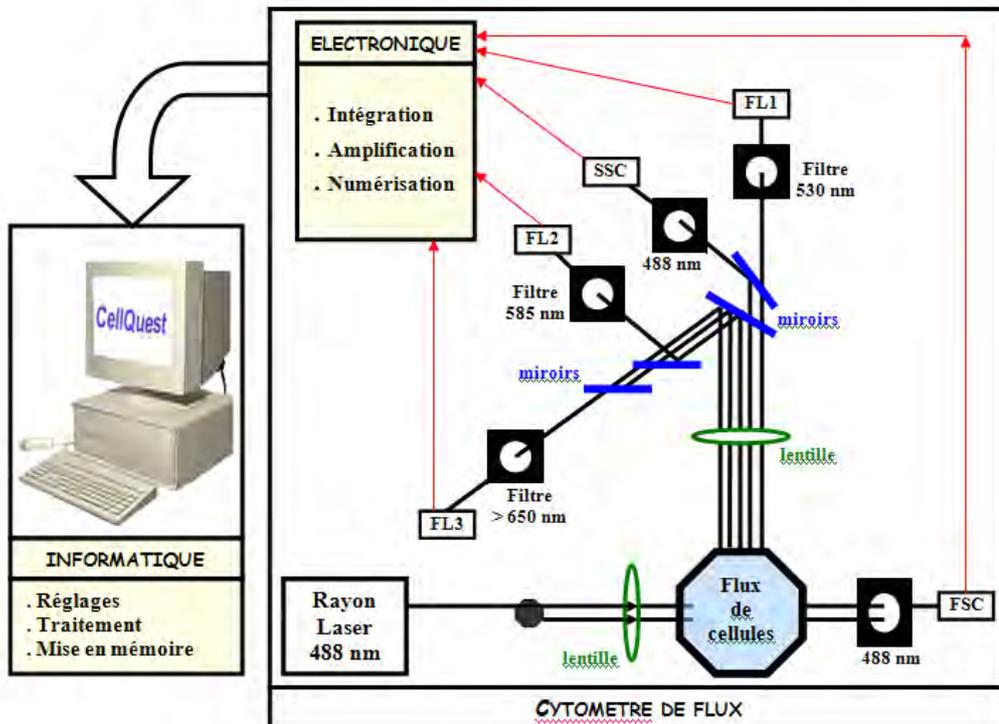


Figure 22A : Principe du FACS. Un flux de liquide contenant les cellules défile devant un laser. Les signaux lumineux émis sont séparés par des filtres et collectés par des photomultiplicateurs (PMT) qui détectent trois longueurs d'ondes d'émission différentes (FL1 530 nm ; FL2 585 nm et FL3 >650 nm). Les PMT convertissent les signaux lumineux (photon) en signaux électriques (volts), qui sont ensuite convertis en signaux numériques. Les données numériques collectées sont alors traitées et stockées. .

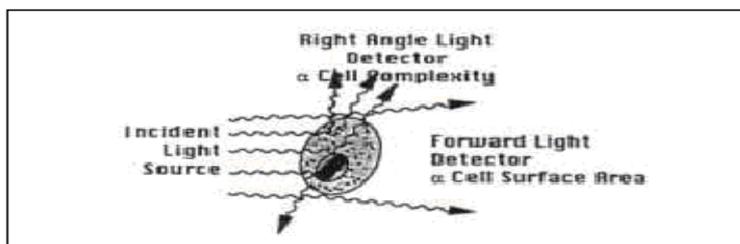


Figure 22B : les cellules peuvent être caractérisées par le FACS, grâce à des phénomènes de diffusion lumineuse. La lumière diffractée dans l'axe (FCS) donne des informations sur la taille des cellules. Quand à la lumière diffractée à 90° (SSC) elle permet de connaître la granulométrie des cellules, information récupérées par des photodétecteurs (Lecureur-Rolland, 2009).

iii.2 Analyse morphologique de la population de GSC par cytométrie

Pour l'analyse des GSC, nous avons appliqué les techniques cytométriques d'identification des populations souches et non-souches décrites par Clément et al. (Clement *et al.*, 2010) (Mlynarik *et al.*, 2012). En fonction de la FCS et de la SSC, on peut déterminer deux populations de cellules, nommées FL0 et FL1, à partir de neurosphères fraîchement dissociées et resuspendues dans 500 μ L de PBS (**Figure 23**). La population FL1, une fois triée, présente les caractéristiques propres aux cellules souches de GBM (auto-renouvellement (clonogénicité), formation de neurosphères secondaires, pluripotence et tumorigénèse chez la souris). Cette population peut comporter une proportion de cellules autofluorescentes en FL1-H. Au contraire, la population FL0, qui n'est pas autofluorescente, ne possède pas l'ensemble de ces caractéristiques phénotypiques et présente donc un état plus différencié dit « non souche » (Clement *et al.*, 2010). Les cellules différenciées (adhérentes) de GBM sont analysées de la même façon.

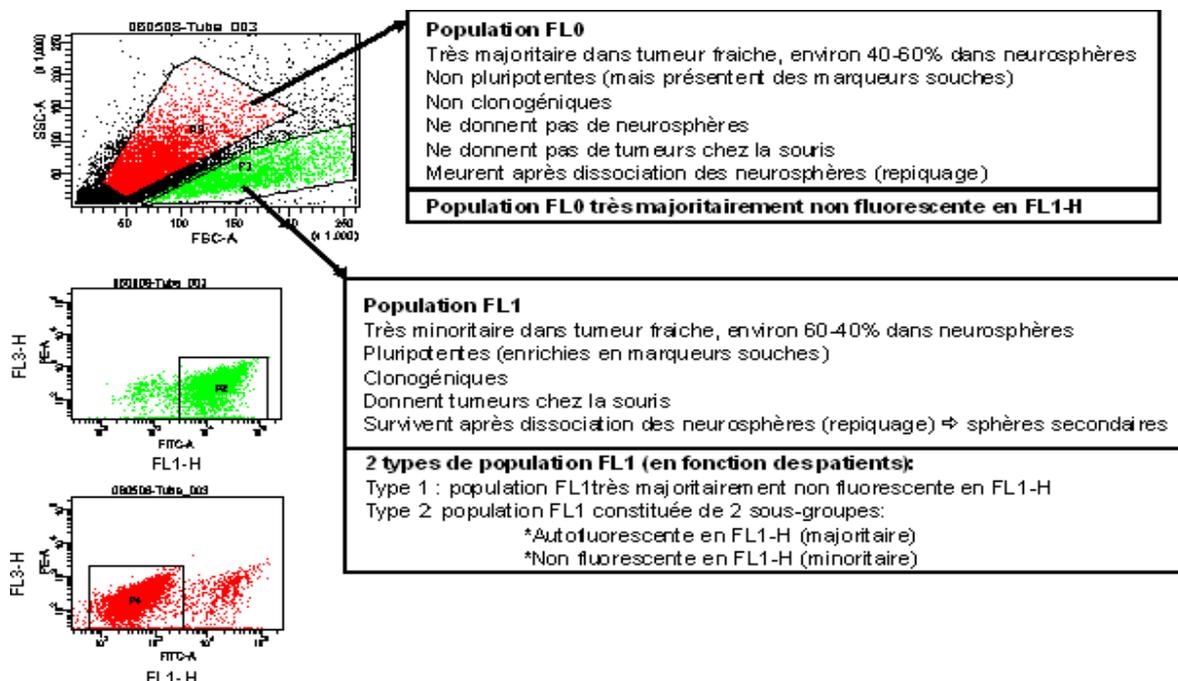


Figure 23 : Caractérisation en cytométrie des populations FL1 (souches) et FL0 (différenciées) dans les neurosphères dissociées, selon (Clement *et al.*, 2010).

iii.3 Analyse de la mort cellulaire par cytométrie

L'analyse de la nécrose se fait en même temps que l'analyse morphologique décrite en iii.2. Les cellules de neurosphères dissociées mécaniquement ou les cellules différenciées après trypsination sont centrifugées à 1000 rpm pendant 5min à 4°C puis reprises dans 500 µL de PBS 1x. Une solution de Bleu Trypan (Sigma, St Quentin, France) est ajoutée au 1/250. Cette sonde fluorescente pénètre instantanément dans les cellules dont la membrane plasmique est lésée et permet donc la mesure de la nécrose cellulaire. Les cellules perméables au Bleu Trypan sont détectées par cytométrie en FL3-H. 15 000 événements sont analysés au minimum pour déterminer le pourcentage de cellules nécrotiques dans les populations FL1 et FL0.

Pour la mesure de l'apoptose, nous avons analysé le pourcentage de cellules en sub-G1, c'est-à-dire présentant une fragmentation de leur ADN caractéristique du processus apoptotique. Pour cela, les cellules dissociées ont été reprises dans 150 µL de PBS puis complétées par le même volume d'une solution de lyse (PBS 1x, 0.1% citrate de sodium et 0.1% Triton X-100) contenant un agent fluorescent intercalant de l'ADN, l'iodure de propidium (PI, Sigma), à une concentration finale de 20 µg/ml. La suspension cellulaire est incubée 10 min à température ambiante, à l'abri de la lumière. 100 µL de PBS est ajouté pour obtenir un volume final de 400 µL. Les cellules en sub-G1 sont alors analysées en cytométrie par la mesure de la fluorescence du PI en FL2-H. 15 000 événements sont analysés au minimum pour déterminer le pourcentage de cellules apoptotiques dans les populations FL1 et FL0.

iv. Extraction des ARN messagers

La purification des ARN messagers (ARNm) a été réalisée à l'aide du kit RNeasy mini de chez Qiagen. Le principe repose sur l'utilisation d'une colonne de silice qui permet de retenir au maximum 100 µg d'ARN d'une longueur supérieure à 200 bases. Une étape de centrifugation peut être réalisée afin d'accélérer la séparation des ARN. L'utilisation de silice permet de retenir les ARNm sans retenir les ARN de transfert ni les ARN ribosomiaux, car inférieurs à 200 bases. Un tampon de lyse spécifique permet de lyser les membranes cellulaires et de désactiver les RNases. L'éthanol améliore l'hybridation

de l'ARN à la silice et donc la purification. La récupération ultérieure des ARNm se fait par ajout d'eau sans RNases qui va rompre les liaisons ioniques des ARNm avec la silice. Les ARNm sont ensuite dosés par spectrophotométrie UV au moyen d'un Nanodrop (Thermo Scientific).

v. Revers Transcription-PCR (RT-PCR)

La RT-PCR permet de transformer l'ARN extrait en ADNc. Nous avons utilisé pour cela le kit *iScript cDNA synthesis* (Bio-Rad). L'étape de transcription va se faire grâce à une enzyme, la *reverse transcriptase*, ajoutée à une solution spécifique (Mix 5X) fournie dans le kit. Cette solution contient notamment les nucléotides et amorces nécessaires pour former l'ADNc. 500 ng d'ARNm, préalablement chauffés à 65°C, ont donc été repris dans 15µL d'eau, puis complétés par 4µL de Mix 5X et 1 µL d'enzyme. La RT-PCR, réalisée sur un thermocycleur, se compose d'un cycle de 40 min : 5 min à 25°C, 30min à 42°C correspondant à l'étape de transcription inverse, et 5min à 85°C pour inactiver l'enzyme. L'ADNc obtenu est ensuite conservé à -80°C.

vi. PCR quantitative (PCRq)

La PCR quantitative permet d'amplifier une séquence d'ADN connue et de quantifier l'ADN de façon absolue, après établissement d'un étalonnage ou de façon relative par rapport à un gène de référence. Elle est réalisée dans un thermocycleur Icyler (Bio-Rad) avec le kit Master SYBRgreen qPCR (Bio-Rad). On mélange 5 µL d'ADNc (contenant 50 ng équivalent RT) à un mélange de 20 µL de SYBRgreen, d'amorce sens, anti-sens et eau. Un témoin est réalisé à partir d'eau (sans ADNc). Le mélange est centrifugé 1 min à 1200 rpm puis réaction de PCRq La quantité de transcrits est calculée par rapport à la quantité de transcrit d'un gène de référence. Le choix du gène de référence variant le moins possible dans les conditions de traitement a été préalablement effectué à l'aide du logiciel Genorm (*Center for Medical Genetics*) qui calcule une moyenne géométrique donnant une valeur M. Cette valeur représente la variation d'expression du gène de référence entre les différentes conditions. Cette différence doit être inférieure à 0,5 pour valider le gène. Les différences d'expression relative des différents gènes d'intérêt par

rapport à ce gène de référence sont ensuite mesurées à l'aide du logiciel Genex (Bio-Rad). Le gène *β2 microglobuline* a ainsi été sélectionné comme gène de référence dans notre étude. Les amorces sens et anti-sens des marqueurs CD133 et GFAP sont indiquées dans le tableau III.

	Séquences des amorces de PCRq (Tableau III)
CD133	Sens: 5' GCATTGGCATCTTCTATGGTT 3' Rev: 5' CGCCTTGTCTTGGTAGTGT 3'
GFAP	Sens: 5' ACATCGAGATCGCCACCTAC 3' Rev: 5' ATCTCCACGGTCTTCACCAC 3'

c) Résultats

i. Protocole de traitement des cellules de GBM

Pour le traitement des cellules de GBM, 3 protocoles ont été mis en place afin d'évaluer l'influence de l'irradiation sur l'état plus ou moins différencié des cellules de GBM. Pour chaque protocole, des contrôles non irradiés ont été réalisés.

Protocole A: Irradiation des neurosphères à une dose de 4Gy, suivie de la dissociation mécanique des neurosphères précédant leur différenciation en milieu SVF (**Figure 24 A**).

Protocole B: Dissociation des neurosphères mécaniquement, suivie de l'irradiation des cellules à une dose de 4Gy, puis de leur différenciation en milieu SVF (**Figure 24 B**).

Protocole C: Dissociation des neurosphères mécaniquement, suivie de la différenciation en milieu SVF des cellules obtenues. L'irradiation des cellules différenciées est alors effectuée après 20h d'adhérence à une dose de 4Gy (**Figure 24 C**).

Pour chacun des 3 protocoles, les neurosphères dissociées à J0 ont été transférées dans 3 flasques T25, en milieu SVF pendant 10 jours pour permettre leur différenciation complète. A J10, la première flasque a été utilisée pour contrôler la morphologie (par microscopie) et réaliser les études de caractérisation par cytométrie et PCRq. Les 2 autres flasques ont ensuite été utilisées pour étudier le processus « aidé » de rétro-différenciation dans ces cellules irradiées et différenciées. Une des deux flasques est ainsi gardée en milieu SVF (comme témoin) tandis que la deuxième est placée en

milieu SCM pendant 8 jours. A J18, les cultures sont arrêtées, et les études morphologique et phénotypique par cytométrie et PCRq ont été réalisées, comme indiqué à la **Figure 24**.

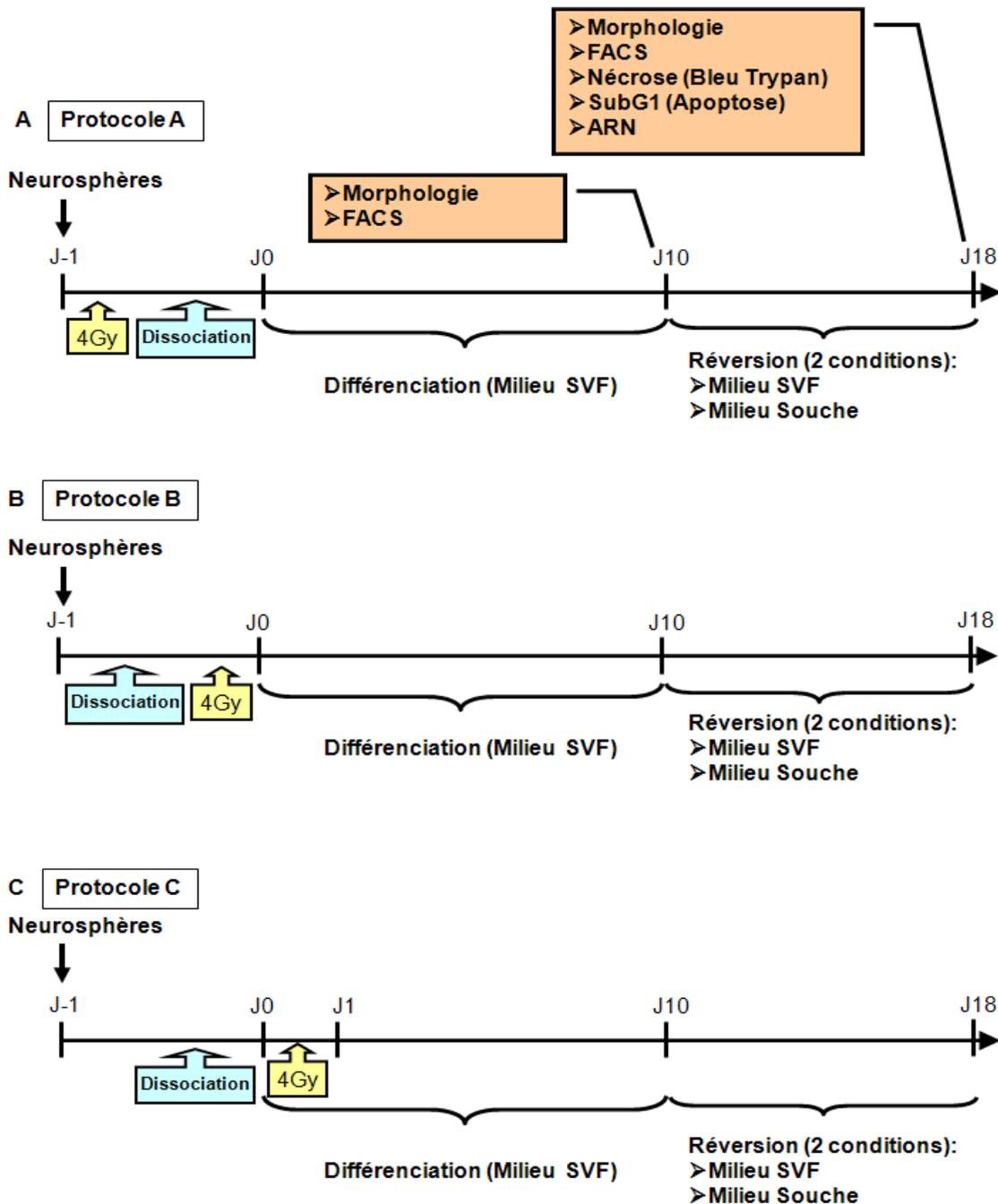


Figure 24 : Protocoles A, B et C utilisés dans le traitement des cellules de GBM

ii. Caractérisation des cellules de neurosphères et des cellules différenciées de GBM

Des neurosphères isolées à partir du GBM du patient A1 sont cultivées en routine au laboratoire. L'étude de la morphologie cellulaire, réalisée à l'aide d'un microscope optique (grossissement 10x), permet de montrer que les neurosphères, en suspension, sont complètement différenciées en cellules adhérentes de GBM après 10 jours de culture en milieu SVF (**figure 25 A**). Les cellules adhérentes obtenues ont des morphologies assez hétérogènes. D'après la littérature, les GSC, pluripotentes, peuvent en effet se différencier dans trois lignées adhérentes différentes : astrocytaire, neuronale et oligodendrocytaire (Piccirillo *et al.*, 2006). Cette capacité de pluripotence n'a pour le moment pas été étudiée.

L'étude des neurosphères et des cellules différenciées au FACS permet de confirmer l'existence de 2 types de populations (**figure 25 B**). Dans la projection SSC/FSC une population de cellules se distingue nettement dans la région R1. En comparaison avec les expériences menées par Clément *et al.* (Clement *et al.*, 2010), la population mise en évidence correspond au type FL1 composée de GSC. Après différenciation des cellules de neurosphères dissociées en milieu SVF, une nouvelle population de cellules devient très majoritaire (région R2). Elle correspond au type FL0 et se compose des cellules de GBM différenciées (Clement *et al.*, 2010). Les neurosphères sont constituées majoritairement de GSC (population FL1) qui représente 45% des cellules contre 10% de FL0 (**figure 25 B**). Après 10 jours en milieu SVF, les cellules s'orientent vers la différenciation et la population FL0 devient majoritaire avec 40% de FL0 contre 10% de FL1 (**figure 25 B**). Ces résultats confirment les résultats des études de morphologie en microscopie optique.

Afin d'appuyer les résultats obtenus au FACS, l'expression de différents marqueurs a été explorée par PCRq. Le premier marqueur étudié est CD133, une glycoprotéine transmembranaire, dont l'expression permet de définir une population de cellules souches tumorales dans les GBM (Singh *et al.*, 2004b). Le deuxième marqueur est la GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), une protéine du cytosquelette des cellules de GBM différenciées dans la voie astrocytaire (Piccirillo *et al.*, 2006). Les neurosphères

expriment 7 fois plus CD133 que les cellules différenciées à J18 (**Figure 25 C**), tandis que les cellules différenciées expriment 6 fois plus la GFAP que les neurosphères. Au final, l'expression de ces 2 marqueurs permet de caractériser de façon adéquate l'état plus ou moins différencié des cellules de GBM dans cette étude.

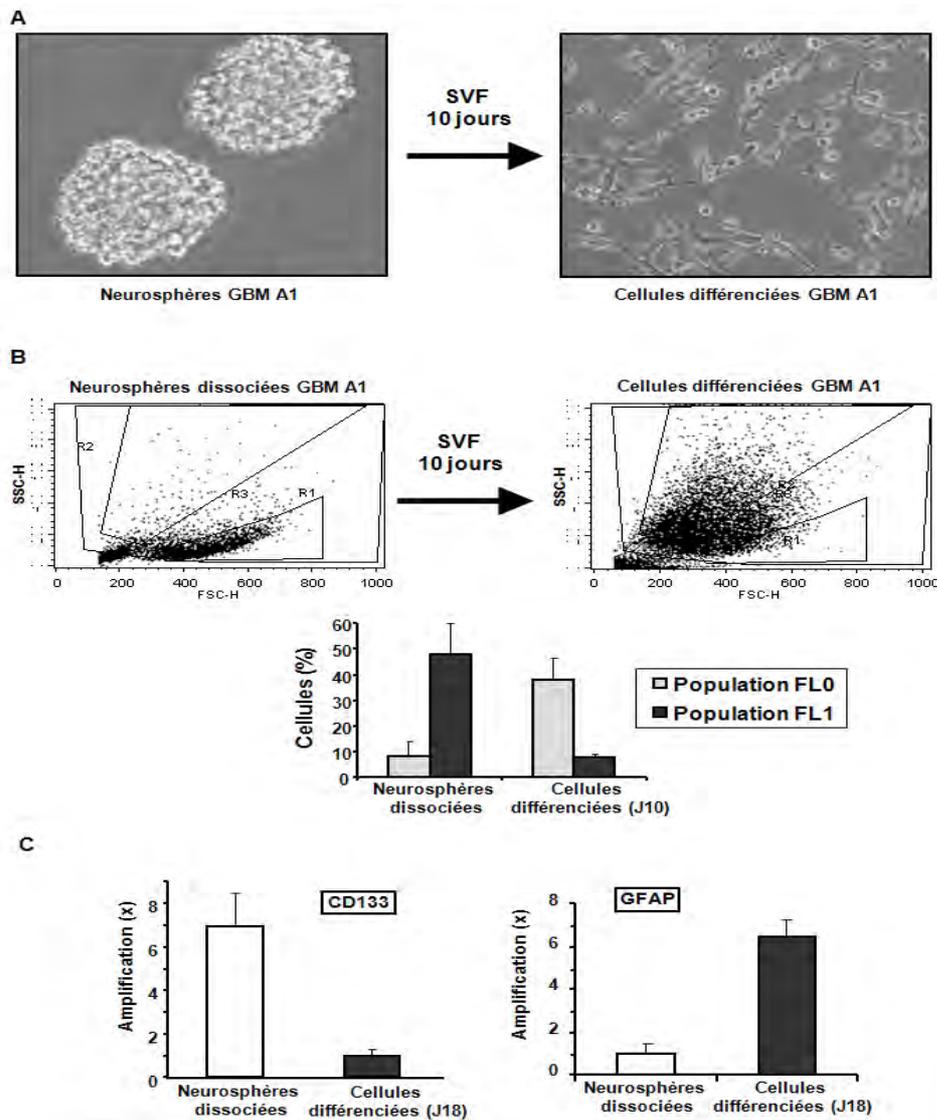


Figure 25 : Caractérisation des cellules de neurosphères et des cellules différenciées de GBM. Ces cellules ont été observées en microscopie optique (A) puis caractérisées, après dissociation, en cytométrie de flux (B). Les cellules analysées par cette technique ont été quantifiées selon leur appartenance à la population FL1 (GSC) ou à la population FL0 (cellules non souches). (C) Les ARNm ont été extraits à partir de neurosphères et de cellules différenciées. Après RT-PCR, l'expression relative des marqueurs CD133 (marqueur souche) et GFAP (marqueur non souche) a été étudiée par PCRq.

iii. Effets des rayonnements ionisants sur l'état de différenciation des cellules différenciées des GBM

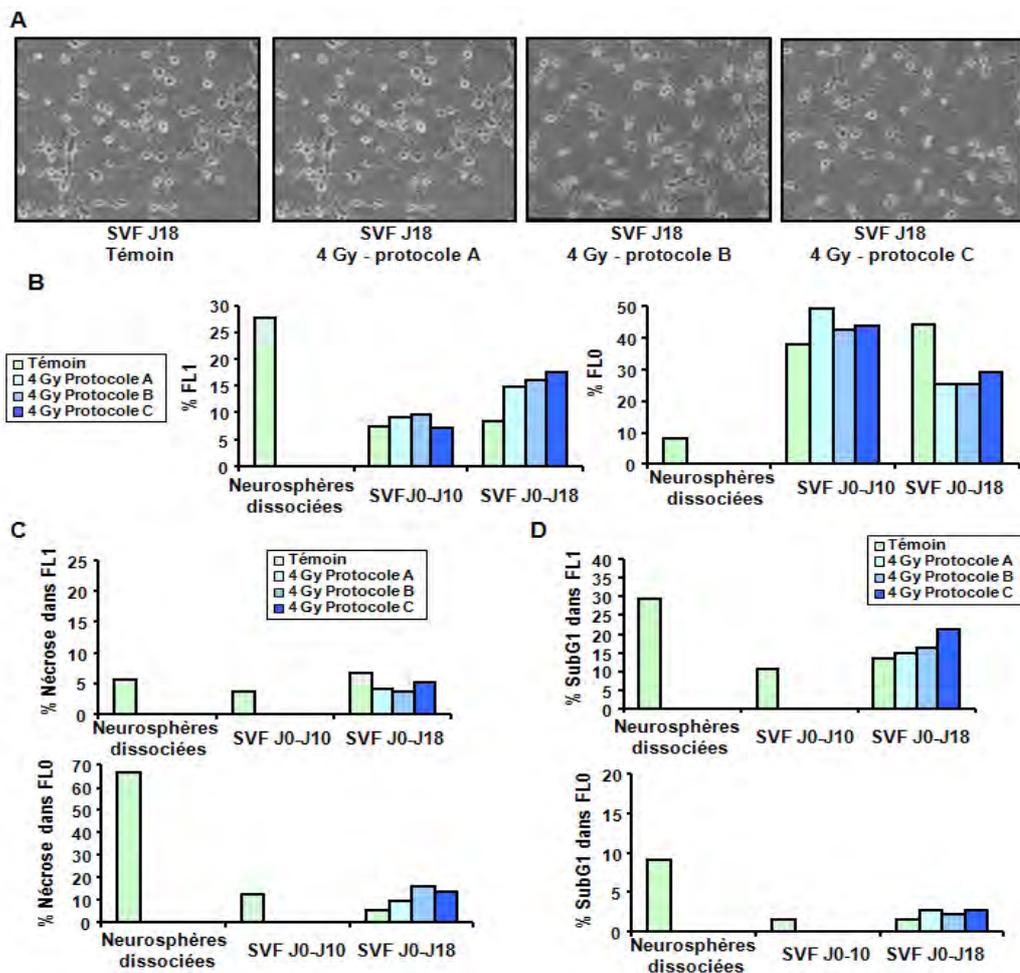
Nous avons comparé pour les protocoles A, B et C les effets des RI sur l'état de différenciation des cellules cultivées en milieu SVF pendant 18 jours. Les observations en microscopie optique ne montrent aucune différence significative entre les cellules irradiées à une dose de 4 Gy et les cellules non irradiées, quelque soit le protocole utilisé (**Figure 26 A**).

L'étude phénotypique en cytométrie de flux a permis de quantifier le pourcentage des populations FL1 et FL0 à J10 et J18, en présence ou non de RI et en fonction des protocoles A, B et C (**figure 26 B**). Le pourcentage de GSC à J10 (population FL1) ne montre pas de variation significative en réponse aux RI, quelque soit le protocole utilisé. Cependant, à J18, il y a une augmentation de la population FL1 d'un facteur ≈ 2 , avec un maximum atteint dans le protocole C. La population FL0 ne montre pas de variation significative à J10, mais on observe à J18 une diminution de l'ordre de 40% de cette population FL0 par rapport aux cellules non irradiées. Il est à noter qu'il y a très peu de variation dans les populations témoins entre J10 et J18, ce qui laisse penser que les RI sont bien responsable du doublement de la population FL1 et de la diminution de la population FL0 de 40% à J18. L'étude cytométrique permet ainsi de mettre en évidence, à la différence des observations en microscopie optique, un effet rétro-différenciant à long terme (J18) des RI sur les cellules de GBM différenciées et ceci quelque soit le protocole utilisé.

Afin de voir si cet effet des RI était associé à une altération des processus de mort cellulaire, nous avons mesuré le pourcentage de cellules nécrotiques (**Figure 26 C**) et de cellules apoptotiques (**Figure 26 D**) dans ces cultures. On n'observe pas de variations significatives de la nécrose après irradiation à J18, ni pour la population FL1 ni pour les FL0 (**Figure 26 C**). La même chose est observée pour l'apoptose, sauf dans le cas du protocole C (irradiation post-différenciation) où le pourcentage de cellules FL1 en sub-G1 est légèrement augmenté (**Figure 26 D**). Il est à noter que, dans les neurosphères fraîchement dissociées, un pourcentage notable de cellules FL1 est en apoptose (20%), probablement à cause des effets délétères du processus

de dissociation mécanique, et que les cellules FL0 sont fortement nécrotiques (65%), en accord avec les observations de Clément et al (Clement *et al.*, 2010). Selon cette étude en effet, seules les cellules FL1 sont capables de redonner des neurosphères secondaires, alors que les cellules FL0 meurent rapidement après dissociation

Enfin, l'étude de l'expression des ARNm codant pour CD133 dans les cellules irradiées ou non en milieu SVF depuis 18 jours montre une variation importante de l'expression de ce marqueur souche (**figure 26 E**), avec jusqu'à 4 fois plus de CD133 dans les cellules irradiées par rapport aux cellules témoins (protocole B). Cette expérience permet de montrer que l'irradiation des cellules de GBM induit, à relativement long terme, une augmentation du pourcentage de GSC associée à une augmentation du marqueur souche CD133 dans des cultures de cellules de GBM maintenues en milieu différenciant.



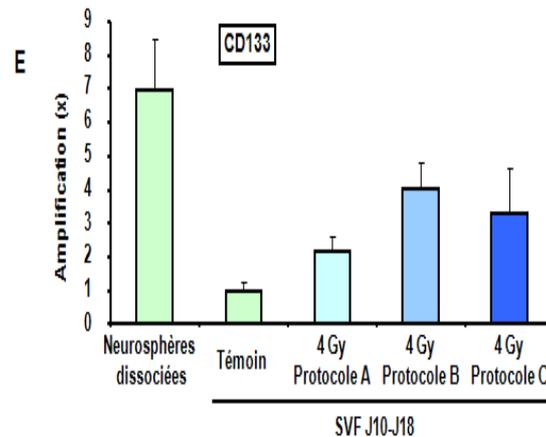


Figure 26 : Effet des rayonnements ionisants sur l'état de différenciation des cellules différenciées de GBM. Les cellules de GBM, irradiées ou non par 4Gy selon les protocoles A, B ou C, ont été maintenues pendant 18 jours en milieu différenciant puis observées en microscopie optique à J18 (A) et caractérisées en cytométrie de flux (J10 et J18) (B). Les cellules analysées par cette technique ont été quantifiées selon leur appartenance à la population FL1 (GSC) ou à la population FL0 (cellules non souches). Pour chaque population, l'analyse de la mort cellulaire par nécrose (C) et par apoptose (D) a été menée par cytométrie de flux comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes. (E) Les ARNm ont été extraits à J18 à partir de ces cultures. Après RT-PCR, l'expression relative du marqueur CD133 a été étudiée par PCRq.

iv. Effet des rayonnements ionisants sur le processus de rétro-différenciation « aidé » des cellules de GBM différenciées

A J10, alors qu'aucune variation des pourcentages des populations FL1 et FL0 n'est encore constatée (**Figure 27 B**), les cellules de GBM irradiées ou non selon les protocoles A, B ou C sont placées en milieu SCM pendant 8 jours supplémentaires pour permettre d'initier un processus de rétro-différenciation aidé. Les observations en microscopie optique permettent de mettre en évidence en présence de milieu SCM (i) une rétraction cellulaire, (ii) une perte d'adhérence des cellules différenciées de GBM et (iii) la reformation partielle de neurosphères (**Figure 27 A**). Ces effets sont observés, chez le patient A1, pour les cellules non irradiées et pour les protocoles A et B. Pour le protocole C, ces effets se manifestent de façon plus discrète. Nous avons d'ailleurs noté un nombre beaucoup plus faible de cellules pour ce protocole C, laissant présager une diminution de la prolifération cellulaire ou une augmentation de la mort cellulaire.

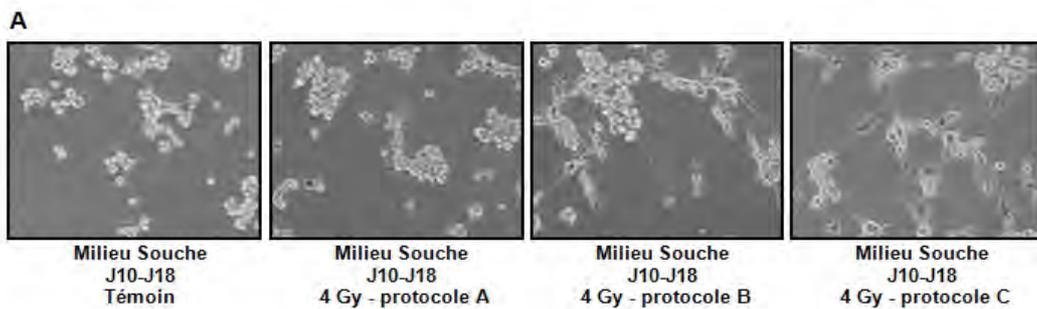
Les analyses en cytométrie nous confirment que l'augmentation de la population FL1 après 8 jours en milieu souche est importante dans les cellules témoins, en passant de 5% à 25% (**Figure 27 B**), alors que le pourcentage de FL0 diminue de 60% à 35% (**Figure 27 C**). Les RI, pour les protocoles A et B, amplifient cette augmentation du pourcentage de GSC (FL1) induite par le processus « aidé » de rétro-différenciation (**Figure 27 B**), avec jusqu'à 35% de cellules FL1. On n'observe pas cette potentialisation de l'effet rétro-différenciant pour le protocole C. Concernant les cellules FL0 (**Figure 27 C**), les RI conduisent déjà à une diminution importante de leur pourcentage dans les cultures maintenues en milieu SVF, comme vu précédemment à la **Figure 23 B**. Le processus de rétro-différenciation « aidée » entraîne, en présence de RI (protocoles A et B), une forte potentialisation de cette diminution de la population FL0, qui passe alors de 35% à 10%. L'effet observé pour le protocole C est beaucoup plus modeste.

L'analyse de la mort cellulaire lors de ce processus de rétro-différenciation aidée a été menée et on observe que le pourcentage de cellules nécrotiques dans la population FL1 (**figure 27 B, a**) demeure très faible et n'est pas modifié par les RI ni par le milieu SCM. En ce qui concerne l'apoptose (**figure 27 B, b**), les RI entraînent en milieu SCM une faible diminution du niveau basal d'apoptose dans la population FL1. Cette diminution n'est cependant pas retrouvée dans le protocole C. La population FL0 quant à elle (**Figure 27 C**) montre une augmentation modérée de la nécrose (**Figure 27 C, a**) et de l'apoptose (**Figure 27 C, b**) lorsque les cellules témoins sont placées en milieu SCM. Les RI, quelque soit le protocole utilisé, potentialisent fortement cette augmentation des pourcentages de cellules nécrotiques et apoptotiques, avec jusqu'à 40-50% des cellules FL0 en nécrose ou apoptose. En milieu SCM, l'irradiation augmente donc la nécrose et l'apoptose des cellules FL0 de manière significative, ce qui n'est pas le cas en milieu SVF.

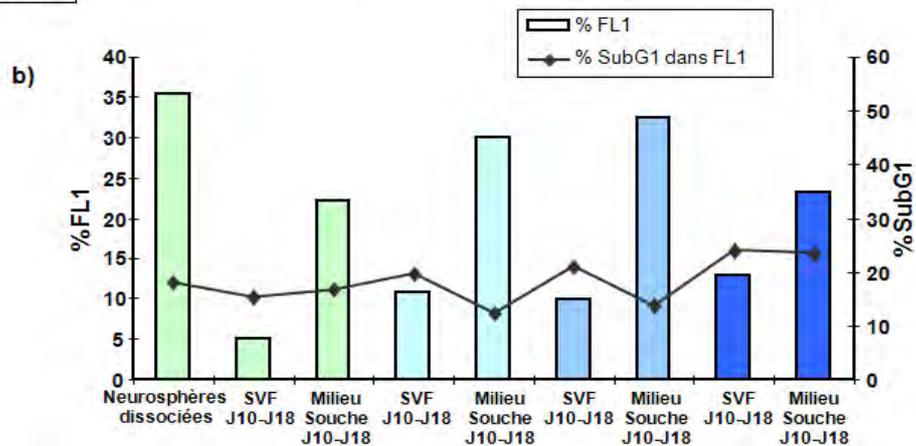
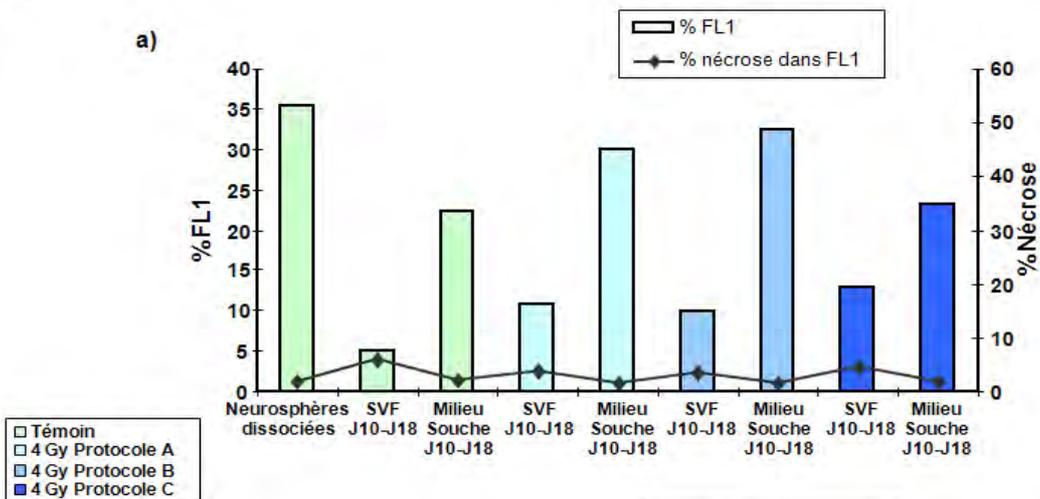
L'expression du marqueur souche CD133 a également été analysée par PCRq lors de ce processus aidé de rétro-différenciation. Le passage en milieu souche de cellules non irradiées augmente l'expression de CD133 d'un facteur 5 par rapport aux cellules différenciées (**Figure 27 D**). Les RI potentialisent très fortement cette surexpression,

avec au maximum un facteur 16 pour le protocole C. Les protocoles A et B montrent une amplification de CD133 d'un facteur 10 et 12, respectivement.

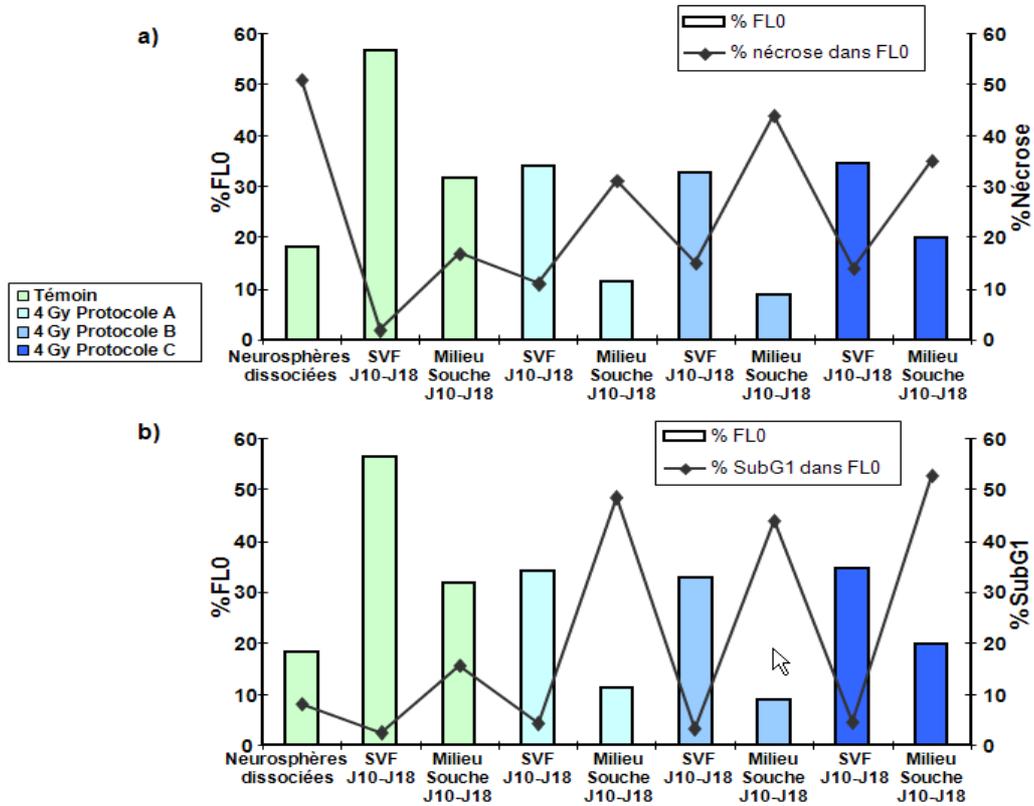
L'ensemble de ces résultats montrent bien, notamment pour les protocoles A et B, que les RI amplifient nettement la rétro-différenciation des cellules différenciées de GBM quand celles-ci sont placées en milieu souche.



B



C



D

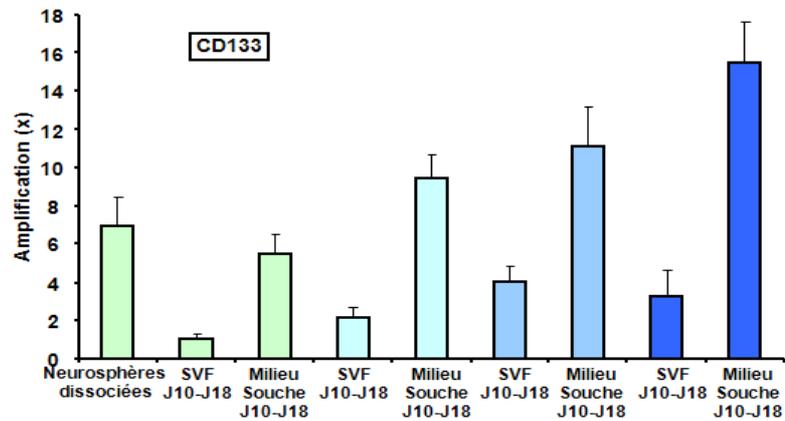


Figure 27 : Effet des rayonnements ionisants sur le processus de rétro-différenciation « aidé » des cellules de GBM différenciées. Les cellules de GBM, irradiées ou non à 4Gy selon les protocoles A, B ou C, ont été maintenues pendant 10 jours en milieu différenciant (SVF) puis placées pendant 8 jours supplémentaires en milieu SVF ou en milieu CSM. Les cultures cellulaires ont été observées en microscopie optique à J18 (A) et caractérisées en cytométrie de flux à J18 afin de quantifier les populations FL1 (B) et FL0 (C). Pour chaque population, l'analyse de la mort cellulaire par nécrose (B, a et C, a) et par apoptose (B, b et C, b) a été menée par cytométrie de flux comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes. (D) Les ARNm ont été extraits à J18 à partir de ces cultures. Après RT-PCR, l'expression relative du marqueur CD133 a été étudiée par PCRq.

d) Discussion

Le but de ce travail était de déterminer si la radiothérapie, destinée à éliminer les cellules de GBM restant sur le site tumoral après exérèse chirurgicale, pouvait permettre d'induire, dans les cellules survivantes, un processus de rétro-différenciation vers un état de cellule souche et ainsi contribuer à la radiorésistance de ces tumeurs et à leur récurrence, puisque ces GSC sont connues pour être très radiorésistantes et tumorigènes.

Dans un premier temps nous avons caractérisé les cellules souches isolées à partir de neurosphères établies chez un patient atteint de GBM, ainsi que leurs homologues différenciées et adhérentes placées en milieu SVF. Nous avons confirmé par ces analyses phénotypiques que cette lignée de neurosphères, capable de former des neurosphères secondaires, contient bien une fraction majoritaire de GSC (population FL1) Nous avons également montré la capacité de ces neurosphères à se différencier quasi totalement en cellules de GBM adhérentes et non-souches après 10 jours en milieu SVF (population FL0). Enfin, cette caractérisation phénotypique par cytométrie de flux a été appuyée par l'analyse en PCRq de différents marqueurs souches (CD133) et différenciés (GFAP). Ainsi, les neurosphères, contenant une majorité de GSC, expriment 7 fois plus CD133 que les cellules différenciées, qui elles expriment 6 fois plus la GFAP.

Ces méthodes de caractérisation ayant été établies, nous avons alors étudié les effets de l'irradiation sur les cellules de GBM au moyen de trois protocoles. Ces derniers ont été établis afin d'analyser l'effet des RI sur les neurosphères bien formées en milieu SCM (protocole A), sur les neurosphères dissociées en milieu SCM (protocole B) et sur les cellules de neurosphères en voie de différenciation (adhérentes) après 20h en milieu SVF (protocole C). Nous avons tout d'abord placé ces cellules en milieu différenciant pendant 18 jours et nous avons alors comparé les pourcentages respectifs des populations FL1 et FL0 à J10 et J18. Nous avons constaté que les populations FL1 et FL0, qui ne changent pas significativement à J10 en réponse aux RI, varient à J18 avec une augmentation de la population FL1 et une diminution de la population FL0, quelque soit le protocole utilisé (variations maximum pour le protocole C). Cette augmentation des GSC est corrélée à la surexpression de CD133 dans ces cellules irradiées (facteur 3). Ces résultats nous permettent de penser que les RI entraînent, à assez long terme une

rétro-différenciation de certaines cellules adhérentes et différenciées de GBM vers un état souche, sans que ce processus soit accompagné d'une augmentation de la mort cellulaire par apoptose et nécrose, exception faite du protocole C où une faible augmentation de l'apoptose est constatée dans les cellules FL1.

Nous avons ensuite comparé les effets de l'irradiation sur les cellules placées à J10 en milieu SVF (témoin) et en milieu SCM, afin d'orienter les cellules différenciées vers un processus « aidé » de rétro-différenciation. Les résultats obtenus montrent qu'avec ce procédé, les RI potentialisent fortement la rétro-différenciation des cellules de GBM en milieu SCM, avec une augmentation de la population FL1 (jusqu'à +10%), une forte diminution de la population FL0 (inférieure à 10%) et une forte amplification de la surexpression de CD133. Pour le protocole C, si la surexpression de CD133 est bien visible, les effets sont moins évidents pour les variations des populations FL1 et FL0. Pour ce protocole, la présence d'une apoptose plus importante et d'une nécrose notable dans les cellules FL1 obtenues pourraient expliquer le fait que cette potentialisation de la rétro-différenciation ne soit pas visible au niveau du pourcentage de FL1. Il serait donc intéressant de reproduire ce protocole C avec une dose plus faible de RI afin de diminuer la mort cellulaire de la population FL1 et ainsi observer si l'irradiation de cellules de GBM en cours de différenciation peut également augmenter la population FL1. En ce qui concerne les protocoles A et B, l'augmentation de la population FL1 pourrait être reliée à la diminution de l'apoptose observée dans ces cellules après irradiation (-8 à 10%). D'après ces résultats, il semblerait que les RI amplifient la rétro-différenciation des cellules de GBM différenciées quand celles-ci sont engagées dans un processus de rétro-différenciation aidée.

Ces résultats nécessitent bien sûr d'être confirmés chez ce patient A1 ainsi que dans des lignées de GBM obtenues à partir de tumeurs d'autres patients. Si ces effets sont reproduits, il conviendra d'identifier les mécanismes par lesquels les RI entraînent (i) la rétro-différenciation dans les cellules de GBM différenciées (**Figure 26**) et (ii) la potentialisation de la rétro-différenciation lors du processus « aidé » en milieu SCM (**Figure 27**). Parmi les mécanismes potentiels, il serait intéressant de regarder si des variations de la mort cellulaire par apoptose pourraient être à l'origine de l'augmentation de la population GSC, comme le suggère la **Figure 27Bb**. Il est important également de

voir si des variations de la prolifération des différentes populations FL1 et FL0 accompagnent ces processus de rétro-différenciation. Ensuite, l'analyse de l'expression d'un plus large panel de marqueurs souches et différenciés est nécessaire, à la fois au niveau protéique (cytométrie de flux, Western-Blot) et des ARNm. Un nombre important de ces marqueurs sont des facteurs de transcription (STAT3) ou des acteurs moléculaires (Notch) impliqués dans le maintien de l'état souche (Cheng *et al.*, 2010; Rich, 2009) et leur surexpression ou activation dans les cellules de GBM exposées aux RI, montrée par un certain nombre d'études (Tabatabai *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010), pourrait entraîner les phénomènes de rétro-différenciation observés ici. A plus long terme, il sera également nécessaire de confirmer in vivo chez la souris ce phénomène de rétro-différenciation au moyen de xéno greffes orthotopiques (Delmas *et al.*, 2003) et d'évaluer par cette même technique le potentiel tumorigène des cellules de GBM engagées, après irradiation, dans le processus de rétro-différenciation. Enfin, il conviendra de valider in vivo et in vitro les mécanismes et cibles identifiés et leur impact sur la tumorigenèse et la radiorésistance par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques.

3) Article publié dans *Cell Death & Disease* (nov. 2014).

L'étude ci-dessus réalisée en 2010 pendant mon stage de master 1 n'était qu'une étude préliminaire. Les recherches réalisées par l'équipe du Pr. Moyal et Dr. Toulas sur les glioblastomes ont continué dans le même sens afin de démontrer le rapport entre l'irradiation, la dédifférenciation et la récurrence des tumeurs. Des modifications sont à noter : le protocole de traitement des cellules de glioblastome a été modifié. Un seul protocole est utilisé : les cellules souches, sous forme de neurosphères, sont maintenues en milieu SCM. A J0 les neurosphères sont dissociées puis mises en milieu SVF afin de les différencier, à J15 elles sont irradiées ou non à une dose de 3 Gy pour être ensuite à J17 placées en milieu SVF ou SCM jusqu'au terme de l'expérimentation, à J50 (Dahan *et al.*, 2014). Le nouveau protocole a été utilisé sur 4 lignées cellulaires. La première étape de l'étude était de caractériser les populations souches et différenciées en étudiant un

panel de marqueurs par PCR et cytométrie. Les ARNm codant pour les gènes souches Gli1, Sox2, Olig2, Nestine se trouvent fortement exprimés dans les cellules souches et fortement réprimés dans les cellules différenciées en milieu SVF. On retrouve à l'inverse une forte expression des marqueurs GFAP, Tuj1, O4 dans les cellules différenciées, contrairement aux cellules souches (Dahan *et al.*, 2014).

Dans un second temps la dose d'irradiation a été déterminée afin d'éviter une éventuelle toxicité sur les cellules au cours du protocole de dédifférenciation. Le niveau de toxicité a été mesuré en fonction des pourcentages de nécrose et d'apoptose. Une irradiation à une dose de 3 Gy, ne montre pas d'augmentation de la toxicité. Mais pour les cellules irradiées à une dose de 12 Gy on retrouve une augmentation de la toxicité multipliée par deux (Dahan *et al.*, 2014). La dose utilisée dans le nouveau protocole (3 Gy) n'influe donc pas sur la toxicité et sur une éventuelle sélection clonale de cellules souches demeurant dans les cultures différenciées.

Dans un troisième temps il a été démontré que les RI avaient une influence sur l'expression des gènes de marqueur souche. Les cellules se trouvant en milieu souche après irradiation ré-expriment de manière significative les marqueurs souches (x2) par rapport aux cellules non irradiées contrôle. Ceci n'est pas retrouvé après irradiation pour les cellules cultivées en milieu SVF qui expriment de façon très faible voir nulle ces marqueurs (Dahan *et al.*, 2014). De plus il a été montré dans cette étude que les cellules de glioblastome avaient un fort pouvoir tumorigène après irradiation à 3 Gy grâce à des expériences de xénogreffes orthotopiques sur des souris *nude*. En effet les cellules différenciées de GBM irradiées ou non, placées dans le milieu souche SCM, ont été injectées dans le cerveau des souris afin d'établir des courbes de survie. On constate une nette différence en termes de survie entre les deux groupes. Le groupe recevant les cellules irradiées dédifférenciées ont une survie plus courte que les souris recevant des cellules non irradiées. Ceci nous montre que les RI jouent un rôle sur la tumorigénèse des cellules de GBM, une caractéristique majeure des GSC. Une autre caractéristique mise en évidence lors de cette étude est la capacité des cellules de GBM à s'auto-renouveler par formation de NS. En effet lorsque l'on compare les cellules différenciées irradiées ou non en milieu SCM ou FCS le nombre de NS diffère très fortement. On retrouve après comptage de celles-ci une très nette augmentation de leur nombre lorsque les cellules

ont été irradiées et maintenues dans le SCM par rapport aux cellules non irradiées (Dahan *et al.*, 2014)

De plus des études supplémentaires ont mis en évidence le rôle d'une protéine fortement impliqué dans la régulation de la survie, la prolifération et la différenciation des GSC. En effet une protéine anti-apoptotique, connue sous le nom de survivine et appartenant à la famille des IAP, est fortement exprimée dans les GSC contrairement aux cellules différenciées. Cette survivine se retrouve fortement exprimée pendant les expériences de dédifférenciation radio-induite (Dahan *et al.*, 2014). Des expériences *in vitro* à l'aide d'un inhibiteur sélectif de la transcription de la survivine, l'YM155 (Ryan *et al.*, 2009), permet de réprimer fortement la formation de neurosphères induite par les RI (Dahan *et al.*, 2014). Ces résultats montrent que la survivine joue un rôle important dans la régulation de la plasticité radio-induite des cellules (Dahan *et al.*, 2014). Des essais cliniques de phase II sont actuellement en cours pour d'autres tumeurs afin d'étudier les effets de l'inhibiteur YM155 (Ryan *et al.*, 2009).

En conclusion cette nouvelle étude nous montre que les RI induisent un retour des cellules différenciées vers un état plus souche et qu'une dose de RI de 3 Gy augmente de manière significative l'expression des marqueurs souches dans ces cellules, potentialise leur pouvoir tumorigène chez la souris nude et qu'elle induit leur capacité à s'auto-renouveler. Au vue de ces résultats, on peut penser que les RI pourraient favoriser la récurrence des glioblastomes par formation de nouvelles cellules cancéreuses « souches » et donc être responsables de phénomènes de radio/chimiorésistance.

Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance

P Dahan¹, J Martinez Gala¹, C Delmas^{1,2}, S Monferran^{1,3}, L Malric¹, D Zentkowski³, V Lubrano^{4,5}, C Toulas^{1,2,7}, E Cohen-Jonathan Moyal^{*,1,6,7} and A Lemarie^{*,1,3,7}

Glioblastomas (GBM) are some bad prognosis brain tumors despite a conventional treatment associating surgical resection and subsequent radio-chemotherapy. Among these heterogeneous tumors, a subpopulation of chemo- and radioresistant GBM stem-like cells appears to be involved in the systematic GBM recurrence. Moreover, recent studies showed that differentiated tumor cells may have the ability to dedifferentiate and acquire a stem-like phenotype, a phenomenon also called plasticity, in response to microenvironment stresses such as hypoxia. We hypothesized that GBM cells could be subjected to a similar dedifferentiation process after ionizing radiations (IRs), then supporting the GBM rapid recurrence after radiotherapy. In the present study we demonstrated that subtoxic IR exposure of differentiated GBM cells isolated from patient resections potentiated the long-term reacquisition of stem-associated properties such as the ability to generate primary and secondary neurospheres, the expression of stemness markers and an increased tumorigenicity. We also identified during this process an upregulation of the anti-apoptotic protein survivin and we showed that its specific downregulation led to the blockade of the IR-induced plasticity. Altogether, these results demonstrated that irradiation could regulate GBM cell dedifferentiation via a survivin-dependent pathway. Targeting the mechanisms associated with IR-induced plasticity will likely contribute to the development of some innovating pharmacological strategies for an improved radiosensitization of these aggressive brain cancers.

Cell Death and Disease (2014) 5, e1543; doi:10.1038/cddis.2014.509; published online 27 November 2014

Radiotherapy is, following surgical resection and associated with Temozolomide, the gold standard treatment for glioblastoma (GBM). However, even after the association of surgery and combined chemo/radiotherapy, these invasive and resistant tumors almost systematically recur, with a median overall survival of 14 months.¹ It is now established that GBM are some very heterogeneous tumors similar to most of the solid cancers.² Recent studies highlighted the presence of a subpopulation of self-renewing and pluripotent GBM stem-like cells (GSCs), also called GBM-initiating cells, among the tumor. These GSC are characterized by their ability to self-renew *in vitro* (neurospheres (NS) formation) and *in vivo*, their higher expression of neural stem cell (NSC) markers (i.e., Olig2, Nestin or A2B5) and stem cell transcription factors (SCTF, i.e., Sox2, Nanog, Gli1 or Oct4), their pluripotent aptitude to differentiate into neurons, astrocytes or oligodendrocytes and their high tumorigenic potential *in vivo* in mice.^{3,4} In addition, the presence of these GSC may explain the high GBM recurrence rate, as they were shown to be extremely tumorigenic and radioresistant.^{3,5,6}

Several radioresistance mechanisms have been identified in these GSC. Most of them are in favor of a clonal selection process through the GSC intrinsic resistance to ionizing radiation (IR)-induced cell death,^{7,8} supported by a better efficiency of DNA-damage repair systems,^{6,9,10} a higher level of anti-apoptotic^{11,12} or pro-survival factors^{13–15} and a sustained expression of pluripotency maintenance factors such as Notch1,¹⁶ TGF β ,^{17,18} Sonic hedgehog (SonicHH),¹⁹ STAT3²⁰ or Wnt.²¹ Besides this, the influence of the microenvironment could also participate in radioresistance,^{17,22} as hypoxia, which is a well-known factor of radioresistance,^{23,24} acidic extracellular pH²⁵ and nitric oxide^{26,27} were shown to be involved in GSC stemness preservation.

However, several studies have put forward the hypothesis that GBM-differentiated cells may be able to dedifferentiate toward a stem-like state when submitted to appropriate stimuli⁷ and then contribute to increase the tumor stem cell pool. This assumption was supported by studies showing that hypoxic conditions, hepatocyte growth factor or Temozolomide could induce such a phenomenon in GBM cells.^{23,28,29} Of note, hypoxia was previously shown to induce a similar

¹INSERM UMR 1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France; ²Laboratoire d'Oncogénétique, Institut Universitaire du Cancer Toulouse-Oncopole, Toulouse, France; ³Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France; ⁴INSERM UMR 825, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France; ⁵Service de Neurochirurgie, Centre Hospitalier Universitaire de Rangueil, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France and ⁶Département de Radiothérapie et Oncologie, Institut Universitaire du Cancer Toulouse-Oncopole, Toulouse, France

*Corresponding authors: A Lemarie or E Cohen-Jonathan Moyal, Experimental Therapeutics, Inserm UMR1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Oncopole de Toulouse, 2 avenue Hubert Curien, 31037 Toulouse, France. Tel: +33 582 741 606; Fax: +33 531 155 224; E-mail: anthony.lemarie@inserm.fr or moyal.elizabeth@iuct-oncopole.fr

⁷These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: CSC, cancer stem cell; GBM, glioblastoma; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GSC, GBM stem-like cell; HIF, hypoxia-inducible factor; IAP, inhibitor of apoptosis protein; IR, ionizing radiation; NS, neurosphere; NSC, neural stem cell; SCM, stem cell medium; SCTF, stem cell transcription factor; SonicHH, Sonic hedgehog
Received 18.9.14; accepted 13.10.14; Edited by G Raschella

reprogramming in breast cancer³⁰ and neuroblastoma cells,³¹ and our group showed that IR can stabilize HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) and activate the associated hypoxic pathways in GBM.^{32,33} This dedifferentiation process was also demonstrated *in vivo* in murine neurons and astrocytes through the expression of GBM-associated oncogenes.³⁴ In line with this, recent works showed that IRs were able to induce at short term the expression of stem markers (such as Sox2, Nestin and CD133) in GBM,³⁵ without studying the presence of a potential dedifferentiation process. In consequence, we hypothesized that plasticity may occur after radiotherapy in resistant remaining GBM cells. The present study was designed to analyze the long-term effects of radiotherapy on the phenotypic and molecular status of GBM cells isolated from several patient resections and to find out whether or not these cells can dedifferentiate toward a stem-like phenotype in response to IR.

Our present data show in human primary GBM patient cell lines that a subtoxic IR dose can induce at long term the overexpression of a large panel of stem markers in GBM cells, a potentiation of their NS-forming capacity and an exacerbated tumorigenesis in nude mice, indicating an IR-induced dedifferentiation process. We have also identified the inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin as an important regulator of this IR-induced plasticity. In conclusion, we showed here for the first time that radiotherapy is able to sustain a phenotype shift toward stemness in GBM, which may participate in the expansion of the cancer stem-like compartment in GBM after treatment and finally favor a fast recurrence of these aggressive and invasive brain cancers.

Results

Characterization of the human primary GBM cells subjected to the IR-induced dedifferentiation protocol. To study the hypothesis of an IR-induced plasticity, four GSC cell lines (C, D, G and I) previously established in our group from patient surgical GBM samples and cultured as GSC-enriched NS²⁹ were forced to differentiate in fetal calf serum (FCS) medium for at least 15 days, leading to a dramatic change in their cellular morphology and adhesion properties, and to the loss of their ability to generate NS by self-renewal (Figure 1a). These differentiated GBM cells were then subjected or not to a 3-Gy irradiation and placed 2 days after in either FCS or stem cell medium (SCM), in order to maintain a differentiated status or to favor a possible reversion to a stem phenotype, respectively (Figure 2a). These culture conditions were maintained until the generation of NS in the medium, testifying of the reappearance of the *in vitro* self-renewal ability. The long-term effects of irradiation were then analyzed at a molecular level by RT-qPCR, western blotting or FACS analysis, and *in vivo* by the tumorigenicity of the treated cells in orthotopically xenografted nude mice.

In order to fully characterize the differentiated GBM cells subjected to this dedifferentiation protocol, we first checked by RT-qPCR the expression of several stem and differentiation markers in NS-derived cells and their differentiated counterparts. We observed that in all NS cell lines, the expression of the largely described stem markers CD133, Notch1, Nanog,

Gli1, Sox2, Nestin, SonicHH, EZH2 and Olig1/Olig2,^{3,36,37} was markedly and significantly repressed after a 15-day forced differentiation (Figure 1b). On the contrary, the expression of several differentiation markers such as GFAP (glial fibrillary acidic protein) or connective tissue growth factor (CTGF)^{3,38} was potently upregulated in FCS-differentiated cells but almost undetectable in NS (Figure 1b). We confirmed by FACS that the cell surface stem markers CD133, Notch1 and A2B5⁴ were totally abrogated in the differentiated cells, as well the SCTF Nanog and Sox2 (Figure 1c). The NSC protein Nestin, highly expressed in glioma and particularly in GSC,^{39,40} also appeared markedly decreased. Finally, we observed the appearance in these differentiated cells of the three lineage-specific differentiation markers GFAP, O4 and TUJ1 (β 3-Tubulin),²⁹ pointing the ability of this differentiation process to exploit the GSC pluripotency to generate, respectively, tumor astrocytes, oligodendrocytes and neurons (Figure 1c). Of note, these differentiation markers were not expressed in the NS cells. The results were reproduced in all cell lines (data not shown).

Absence of alteration of both cell viability and proliferation in response to a 3-Gy irradiation. As previously mentioned, it appeared necessary in this study to avoid any clonal selection after irradiation in order to only study the potential dedifferentiation process induced by IR. As a consequence, our protocol required a non-toxic IR dose. In that way, we performed some clonogenic NS formation assays at different IR doses (0–10 Gy) and we observed that no significant toxicity can be detected at 3 Gy or lower (data not shown). Next, we checked whether or not this 3-Gy subtoxic dose was able to alter cellular viability or proliferation during the dedifferentiation process. We also used a 12-Gy dose as a positive control for toxicity. Using annexin V (AV)/propidium iodide (PI) double staining and SubG1 detection to assess necrosis and apoptosis after a 3-Gy irradiation, we failed to observe any viability impairment 7 days post IR (Figures 2b and c) or along the whole dedifferentiation process (Figure 2e). Similarly, we did not see, using WST1 assay, any alteration in cell proliferation at 7 days post IR (Figure 2d). A similar statement was made during the whole dedifferentiation protocol, as we could not observe any change in the cell count between the control and the 3-Gy-irradiated groups (Figure 2f). As expected, the 12-Gy dose induced a decrease in cell proliferation and an increase of apoptotic and necrotic cell death as soon as 7 days post IR (Figures 2b, c and d).

Potentiation of the long-term acquisition of a stem-like phenotype by IR in GBM differentiated cells. Using these characterized GBM differentiated cells irradiated by a 3-Gy subtoxic dose, we subjected or not the cells to a medium change and place them either in FCS medium to preserve their differentiated status or in SCM medium to favor the potential appearance of a stem phenotype in a permissive environment (Figure 2a). NS did not appear in cells kept in FCS medium, even after IR (Figure 3a). However, we observed after at least 4 weeks of culture post IR (25 cm² culture flasks) the generation of NS in SCM medium (Figure 3a). This was noticed at a basal level in non-

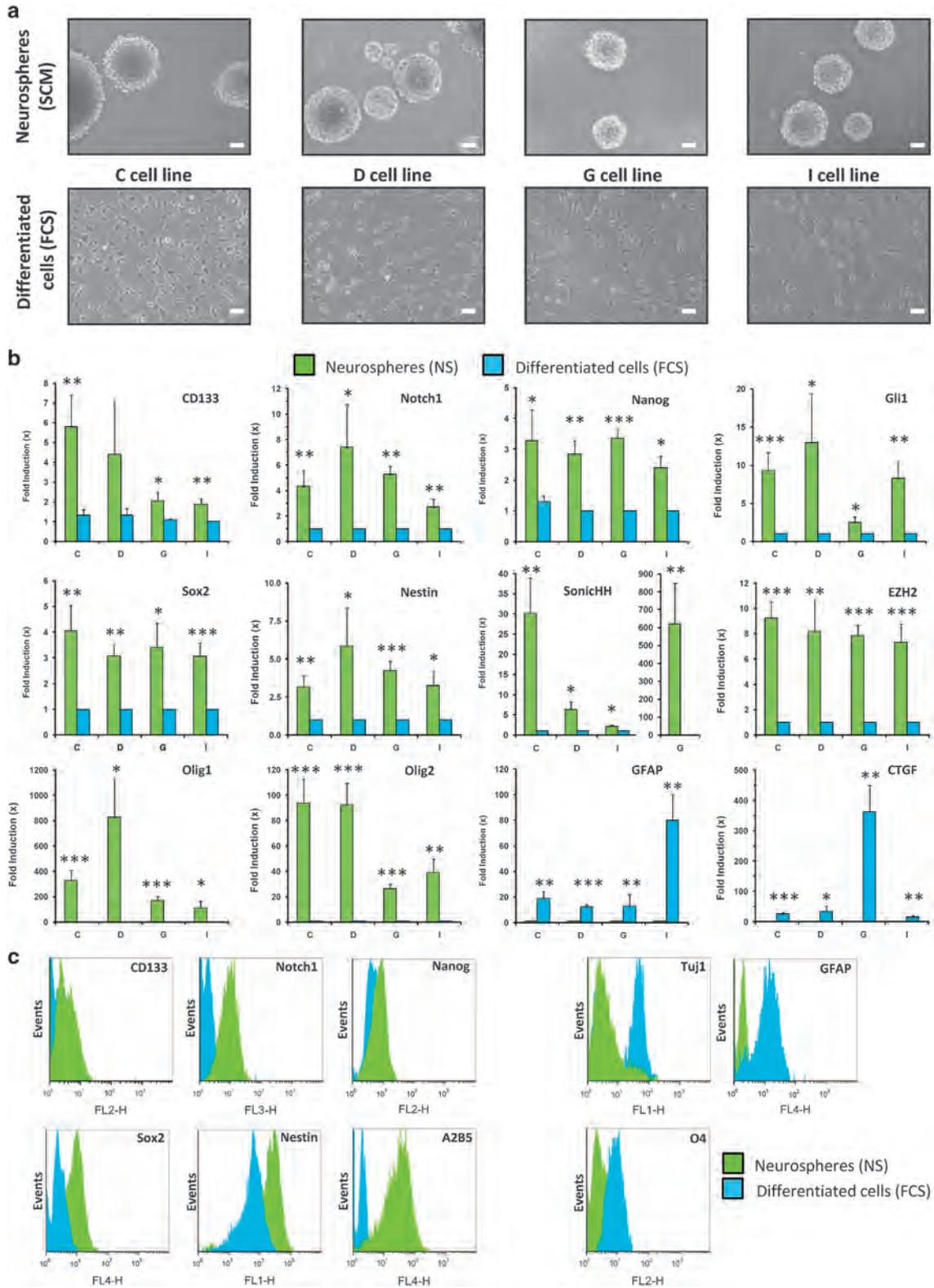


Figure 1 Characterization of the stem and differentiated phenotypes in GSC-enriched NS and FCS-differentiated GBM cultures. (a–c) GSC-enriched NS cell lines isolated from four patient tumors (C, D, G and I) were kept in SCM medium or allowed to differentiate as adherent GBM cells for at least 15 days in FCS medium. (a) Phase-contrast photomicrographs of NS or GBM-differentiated cells. Original magnification: $\times 10$, scale bar: $6 \mu\text{m}$. (b) Real-time quantitative PCR analysis of the stem (CD133, Notch1, Nanog, Gli1, Sox2, Nestin, SonicHH, EZH2, Olig1 and Olig2) and differentiation (GFAP and CTGF) markers in NS or GBM-differentiated cells for the C, D, G and I cell lines. Shown are the fold inductions expressed as means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the related control. (c) Immunofluorescence FACS analysis of stem (CD133, Notch1, Nanog, Sox2, Nestin and A2B5) and differentiation (GFAP, TuJ1 and O4) markers in NS or GBM-differentiated cells. The results depicted were representative of three independent experiments (G cell line) and were reproduced in all the cell lines

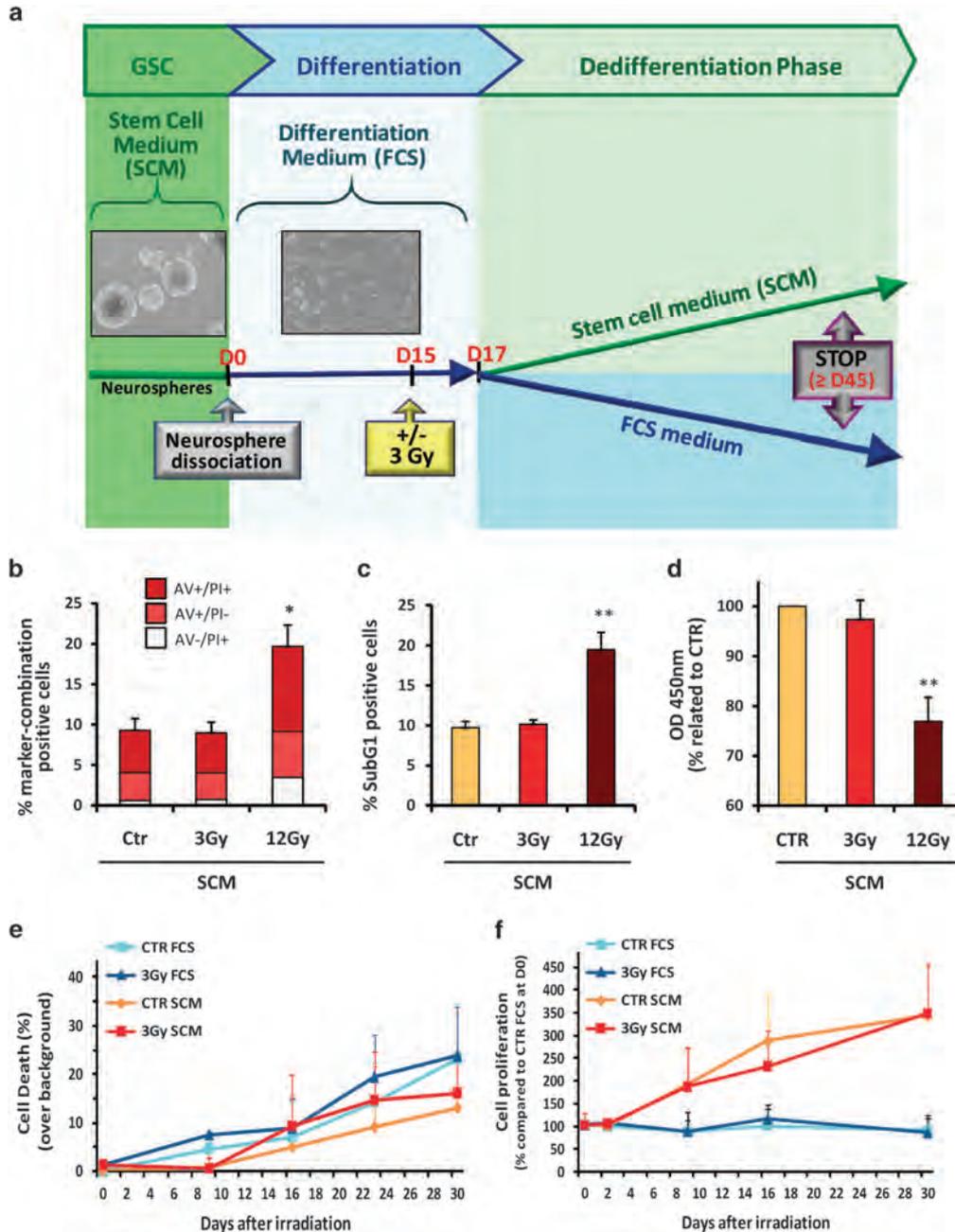


Figure 2 Overview of the long-term dedifferentiation protocol and assessment of the irradiation dose. (a) As described in the Materials and Methods section, GSC-enriched NS were isolated from patient samples and cultured in a specific SCM medium. NS cells were then dissociated and placed into a differentiating medium with FCS (FCS medium) for at least 15 days, to allow an optimum differentiation. Adherent differentiated GBM cells were then subjected or not to a 3-Gy irradiation and were placed 2 days after in fresh FCS medium, to keep them fully differentiated, or in SCM medium to favor a possible dedifferentiation process. The totality of the cells was finally collected at the end of the protocol, which coincided to the apparition of NS in the culture supernatant, in order to be analyzed. (b–f) Absence of effects of a 3-Gy irradiation on viability and proliferation of GBM cells during the dedifferentiation protocol. Differentiated GBM cells were subjected or not (Control, CTR) to a 3-Gy irradiation and placed 2 days after in SCM medium for 5 additional days, according to the dedifferentiation protocol (b–d) or for different time points during this dedifferentiation protocol (e and f). The dose of 12 Gy was chosen as a positive control for cell death induction. At 7 days post IR, cells were analyzed either by FACS for AV/PI double staining of both apoptotic and necrotic cells (b) and PI staining of the Sub-G1 population (c), or through WST-1 staining using a spectrophotometric determination of the dye absorbance at 450 nm for the quantification of cell viability and proliferation (d). For kinetic studies, cell death was assessed by FACS, by AV/PI staining and expressed as percentages over background (e), and cell count was performed to estimate the cell proliferation rate in the indicated culture condition (f). Shown are the means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the related control

irradiated control cells (CTR) and was greatly potentiated by IR by two- to six fold according the cell line (Figures 3a and b). We also plated GBM-differentiated cells at low densities in 24-well plates in order to perform a NS generation assay

adapted from the classic limiting dilution assay used generally for GSC.⁴¹ Using this protocol, we were able to confirm that FCS-maintained cells, with or without IR, failed to generate NS. On the contrary, SCM-cultured cells gave rise

to NS at long term and this generation was greatly potentiated after irradiation (Figure 3c). We also performed this NS generation assay after sorting the differentiated GBM cells (negative for A2B5; Tchoghandjian *et al.*⁴) by FACS analysis in order to discard some eventual remaining GSC in our differentiated cell cultures and we observed the same increase in NS generation in response to irradiation (Figure 3d). Finally, we also established through the use of a classic limiting dilution assay⁴¹ that these primary NS generated in SCM medium were able to give rise to secondary NS, with a marked increased ability for primary NS-derived cells obtained after a 3-Gy irradiation. This was observed whether the differentiated cells were sorted or not before irradiation (Figures 3e and f).

We then analyzed the expression of a large panel of stem markers at the end of the dedifferentiation protocol. We demonstrated by RT-qPCR that the mRNA expression levels of several well-established stem markers, such as Nanog, Olig2, SonicHH and EZH2, were markedly increased in 3-Gy-treated cells grown in SCM medium compared with untreated cells kept in the same medium (Figure 4a). We did not observe this IR-induced potentiation in FCS condition. Similar results were obtained for all the cell lines (data not shown). We analyzed in parallel the expression of several differentiation markers and showed that the astrocytic marker GFAP and the oligodendrocytic marker oligodendrocyte-myelin glycoprotein⁴² were accordingly downregulated in SCM medium and that this decrease was amplified after irradiation (Figure 4b).

To confirm these data at the protein level, we demonstrated by western blotting in all the cell lines that long-term culture in SCM medium of irradiated differentiated GBM cells greatly enhanced the expression of Olig2, Sox2 and Nestin compared with untreated cells kept in SCM medium, which nevertheless showed a slight increase of these stem markers compared with FCS-differentiated cells (Figure 5a), as observed at the RNA level (Figure 4a). However, short-term analyses (2–7 days post IR) demonstrated that this stem markers overexpression can exclusively be observed after IR in SCM medium, without any effect in FCS-cultured cells or in SCM-control cells, pointing out the predominant role of irradiation for stem markers induction (Supplementary Figure 1a). In order to measure more accurately the overexpression of different stem (Nestin, A2B5, Nanog and Notch1) and differentiation (GFAP) markers, we demonstrated by FACS analysis in all the cell lines that 3-Gy-irradiated cells cultured in SCM medium either markedly upregulated these stem markers or downregulated GFAP compared with the control SCM condition (Figure 5b). In addition, we were able to show that this phenomenon was generalized to the whole cell population and did not seem to be due to the expansion of some particular cell clones within the cellular population.

Increased tumorigenic potential *in vivo* in IR-dedifferentiated GBM cells. One of the most important characteristics of GSC is their high tumorigenicity in orthotopically xenografted nude mice compared with non-stem cells.⁴³ We analyzed accordingly the tumorigenic potential of long-term irradiated GBM cells cultured either in SCM or FCS medium at the end of the dedifferentiation

protocol. We observed that GSC-enriched NS cells show the highest tumorigenic potential when compared with all differentiated conditions (Figure 6a). Three-Gray-irradiated cells kept in FCS medium failed to show a significant tumorigenicity increase compared with untreated cells. As control cells maintained in SCM medium showed a slight increase in their tumorigenic potential, we observed that only the 3-Gy-treated cells placed in SCM medium were able to display a markedly increased tumorigenicity, with survival curves relatively close to those of the corresponding NS cell line (Figure 6a). We next performed an immunolabeling of the stem factor Nanog in the brain of these xenografted mice and we showed that Nanog is expressed by small cell clusters, as already described for several stem markers in human tumor tissues,^{44,45} and is significantly increased in the 3-Gy SCM group compared with the related control (Figure 6b and Supplementary Figure 2). Although these first elements need to be further confirmed in larger *in vivo* studies, they seem to support our observations establishing that IR could potentiate the dedifferentiation of GBM cells *in vitro* and lead to an upregulation of GSC number and an increased tumorigenicity *in vivo*.

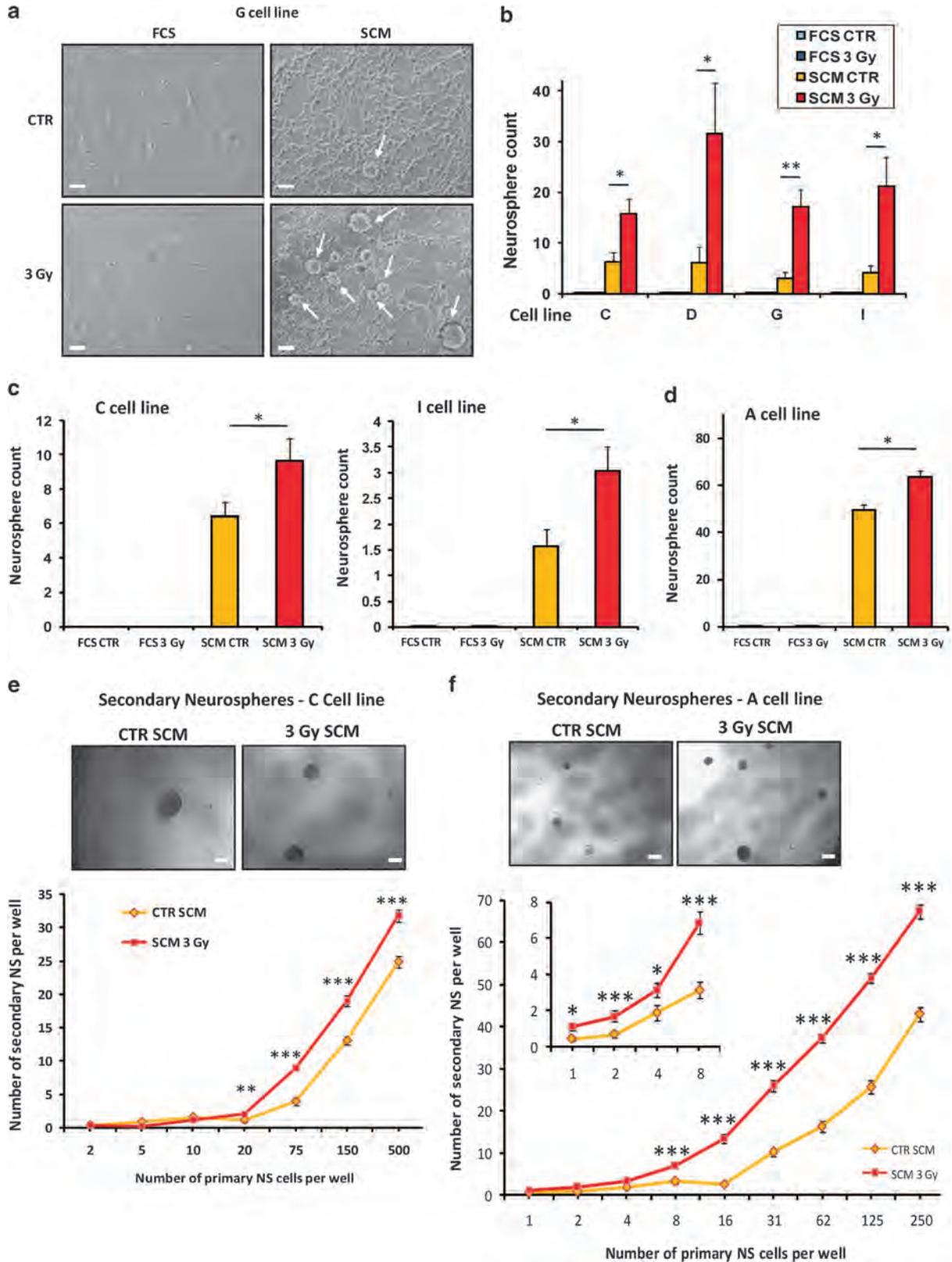
Requirement of a survivin-dependent pathway for IR-induced dedifferentiation in GBM cells.

Our group and others previously showed that survivin (BIRC5), an anti-apoptotic IAP, is involved in GBM cell radioresistance, notably in relation with hypoxia pathway.^{32,46} Moreover, it appears that survivin has a major functional role in neural progenitor cells and during neurogenesis⁴⁷ and is closely associated with the SonicHH/Gli1 pathway in GSC.⁴⁸ In line with this, survivin was recently shown to be upregulated in GSC, to contribute to their cell death resistance and to be increased by IR.⁴⁹ We then hypothesized that survivin may be involved in the IR-induced dedifferentiation process described above. We first checked the survivin expression in GSC-enriched NS, in differentiated cells and during the IR-induced dedifferentiation, by qPCR (Figure 7a) and western blotting (Figure 7b). We observed that in all the cell lines, this IAP was dramatically downregulated in FCS-differentiated cells compared with NS, independently of their irradiation status. Interestingly, a slight overexpression of survivin was seen in untreated SCM condition but only the 3-Gy condition allowed to overexpress survivin at a level approaching the one displayed in NS (Figures 7a and b). This increase was also observed at short term after irradiation (Supplementary Figure 1b). In consequence, these variations appeared to be very similar to those seen for the different stem markers analyzed above (Figures 4a and 5a, and Supplementary Figure 1a).

We then investigated whether this survivin overexpression during the IR-induced dedifferentiation was a consequence of this reprogramming or could be an essential step supporting IR-induced GBM plasticity to a stem-like phenotype. To this end, we treated GBM cells during the dedifferentiation process with 7 nM YM-155, a selective inhibitor of survivin used in anti-cancer clinical trials.⁵⁰ As an additional control, we used MK-2206 (250 nM), a selective AKT inhibitor,⁵¹ as we and others⁵² showed that AKT can control the expression of survivin in GBM cells (Figure 8a). We first checked the

efficiency of these inhibitors used at non-toxic concentrations (data not shown) on survivin expression by western blotting during the IR-promoted dedifferentiation (Figure 8a). Next, we

observed their effect at the end of the dedifferentiation protocol and showed that both inhibitors induced a potent blockade of the 3-Gy-induced NS generation in SCM medium (Figures 8b



and c). Moreover, YM-155 and MK-2206 markedly inhibited at the protein level the overexpression of the stem markers Olig2, Sox2 and Nestin in response to IR in SCM medium (Figure 8d). Altogether, these results strongly suggest that the IR-induced reprogramming in GBM cells was associated and supported by the upregulation of the anti-apoptotic protein survivin.

Discussion

Radiotherapy is undoubtedly a key component for GBM treatment. The standard protocol defined by Stupp *et al.*^{53,54} associates concomitant chemotherapy with Temozolomide and radiotherapy at a total dose of 60 Gy (30 daily fractions of 2 Gy), followed by adjuvant TMZ chemotherapy. This combined chemo/radiotherapy following surgical tumor resection, when possible, leads to a median overall survival of 14.6 months in the EORTC-NCIC trial^{53,54} and the relapse, almost inevitable, mainly occurs at the initial tumor location exposed to radiotherapy.⁵⁵ Consequently, it appeared essential to identify the possible origins of this high relapse rate and to increase the efficacy of radiotherapy in GBM to improve their clinical prognosis.

Growing number of studies deciphered the resistance pathways occurring in GBM cells in response to IR and notably focused on the radioresistant GSC subpopulation, much more resistant to IR compared with differentiated GBM cells.^{6,13,16} These GSC then may be selected by the treatment to favor the subsequent tumor regrowth and relapse. Different targeted strategies have been already tested to radiosensitize GSC in order to suppress either their survival ability or their tumorigenic competency.^{6,12,13,16} Forced differentiation was also used to sensitize GSC to radiotherapy.^{56,57} Nevertheless, none of these radiosensitizing strategies got interested to target a putative dedifferentiation mechanism occurring in resistant differentiated cells remaining in the tumor site after combined surgery/radiochemotherapy and to analyze the effects of IR with regard to the cellular plasticity processes.

For the first time, we demonstrated here that IR at a subtoxic 3-Gy dose close to the daily used dose in clinic are responsible for favoring at long term a major dedifferentiation process in GBM cells, with the gain of an *in vitro* self-renewal ability, the overexpression of a large panel of stem markers, the dramatic decrease of several well-established neural differentiation markers and finally the acquisition of a potentiated tumorigenic potential *in vivo* in orthotopically xenografted nude mice. Moreover, we showed that this cellular plasticity to a cancer

stem cell (CSC) phenotype occurred independently of any clonal selection, as we did not observe any impairment of either the proliferation rate or the cell viability after a 3-Gy irradiation along the whole dedifferentiation process. Altogether, our data highlight the existence of a new mechanism of radioresistance in GBM cells through a cellular adaptation of the surviving cancer cells after treatment, leading to their reprogramming to a stem-like state much more tumorigenic. This work supports some recent observations in breast cancer cells showing the re-acquisition of several stem characters in response to IR, highlighting in some ways their reprogramming toward a stem-like phenotype.⁵⁸

This new process of cell adaptation to radiotherapy, which allows remaining differentiated cancer cells to acquire stemness, may probably contribute, together with clonal selection, to the stem cell compartment expansion inside the tumor after treatment⁴¹ and to the fast and almost inevitable recurrence of these tumors. In consequence, it could be of great interest to specifically inhibit this particular IR-induced plasticity in order to setup new clinical strategies, in the aim to optimize radiotherapy in GBM patients. For this purpose, we analyzed several genes known to participate to a cellular adaptation process in response to IR and notably the anti-apoptotic protein survivin, recently highlighted by our group in irradiated GBM cells.³² We showed in the present study that survivin was markedly enhanced in GSC compared with their differentiated counterparts, and that its expression was potentiated during the dedifferentiation process in a similar way to the stem markers. Moreover, we and others previously showed that this IAP is involved in GBM radioresistance,^{32,46} is increased by IR in GBM cells,^{46,49} is upregulated in GSC compared with differentiated GBM cells,⁴⁹ is associated with faster GBM recurrence⁴⁹ and is overexpressed in GBM recurrence tumor samples compared with newly diagnosed ones.⁴⁹ In addition, survivin was also shown to be tightly associated with different stem-promoting pathways in CSC/NSC, notably SonicHH/Gli1,⁴⁸ Notch,⁵⁹ Oct4/Stat3⁶⁰ and Sox2.⁶¹ In consequence, we investigated its role in the IR-induced GBM cell dedifferentiation. Through the use of the selective inhibitor of survivin YM-155, actually used in phase II clinical trials for advanced non-small cell lung carcinoma, melanoma, breast and prostate cancer,⁶² we established that survivin is essential to the occurrence of the IR-induced plasticity process and sustains both the NS-forming ability and the stem markers overexpression in response to IR. It would be of interest to further study the precise role of this IAP in the dedifferentiation process, as it appears that survivin has, in addition to its

Figure 3 Increased ability to generate NS in GBM-differentiated cells subjected to a 3-Gy subtoxic irradiation. Cells treated or not by a 3-Gy irradiation and placed 2 days after in either FCS or SCM medium for long-term culture were analyzed in order to evaluate the number of NS generated in the culture supernatant. (a) Phase-contrast photomicrographs of GBM cells at the end of the dedifferentiation protocol. Arrows indicate the presence of NS. Original magnification: $\times 10$, scale bar: 6 μm . (b–d) Quantification of the number of generated NS at the end of the dedifferentiation protocol for the four cell lines C, D, G and I in irradiated (3 Gy) or untreated (CTR) GBM cells kept in SCM medium. (b) NS were counted and results are expressed per 25-cm² flasks. Results are expressed as the means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the related control. (c) NS were also generated from differentiated cells through the use of a dilution assay at low density and were counted at different dilutions in each well of a 24-well plate. The results are shown for the C and I cell lines (20 000 cells/well). * $P < 0.05$. (d) Before the NS generation assay, A2B5-negative differentiated cells were sorted as described in the Materials and Methods section (A cell line). The generated primary NS were then counted at the end of the dedifferentiation protocol. Results are expressed as the means \pm S.E.M. of three independent experiments. * $P < 0.05$ (e and f) Primary NS were generated from differentiated cells with (f) or without (e) an optional FACS sorting of the A2B5-negative differentiated cells. These primary NS were subsequently dissociated and plated in 96-well plates at different low cell densities, to study their ability to generate secondary NS through limiting dilution assays. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the related CTR SCM condition. Representative phase-contrast photomicrographs were shown for each conditions (original magnification: $\times 4$, scale bar: 17 μm)

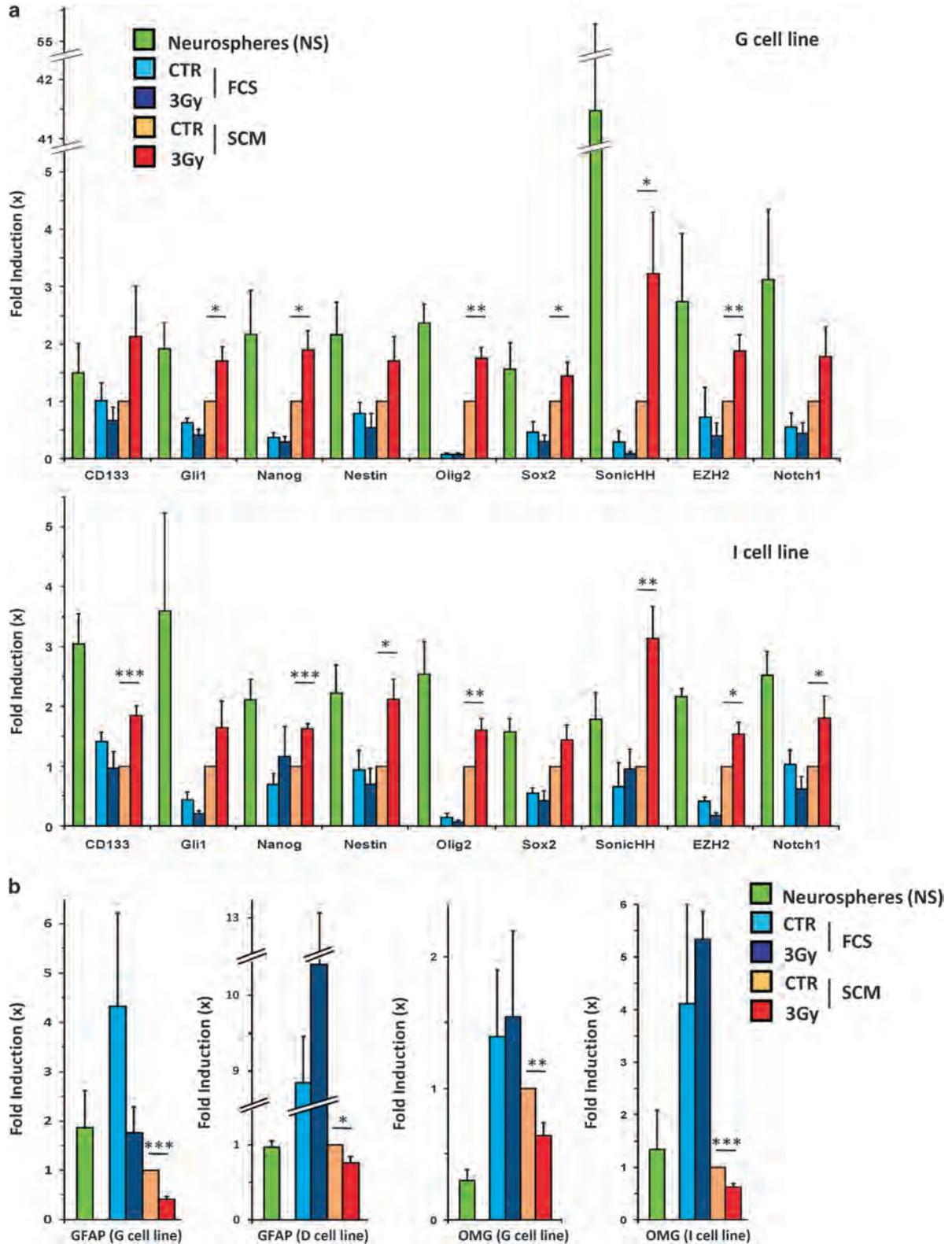


Figure 4 Overexpression of stemness markers and downregulation of differentiation markers at the RNA level in GBM cells after a 3-Gy irradiation. Differentiated GBM cells treated or not by a 3-Gy irradiation and placed 2 days after in either FCS or SCM medium for long-term culture were analyzed by real-time quantitative PCR (see Materials and Methods) at the end of the dedifferentiation protocol. RNA expression level of the indicated stem (a) or differentiation markers (b) in GBM-differentiated cells subjected to the dedifferentiation process for the indicated cell lines. The RNA expression levels of these different markers were also shown for NS cells as a control, as these NS are enriched in GSC. Shown are the fold inductions relative to the CTR SCM condition expressed as means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the related CTR SCM condition

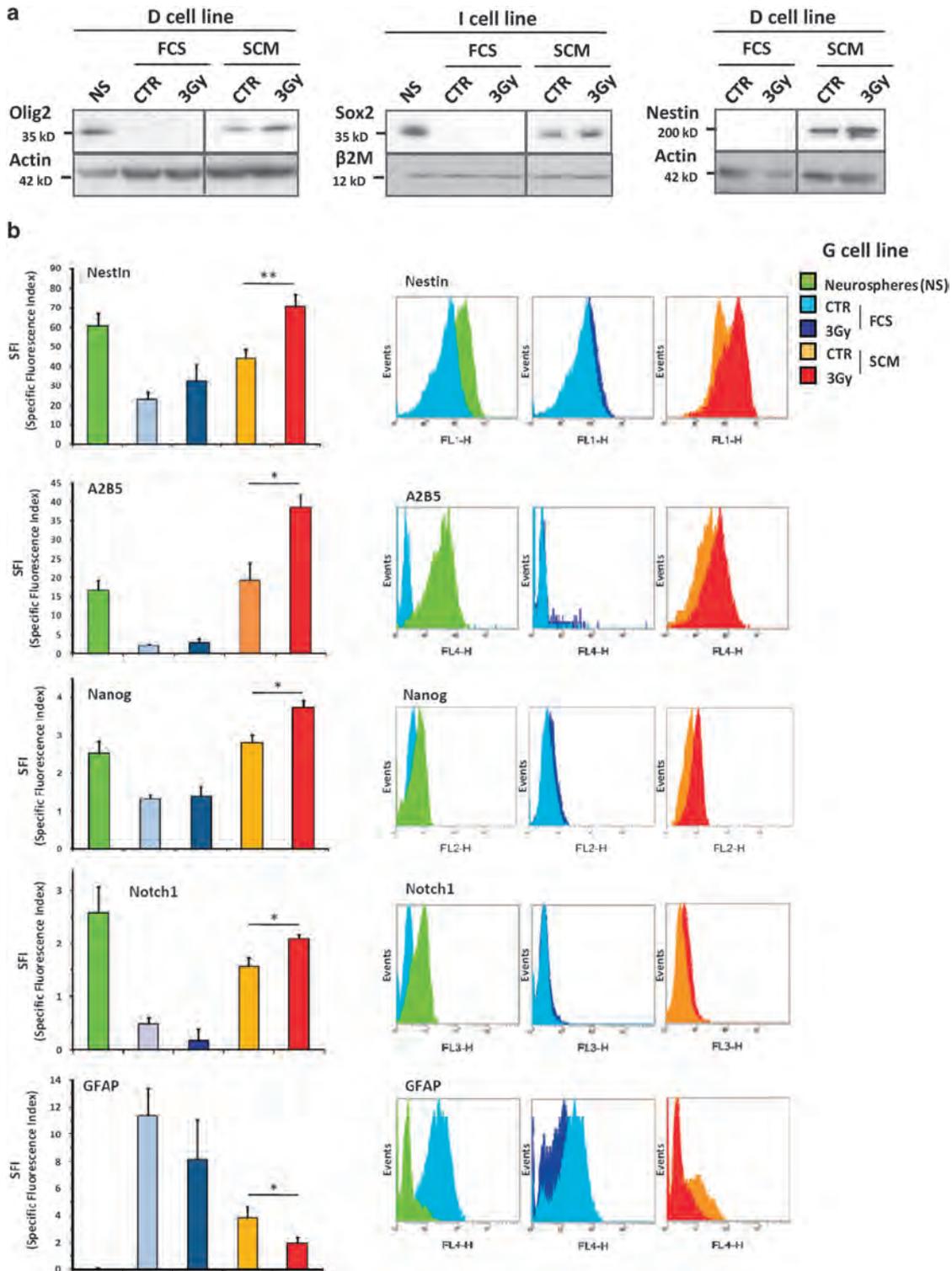


Figure 5 Overexpression of stemness markers and downregulation of differentiation marker at the protein level in GBM cells after a 3-Gy irradiation. Differentiated GBM cells treated or not by a 3-Gy irradiation and placed 2 days after in either FCS or SCM medium for long-term culture were analyzed either by western blotting (a) or FACS immunofluorescence (b) at the end of the dedifferentiation protocol. Protein expression levels in NS cells were shown as a control for the stem condition. (a) Western blotting analysis of the stem markers Olig2, Sox2 and Nestin. Equal gel loading and transfer efficiency were checked with anti-actin or β 2-microglobulin (β 2M) antibodies. Blots were representative of at least three independent experiments in the indicated cell line and were reproduced in all the cell lines. (b) Immunofluorescence analysis performed by FACS of the stem (Nestin, A2B5, Nanog and Notch1) and differentiation (GFAP) markers in the G cell line. The SFI allowed to evaluate the marker expression level (see Materials and Methods). Results are expressed as the means \pm S.E.M. of at least three independent experiments in the G cell line and were reproduced in all the cell lines. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the related CTR SCM condition. For each marker, some representative FACS plot overlays (NS versus CTR FCS, CTR FCS versus 3 Gy FCS and CTR SCM versus 3 Gy SCM) were depicted

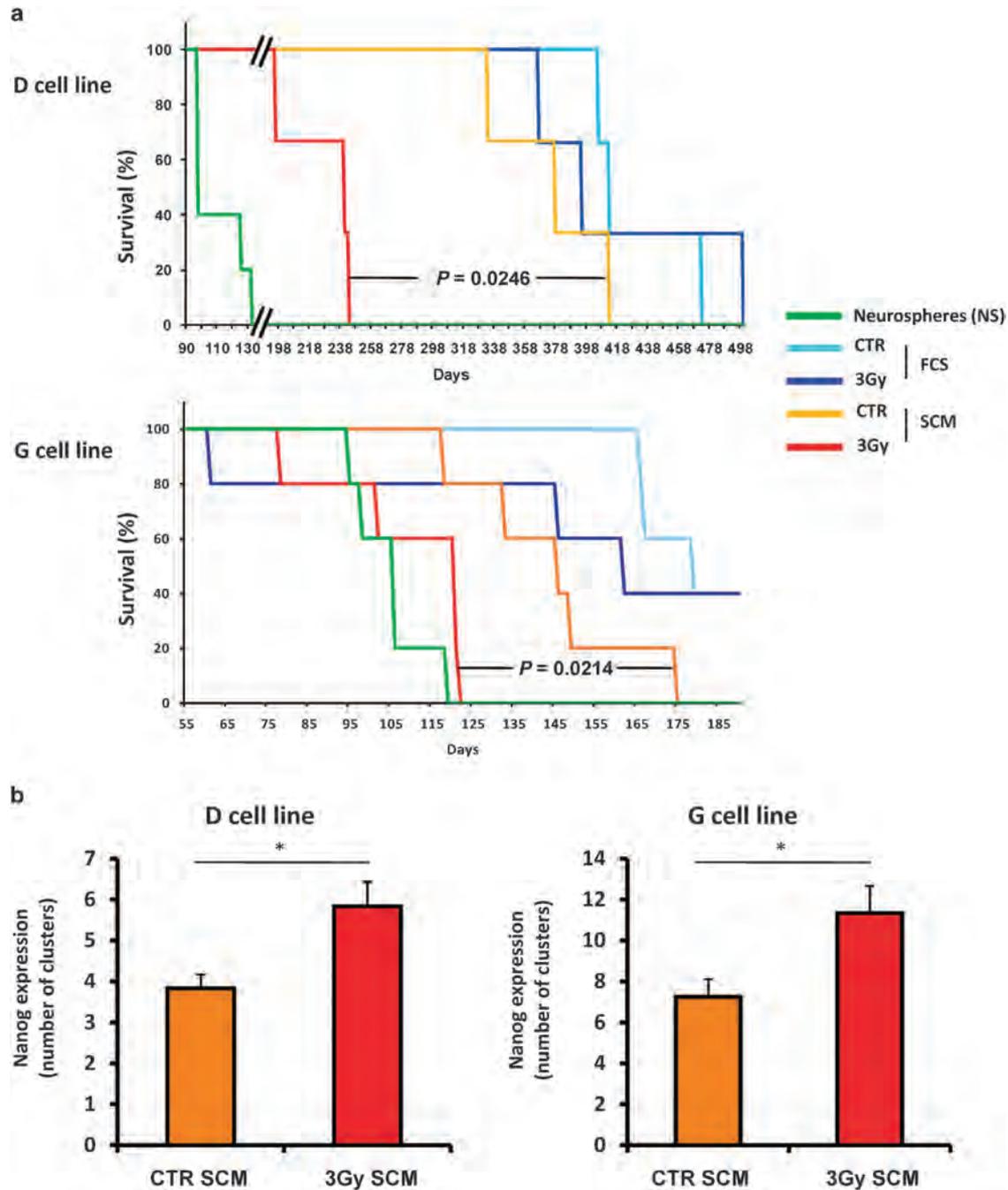


Figure 6 Increased *in vivo* tumorigenicity of 3-Gy-irradiated GBM cells placed in SCM for long-term culture. Differentiated GBM cells treated or not by a 3-Gy irradiation and placed 2 days after in either FCS or SCM medium for long-term culture were subsequently orthotopically xenografted in nude mice to evaluate their tumorigenic potential. NS cells were also injected as a control for the stem condition, as they are enriched in GSC. (a) Survival curves established in xenografted mice for the indicated injected cell line (three mice per group for the D cell line and five mice per group for the G cell line). Exact *P*-values between the 3-Gy SCM group and the related CTR SCM group are indicated in the figure, after log-rank analysis. (b) Immunohistochemistry (IHC) analysis of Nanog-positive cell clusters in the brain tumors of killed, xenografted mice for the CTR SCM and the 3-Gy SCM groups (D and G cell lines, three mice per group). Shown are means \pm S.E.M. **P* < 0.05

inhibitory role of the executioner caspases during apoptosis,⁶³ several other roles in the cell machinery such as the mitosis process⁶³ or the DNA-damage repair system.⁶⁴ Finally, survivin was also shown to be a major target of different pro-survival signaling pathways such as the PI3K/AKT axis and the HIF factors.⁶⁵ As AKT and HIFs were shown to sustain the stem-like GSC phenotype,^{23,24,66,67} this warrants future

studies to discover the interplay between IR, hypoxic signaling and AKT/survivin to install the GBM dedifferentiation process.

Altogether, our data demonstrate that a clinically relevant radiation dose, a key component of the conventional GBM treatment, can potentiate in differentiated GBM cells the acquisition of a stem-like phenotype associated with increased *in vitro* self-renewal capacity and *in vivo*

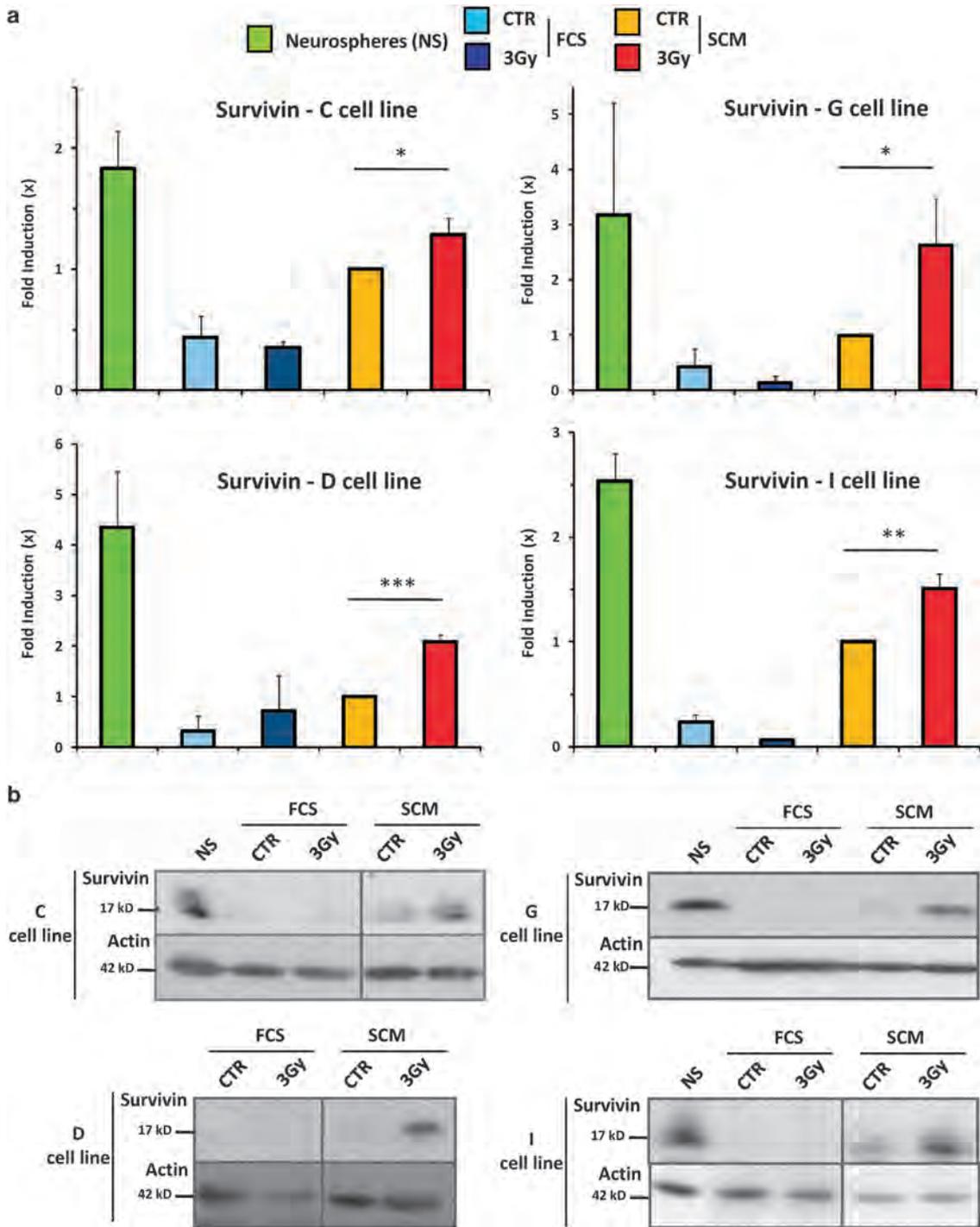
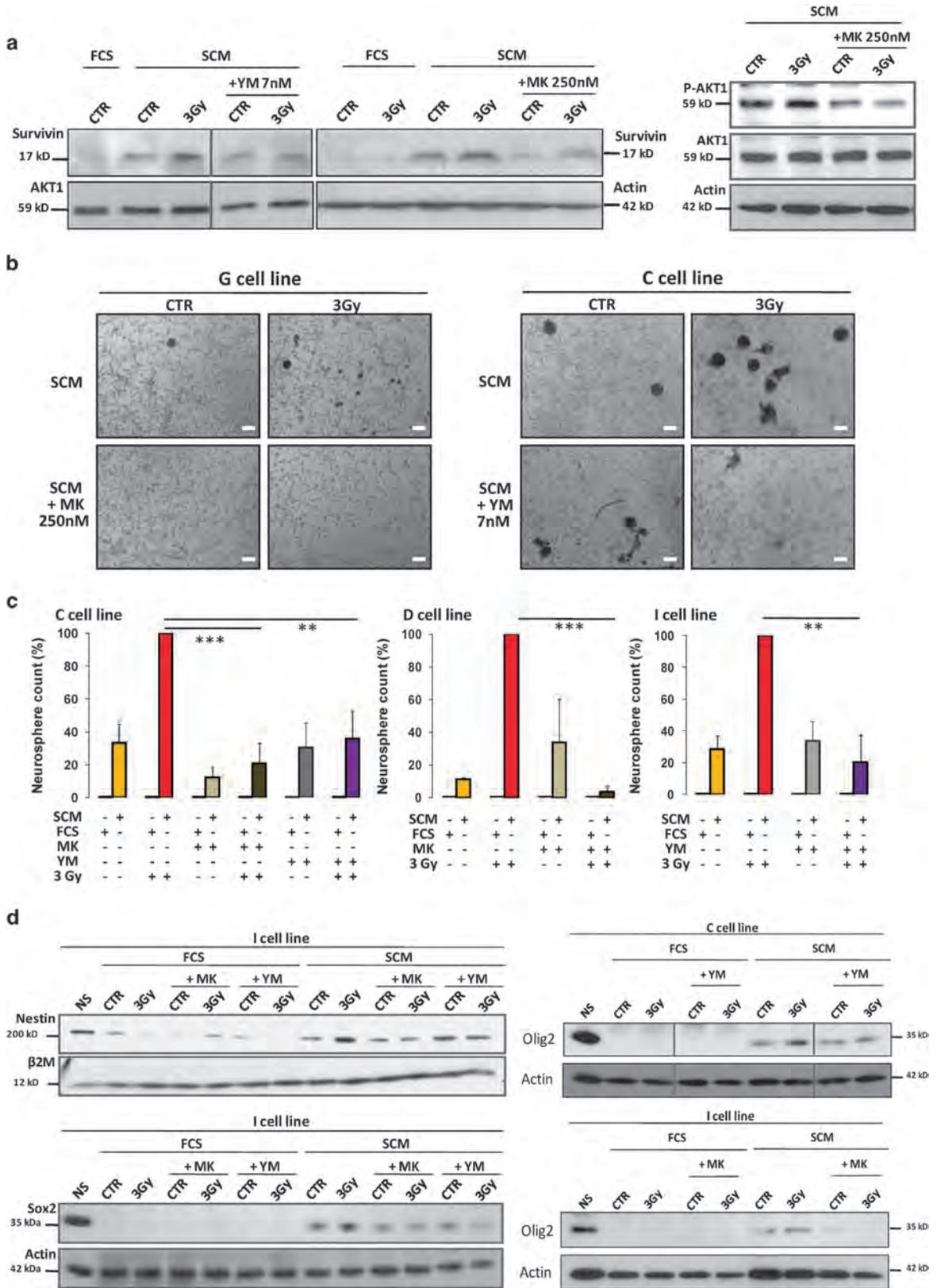


Figure 7 Overexpression of the anti-apoptotic protein survivin in 3-Gy-irradiated GBM-differentiated cells placed in SCM for long-term culture. Differentiated GBM cells treated or not by a 3-Gy irradiation and placed 2 days after in either FCS or SCM medium for long-term culture were analyzed for survivin expression either by real-time quantitative PCR (a) or western blotting (b) at the end of the dedifferentiation protocol and for the four different patient cell lines. RNA and protein expression levels for Survivin were also analyzed in NS cells as a control for the stem condition. (a) PCR results were expressed as fold inductions relative to the CTR SCM condition and shown as means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (b) Western blotting results were representative of at least three independent experiments for each cell line. Equal gel loading and transfer efficiency were checked with an anti-actin antibody

tumorigenesis. This plasticity process in response to IR appeared to be supported by survivin, known to be tightly associated with several stem-maintaining pathways. This survivin-mediated reprogramming to stemness could probably

contribute to the expansion of the GSC compartment after treatment and may favor the fast recurrence of these aggressive brain tumors. Setting up new clinical strategies to restrain this IR-induced dedifferentiation should be considered



for forthcoming trials, and on this basis the specific targeting of survivin may be an interesting approach.

Materials and methods

Human tumor collection. The study was conducted on newly diagnosed GBM tumor samples isolated from four different patients to establish four primary GSC cell lines (C, D, G and I). For FACS sorting experiments, a fifth GSC patient cell line was also used (A). These samples were all obtained after written informed consent from patients admitted to the Neurosurgery Department at Toulouse University Hospital and were processed in accordance with the Institution's Human Research Ethics Committee. Tumors used in this study were histologically diagnosed as grade IV astrocytoma according to the WHO criteria. All the results depicted in this study were obtained from at least three different independent experiments in the same cell line and were reproduced in all the other cell lines.

Cell culture. The GBM samples were processed as described by Avril *et al.*,⁶⁸ in order to obtain the corresponding primary NS cell lines shown by other groups to be enriched in GSC.²⁹ NS GSC lines were maintained in DMEM-F12 (Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with B27 and N2 (Invitrogen, Life Technologies, Saint Aubin, France), 25 ng/ml of FGF-2 and EGF (Peprotech, Neuilly sur Seine, France) at 37 °C in 5% CO₂ humidified incubators. All GSC lines were used for the experiments in this SCM medium between the second and twelfth passages, in order to avoid any stem cell characteristic loss. Forced differentiation was performed according to previous published protocol⁶⁹ adapted as follows. Briefly, the dissociated NS cells were cultured and plated as adherent monolayer (7.5×10^3 cells/cm²) in DMEM-F12 supplemented only with 10% FCS (FCS medium) on laminin ($1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for at least 15 days to ensure an optimum differentiation.

Irradiation-induced dedifferentiation protocol and NS generation assays. The differentiated cells were subjected or not to 3 (subtoxic dose) or 12 Gy (positive control for cell death and proliferation assays) (Gamma-cell Extractor 40, Nordion, Ottawa, ON, Canada). Two days post IR, cells were placed either in FCS or SCM medium to keep them differentiated or to favor the dedifferentiation process in a permissive stem medium, respectively (Figure 2a). Unless stated, cells were cultured until the appearance of a sufficient number of NS in the medium, corresponding to an average of 30 days after irradiation. For the experiments using the selective chemical inhibitors of survivin or AKT, 7 nM YM-155 (SelleckChem, Houston, TX, USA) or 250 nM MK-2206 (SelleckChem) were respectively added as a pretreatment 2 days before irradiation and then renewed with the cell medium every week. At the end of the protocol, cultures were observed by microscopy (Nikon Diaphot, Nikon, Champigny sur Marne, France) under a $\times 4$ or $\times 10$ objective and the primary NS were counted for each condition in the entire 25-cm² flask (Figures 3a and b). Next, the totality of the cells was collected after trypsinization for subsequent experiments. For adaptation of the limiting dilution NS generation assay, we plated differentiated cells in 24-cell plates at different low cell densities (2500–30 000 cells/well) before subjecting them to the long-term protocol. Generated primary NS were then counted by microscopy in each well (Figure 3c). When stated, differentiated cells could also be sorted by FACS analysis to select the A2B5-negative cell population before running the primary NS generation assay (Figure 3d).

Primary NS obtained at the end of the dedifferentiation protocol, with or without a preliminary FACS sorting of the differentiated cells, were dissociated and plated in 96-well plates (24 wells per condition) at different cellular densities (1–500 cells/well), in order to assess their ability to generate secondary NS through limiting dilution assays. After 15 days, secondary NS were counted by microscopy in each well.

Quantitative real-time RT-PCR. Total RNA was isolated either from primary NS, FCS-differentiated cells or from cells at the end of the dedifferentiation protocol using RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and then reverse-transcribed using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Real-time qPCR reactions were carried out using the Fluidigm 96.96 dynamic array integrated fluidic circuits and the Biomark HD System (Fluidigm, Les Ulis, France) according Advanced Development Protocol no. 37 (Toulouse GeT Platform). $\beta 2$ -Microglobulin was used as endogenous control in the ΔCt analysis. The different primers (Eurogentec, Angers, France) used in this study are described in Supplementary Table 1.

Immunohistochemistry. Immunohistochemistry was performed on the excised brains on paraffin-embedded sections (5 μm). For Nanog detection, only the brain samples displaying an equivalent tumor area of 70–80% of the total brain were selected, as determined by Hemalun–Eosin staining (Supplementary Figure 2a). Briefly, the sections were incubated for 90 min with an anti-Nanog antibody (Ab62734, Abcam, Paris, France). Slides were counterstained with hematoxylin and viewed on a Nikon microscope. Nanog-positive cell clusters were then counted in the tumor area.

Flow cytometry analyses. Direct immunofluorescence assay was performed by FACS as previously described.^{70,71} When required, collected cells were first subjected to a step of permeabilization using the cytofix/cytoperm kit (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). For all samples, 2×10^5 cells were then incubated for 30 min in PBS with 10% BSA at 4 °C to avoid nonspecific binding, and then incubated with appropriate conjugated primary antibodies for 40 min at 4 °C. Fluorescence related to immunolabeling was measured using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). The antibodies used are depicted in Supplementary Table 2. Each measurement was conducted on at least 7000 events, acquired on CellQuest software (BD Biosciences) and analyzed with VenturiOne software (Applied Cytometry, Sheffield, UK). To evaluate the marker expression, we determined the specific fluorescence index (SFI) using the mean fluorescence intensity (MFI). The SFI was calculated as previously described, with the following formula $\text{SFI} = (\text{MFI antibody} - \text{MFI isotype control}) / \text{MFI isotype control}$.⁷¹ The gating strategy used in these analyses is described in Supplementary Figure 3 and is based on a previously published protocol.⁷² For NS generation assay, a FACS sorting (Beckman MoFlo Astrios, Beckman Coulter, Villepinte, France) was performed when mentioned on GBM-differentiated cells (A cell line) before the assay, in order to only sort the differentiated population, which was characterized by (i) its specific FSC-H/SSC-H pattern (Gate C, see Supplementary Figure 3) and (ii) its negative expression of the stem marker A2B5, as previously described.^{4,73}

Western blotting. Cells were lysed in RIPA buffer complemented with cocktails of protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Twenty-five micrograms of proteins were then separated on a 10 or 12.5% SDS-PAGE, electroblotted onto PVDF membranes (Amersham, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France), which were blocked with 10% milk. The primary antibodies used for this study are listed in Supplementary Table 3.

Cell death and proliferation assays. Apoptotic cells were quantified using FACS analysis by determining the percentage of cells with subG1-DNA content. This subG1 population was analysed after cell permeabilization and subsequent PI staining, as previously described.⁷⁴ Apoptosis and necrosis were also quantified at the same time on non-permeabilized cells by flow cytometry, with an Alexa Fluor 488-conjugated AV and PI kit, according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Life Technologies). SubG1 and AV measurements were conducted on at least 10 000 events, acquired on CellQuest software (BD Biosciences) and analyzed with

Figure 8 Requirement of the IR-induced survivin overexpression for the dedifferentiation process in GBM cells. (a–d) Differentiated GBM cells were pre-treated for 24 h with either a survivin inhibitor (YM-155 7 nM) or an AKT inhibitor (MK-2206 250 nM) and then irradiated or not at 3 Gy before being placed 2 days after in either FCS or SCM medium, complemented or not with fresh YM-155 or MK-2206 inhibitors. (a) Western blot analysis of the effect of YM-155 and MK-2206 treatment on Survivin expression in GBM cells (I cell line) irradiated or not and kept in SCM medium for 1 additional week. Efficiency of MK-2206 toward AKT was also checked as a control by the blotting of phospho-AKT1 (pAKT1). (b and c) At the end of the dedifferentiation protocol, the effects of YM-155 and MK-2206 were measured on the NS generation potential in response to IR by NS counting in phase-contrast microscopy (original magnification: $\times 4$, scale bar: 17 μm) (b) and subsequent quantification in the indicated cell lines (c). Results are expressed as the means \pm S.E.M. of three independent experiments. $***P < 0.01$, $****P < 0.001$ compared with the 3-Gy SCM condition. (d) The involvement of Survivin in the IR-induced GBM reprogramming was checked by western blotting by analyzing the expression of the stem markers Nestin, Sox2 and Olig2 at the end of the dedifferentiation protocol in the presence or absence of YM-155 and MK-2206. Concerning western blottings, equal gel loading and transfer efficiency were checked with an anti-actin, AKT1 or $\beta 2$ -microglobulin ($\beta 2\text{M}$) antibody, and results were representative of at least three independent experiments on the indicated cell line and reproduced in all the cell lines

VenturiOne software (Applied Cytometry). The proliferation rate was finally analyzed using the WST-1 assay (Roche Diagnostics, Meylan, France) in 96-well microplates, as previously described.⁷⁰ The yellow formazan product formed by viable adherent cells was quantified by detection of its absorbance at 450 nm using a Multiskan Multisoft Labsystem spectrophotometer (ThermoFisher, Illkirch, France). For these cell death and proliferation assays, differentiated cells were treated or not with a 3- or 12-Gy irradiation, placed 2 days after either in FCS or SCM medium and collected for analysis 1 week after irradiation.

Orthotopic xenograft generation. Nude mice were housed in the Claudius Regaud Institute Animal Care-accredited facility and the Institution animal ethics committee approval was obtained for the use of the animal model and the study protocols. Orthotopic human GBM xenografts were established in 4- to 6-week-old female nude mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) as previously described.⁶⁸ Briefly, mice received a stereotaxically guided injection of either 1.75×10^5 (G cell line) or 2.5×10^5 cells (D cell line) collected at the end of the dedifferentiation protocol and resuspended in DMEM-F12. The injection was precisely located into the right forebrain (2 mm lateral and 1 mm anterior to the bregma at a 5-mm depth from the skull surface). In order to check the cell tumorigenicity, survival curves were established and mice were killed at the appearance of neurological signs. Excised brains were then collected for subsequent immunohistochemistry analysis.

Statistical analysis. The results are presented as means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. Significant differences ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$) were evaluated with the Student *t*-test. Log-rank analysis of Kaplan-Meier survival curves was used to evaluate the tumorigenesis of injected cells, with $P < 0.05$ considered as significantly different (Graphpad Prism v5, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Western blottings and FACS plots are representative of at least three different experiments in the same cell line and were reproduced in all the other cell lines.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We thank the Claudius Regaud Institute Anatomopathology service, Jean-José Maoret and Frédéric Martins at the Toulouse GeT Platform and Anne-Laure Iscache for her technical assistance on the FACS sorting. We also thank Laurence Huc and Nicolas Skuli for critically reading this manuscript. PD was supported by a PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and LM by a PhD fellowship from ITMO Cancer - Plan Cancer 2014. This research was funded by la Ligue Régionale Contre le Cancer (Hautes-Pyrénées, Lot and Haute-Garonne committees) (to AL), by the Groupe de Recherche de l'Institut Claudius Regaud (GRICR, to CT and ECJM) and by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

- Park DM, Sathornsumetee S, Rich JN. Medical oncology: treatment and management of malignant gliomas. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; **7**: 75–77.
- Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res* 2012; **22**: 457–472.
- Cheng L, Bao S, Rich JN. Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochem Pharmacol* 2010; **80**: 654–665.
- Tchoghadjian A, Baeza N, Colin C, Cayre M, Metellus P, Beclin C et al. A2B5 cells from human glioblastoma have cancer stem cell properties. *Brain Pathol* 2010; **20**: 211–221.
- Altaner C. Glioblastoma and stem cells. *Neoplasia* 2008; **55**: 369–374.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006; **444**: 756–760.
- Charles N, Holland EC. Brain tumor treatment increases the number of cancer stem-like cells. *Expert Rev Neurother* 2009; **9**: 1447–1449.
- Mannino M, Chalmers AJ. Radioresistance of glioma stem cells: intrinsic characteristic or property of the 'microenvironment-stem cell unit'? *Mol Oncol* 2011; **5**: 374–386.
- Facchino S, Abdouh M, Chatoou W, Bernier G. BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *J Neurosci* 2010; **30**: 10096–10111.
- Lim YC, Roberts TL, Day BW, Harding A, Kozlov S, Kijas AW et al. A role for homologous recombination and abnormal cell-cycle progression in radioresistance of glioma-initiating cells. *Mol Cancer Ther* 2012; **11**: 1863–1872.

- Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006; **5**: 67.
- Vellanki SH, Grabrucker A, Liebau S, Proepper C, Eramo A, Braun V et al. Small-molecule XIAP inhibitors enhance gamma-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma. *Neoplasia* 2009; **11**: 743–752.
- Kang KB, Zhu C, Wong YL, Gao Q, Ty A, Wong MC. Gefitinib radiosensitizes stem-like glioma cells: inhibition of epidermal growth factor receptor-Akt-DNA-PK signaling, accompanied by inhibition of DNA double-strand break repair. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012; **83**: e43–e52.
- Osuka S, Sampetean O, Shimizu T, Saga I, Onishi N, Sugihara E et al. IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. *Stem Cells* 2012; **31**: 627–640.
- Yoon CH, Kim MJ, Kim RK, Lim EJ, Choi KS, An S et al. c-Jun N-terminal kinase has a pivotal role in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity in glioma stem-like cells. *Oncogene* 2012; **31**: 4655–4666.
- Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang XF, White RR et al. Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells* 2010; **28**: 17–28.
- Hardee ME, Marciscano AE, Medina-Ramirez CM, Zagzag D, Narayana A, Lonning SM et al. Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor-beta. *Cancer Res* 2012; **72**: 4119–4129.
- Zhang M, Kleber S, Rohrich M, Timke C, Han N, Tuettenberg J et al. Blockade of TGF-beta signaling by the TGFbetaR-I kinase inhibitor LY2109761 enhances radiation response and prolongs survival in glioblastoma. *Cancer Res* 2011; **71**: 7155–7167.
- Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W et al. Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells* 2007; **25**: 2524–2533.
- Yang YP, Chang YL, Huang PI, Chiou GY, Tseng LM, Chiou SH et al. Resveratrol suppresses tumorigenicity and enhances radiosensitivity in primary glioblastoma tumor initiating cells by inhibiting the STAT3 axis. *J Cell Physiol* 2012; **227**: 976–993.
- Kim Y, Kim KH, Lee J, Lee YA, Kim M, Lee SJ et al. Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. *Lab Invest* 2012; **92**: 466–473.
- Jamal M, Rath BH, Tsang PS, Camphausen K, Tofilon PJ. The brain microenvironment preferentially enhances the radioresistance of CD133(+) glioblastoma stem-like cells. *Neoplasia* 2012; **14**: 150–158.
- Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 2009; **8**: 3274–3284.
- Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* 2009; **15**: 501–513.
- Hjelmeland AB, Wu Q, Heddleston JM, Choudhary GS, MacSwords J, Lathia JD et al. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 829–840.
- Charles N, Ozawa T, Squatrito M, Bleau AG, Brennan CW, Hambarzumyan D et al. Perivascular nitric oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells. *Cell Stem Cell* 2010; **6**: 141–152.
- Eyler CE, Wu Q, Yan K, MacSwords JM, Chandler-Militello D, Misuraca KL et al. Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2. *Cell* 2011; **146**: 53–66.
- Auffinger B, Tobias AL, Han Y, Lee G, Guo D, Dey M et al. Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death Differ* 2014; **21**: 1119–1131.
- Li Y, Li A, Glas M, Lal B, Ying M, Sang Y et al. c-Met signaling induces a reprogramming network and supports the glioblastoma stem-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 9951–9956.
- Helczynska K, Kronblad A, Jogi A, Nilsson E, Beckman S, Landberg G et al. Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ. *Cancer Res* 2003; **63**: 1441–1444.
- Jogi A, Ora I, Nilsson H, Poellinger L, Axelson H, Pahlman S. Hypoxia-induced dedifferentiation in neuroblastoma cells. *Cancer Lett* 2003; **197**: 145–150.
- Larvin O, Monferran S, Delmas C, Couderc B, Toulas C, Cohen-Jonathan-Moyal E. Radiation-induced mitotic cell death and glioblastoma radioresistance: a new regulating pathway controlled by integrin-linked kinase, hypoxia-inducible factor 1alpha and survivin in U87 cells. *Eur J Cancer* 2013; **49**: 2884–2891.
- Tabatabai G, Frank B, Mohle R, Weller M, Wick W. Irradiation and hypoxia promote homing of haematopoietic progenitor cells towards gliomas by TGF-beta-dependent HIF-1alpha-mediated induction of CXCL12. *Brain* 2006; **129**: 2426–2435.
- Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O et al. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science* 2012; **338**: 1080–1084.
- Kim MJ, Kim RK, Yoon CH, An S, Hwang SG, Suh Y et al. Importance of PKCdelta signaling in fractionated-radiation-induced expansion of glioma-initiating cells and resistance to cancer treatment. *J Cell Sci* 2011; **124**: 3084–3094.
- Suva ML, Riggi N, Janiszewska M, Radovanovic I, Provero P, Stehle JC et al. EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer Res* 2009; **69**: 9211–9218.

37. Wu Y, Richard JP, Wang SD, Rath P, Laterra J, Xia S. Regulation of glioblastoma multiforme stem-like cells by inhibitor of DNA binding proteins and oligodendroglial lineage-associated transcription factors. *Cancer Sci* 2012; **103**: 1028–1037.
38. Ernst A, Campos B, Meier J, Devens F, Liesenberg F, Wolter M et al. De-repression of CTGF via the miR-17-92 cluster upon differentiation of human glioblastoma spheroid cultures. *Oncogene* 2010; **29**: 3411–3422.
39. Mangiola A, Lama G, Giannitelli C, De Bonis P, Anile C, Lauriola L et al. Stem cell marker nestin and c-Jun NH2-terminal kinases in tumor and peritumor areas of glioblastoma multiforme: possible prognostic implications. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 6970–6977.
40. Shih AH, Holland EC. Notch signaling enhances nestin expression in gliomas. *Neoplasia* 2006; **8**: 1072–1082.
41. Venere M, Hamerlik P, Wu Q, Rasmussen RD, Song LA, Vasani A et al. Therapeutic targeting of constitutive PARP activation compromises stem cell phenotype and survival of glioblastoma-initiating cells. *Cell Death Differ* 2014; **21**: 258–269.
42. Nielsen JA, Maric D, Lau P, Barker JL, Hudson LD. Identification of a novel oligodendrocyte cell adhesion protein using gene expression profiling. *J Neurosci* 2006; **26**: 9881–9891.
43. Dirks PB. Brain tumour stem cells: the undercurrents of human brain cancer and their relationship to neural stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008; **363**: 139–152.
44. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N et al. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 123–129.
45. Zhou X, Zhou YP, Huang GR, Gong BL, Yang B, Zhang DX et al. Expression of the stem cell marker, Nanog, in human endometrial adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2011; **30**: 262–270.
46. Chakravarti A, Zhai GG, Zhang M, Malhotra R, Latham DE, Delaney MA et al. Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 2004; **23**: 7494–7506.
47. Iscrú E, Ahmed T, Coremans V, Bozzi Y, Caleo M, Conway EM et al. Loss of survivin in neural precursor cells results in impaired long-term potentiation in the dentate gyrus and CA1-region. *Neuroscience* 2013; **231**: 413–419.
48. Cui D, Xu Q, Wang K, Che X. Gli1 is a potential target for alleviating multidrug resistance of gliomas. *J Neurol Sci* 2010; **288**: 156–166.
49. Guvenc H, Pavlyukov MS, Joshi K, Kurt H, Banasavadi-Siddegowda YK, Mao P et al. Impairment of glioma stem cell survival and growth by a novel inhibitor for Survivin-Ran protein complex. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 631–642.
50. Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2009; **35**: 553–562.
51. Pal SK, Reckamp K, Yu H, Figlin RA. Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; **19**: 1355–1366.
52. Jeong JC, Kim MS, Kim TH, Kim YK. Kaempferol induces cell death through ERK and Akt-dependent down-regulation of XIAP and survivin in human glioma cells. *Neurochem Res* 2009; **34**: 991–1001.
53. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC 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* 2009; **10**: 459–466.
54. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; **352**: 987–996.
55. Sherriff J, Tamangani J, Senthil L, Cruickshank G, Spooner D, Jones B et al. Patterns of relapse in glioblastoma multiforme following concomitant chemoradiotherapy with temozolomide. *Br J Radiol* 2013; **86**: 20120414.
56. Campos B, Wan F, Farhadi M, Ernst A, Zeppernick F, Tagscherer KE et al. Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 2715–2728.
57. Zhuang W, Li B, Long L, Chen L, Huang Q, Liang Z. Induction of autophagy promotes differentiation of glioma-initiating cells and their radiosensitivity. *Int J Cancer* 2011; **129**: 2720–2731.
58. Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, Dekmezian C, Pajonk F. Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells* 2012; **30**: 833–844.
59. Ju JH, Yang W, Oh S, Nam K, Lee KM, Noh DY et al. HER2 stabilizes survivin while concomitantly down-regulating survivin gene transcription by suppressing Notch cleavage. *Biochem J* 2013; **451**: 123–134.
60. Wen K, Fu Z, Wu X, Feng J, Chen W, Qian J. Oct-4 is required for an antiapoptotic behavior of chemoresistant colorectal cancer cells enriched for cancer stem cells: effects associated with STAT3/Survivin. *Cancer Lett* 2013; **333**: 56–65.
61. Feng R, Zhou S, Liu Y, Song D, Luan Z, Dai X et al. Sox2 protects neural stem cells from apoptosis via up-regulating survivin expression. *Biochem J* 2013; **450**: 459–468.
62. Church DN, Talbot DC. Survivin in solid tumors: rationale for development of inhibitors. *Curr Oncol Rep* 2012; **14**: 120–128.
63. Coumar MS, Tsai FY, Kanwar JR, Sarvagalla S, Cheung CH. Treat cancers by targeting survivin: Just a dream or future reality? *Cancer Treat Rev* 2013; **39**: 802–811.
64. Reichert S, Rodel C, Mirsch J, Harter PN, Tomicic MT, Mittelbronn M et al. Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma. *Radiother Oncol* 2011; **101**: 51–58.
65. Kanwar JR, Kamalapuram SK, Kanwar RK. Targeting survivin in cancer: the cell-signalling perspective. *Drug Discov Today* 2011; **16**: 485–494.
66. Eyler CE, Foo WC, LaFiura KM, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition. *Stem Cells* 2008; **26**: 3027–3036.
67. Wei Y, Jiang Y, Zou F, Liu Y, Wang S, Xu N et al. Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 6829–6834.
68. Avril T, Vauleon E, Hamlat A, Saikali S, Etcheverry A, Delmas C 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* 2011; **22**: 159–174.
69. Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, Matsutani T, Masui K, Poulou M et al. Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 16062–16067.
70. Lemarie A, Morzadec C, Bourdonnay E, Fardel O, Vernhet L. Human macrophages constitute targets for immunotoxic inorganic arsenic. *J Immunol* 2006; **177**: 3019–3027.
71. Monferran S, Skuli N, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Cohen-Jonathan-Moyal E et al. Alpha5beta3 and alpha5beta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int J Cancer* 2008; **123**: 357–364.
72. Mlynarik V, Cudalbu C, Clement V, Marino D, Radovanovic I, Gruetter R. In vivo metabolic profiling of glioma-initiating cells using proton magnetic resonance spectroscopy at 14.1 Tesla. *NMR Biomed* 2012; **25**: 506–513.
73. Auvergne RM, Sim FJ, Wang S, Chandler-Militello D, Burch J, Al Fanek Y et al. Transcriptional differences between normal and glioma-derived glial progenitor cells identify a core set of dysregulated genes. *Cell Rep* 2013; **3**: 2127–2141.
74. Lemarie A, Huc L, Pazarentzos E, Mahul-Mellier AL, Grimm S. Specific disintegration of complex II succinate:ubiquinone oxidoreductase links pH changes to oxidative stress for apoptosis induction. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 338–349.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons licence, users will need to obtain permission from the licence holder to reproduce the material. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)

BIBLIOGRAPHIE

About I, Benouaich Amiel A, Attal M, Bertozzi A, Debove P, Bernard P (2013). Thésaurus de chimiothérapie neurologie mai 2013.

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

Albesiano E, Davis M, See AP, Han JE, Lim M, Pardoll DM *et al* (2010). Immunologic consequences of signal transducers and activators of transcription 3 activation in human squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **70**: 6467-76.

Altaner C (2008). Glioblastoma and stem cells. *Neoplasma* **55**: 369-74.

Ansiaux R, Dewever J, Gregoire V, Feron O, Jordan BF, Gallez B (2009). Decrease in tumor cell oxygen consumption after treatment with vandetanib (ZACTIMA; ZD6474) and its effect on response to radiotherapy. *Radiat Res* **172**: 584-91.

Assanah M, Lochhead R, Ogden A, Bruce J, Goldman J, Canoll P (2006). Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses. *J Neurosci* **26**: 6781-90.

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

Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB *et al* (2006b). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* **66**: 7843-8.

Barker FG, 2nd, Simmons ML, Chang SM, Prados MD, Larson DA, Sneed PK *et al* (2001). EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **51**: 410-8.

Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P *et al* (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* **56**: 159-75.

Benouaich-Amiel A, Simon JM, Delattre JY (2005). [Concomitant radiotherapy with chemotherapy in patients with glioblastoma]. *Bull Cancer* **92**: 1065-72.

Bianco C, Tortora G, Bianco R, Caputo R, Veneziani BM, Damiano V *et al* (2002). Enhancement of antitumor activity of ionizing radiation by combined treatment with the selective epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Clin Cancer Res* **8**: 3250-8.

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

Brandes AA, Stupp R, Hau P, Lacombe D, Gorlia T, Tosoni A *et al* (2010). EORTC study 26041-22041: phase I/II study on concomitant and adjuvant temozolomide (TMZ) and radiotherapy (RT) with PTK787/ZK222584 (PTK/ZK) in newly diagnosed glioblastoma. *Eur J Cancer* **46**: 348-54.

- Brion J (2003). Nitroso-urées médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers. *Traité de chimie thérapeutique* **6**: 151-76.
- Brown PD, Krishnan S, Sarkaria JN, Wu W, Jaeckle KA, Uhm JH *et al* (2008). Phase I/II trial of erlotinib and temozolomide with radiation therapy in the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group Study N0177. *J Clin Oncol* **26**: 5603-9.
- Cadirola S, Dutrillaux B (1984). Study of chromosome lesions induced by gamma-rays during the G2 and mitotic phases of the cell cycle. *Ann Genet* **27**: 154-7.
- Cairncross G, Wang M, Shaw E, Jenkins R, Brachman D, Buckner J *et al* (2012). Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol* **31**: 337-43.
- Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR *et al* (1998). Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* **90**: 1473-9.
- Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B *et al* (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* **11**: 69-82.
- Capper D, Weissert S, Balss J, Habel A, Meyer J, Jager D *et al* (2010). Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol* **20**: 245-54.
- Capper D, Zentgraf H, Balss J, Hartmann C, von Deimling A (2009). Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. *Acta Neuropathol* **118**: 599-601.
- Carpentier AC (2008). [Surgical resection of gliomas in 2008]. *Cancer Radiother* **12**: 676-86.
- Carra E, Barbieri F, Marubbi D, Pattarozzi A, Favoni RE, Florio T *et al* (2013). Sorafenib selectively depletes human glioblastoma tumor-initiating cells from primary cultures. *Cell Cycle* **12**: 491-500.
- Carrondo Cottin S (2008). Expression et localisation de la connexine 43 dans le glioblastome
- Chakravarti A, Wang M, Robins HI, Lautenschlaeger T, Curran WJ, Brachman DG *et al* (2013). RTOG 0211: a phase 1/2 study of radiation therapy with concurrent gefitinib for newly diagnosed glioblastoma patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **85**: 1206-11.
- Charles N, Holland EC (2009). Brain tumor treatment increases the number of cancer stem-like cells. *Expert Rev Neurother* **9**: 1447-9.
- Chavaudra J, Bridier A (2001). [Definition of volumes in external radiotherapy: ICRU reports 50 and 62]. *Cancer Radiother* **5**: 472-8.
- Cheng L, Bao S, Rich JN (2010). Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochem Pharmacol* **80**: 654-65.

Chinot OL, Barrie M, Frauger E, Dufour H, Figarella-Branger D, Palmari J *et al* (2004). Phase II study of temozolomide without radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme in an elderly populations. *Cancer* **100**: 2208-14.

Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R *et al* (2014). Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* **370**: 709-22.

Clement V, Dutoit V, Marino D, Dietrich PY, Radovanovic I (2009). Limits of CD133 as a marker of glioma self-renewing cells. *Int J Cancer* **125**: 244-8.

Clement V, Marino D, Cudalbu C, Hamou MF, Mlynarik V, de Tribolet N *et al* (2010). Marker-independent identification of glioma-initiating cells. *Nat Methods* **7**: 224-8.

Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK (1997). Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer* **79**: 1381-93.

Dahan P, Martinez Gala J, Delmas C, Monferran S, Malric L, Zentkowski D *et al* (2014). Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death Dis* **5**: e1543.

Daumas-Duport C, Varlet P, Tucker ML, Beuvon F, Cervera P, Chodkiewicz JP (1997). Oligodendrogliomas. Part I: Patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations: a study of 153 cases. *J Neurooncol* **34**: 37-59.

Delattre J, DEHAIS C, LOISEAU H, FEUVRET L (2012). REFERENTIEL de l'ANOCEF pour les GLIOMES de L'ADULTE, gliome de grade III. *Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française* 59.

Delmas C, End D, Rochaix P, Favre G, Toulas C, Cohen-Jonathan E (2003). The farnesyltransferase inhibitor R115777 reduces hypoxia and matrix metalloproteinase 2 expression in human glioma xenograft. *Clin Cancer Res* **9**: 6062-8.

Den RB, Kamrava M, Sheng Z, Werner-Wasik M, Dougherty E, Marinucchi M *et al* (2013). A phase I study of the combination of sorafenib with temozolomide and radiation therapy for the treatment of primary and recurrent high-grade gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **85**: 321-8.

Drappatz J, Norden AD, Wong ET, Doherty LM, Lafrankie DC, Ciampa A *et al* (2010). Phase I study of vandetanib with radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **78**: 85-90.

Dutertre G, Hoang-Xuan K, Ricard D (2010). Tumeurs intracrâniennes de l'adulte. *Traité de Médecine Arkos* **5**: 2.

Esnault M (2013a). Biopsies et biopsies stéréotaxiques du cerveau. *Glioblastome Association Michèle Esnault*

Esnault M (2013b). IRM classique, IRMF fonctionnel, IRMD dynamique de contraste DSC, DCE *Glioblastome Association Michèle Esnault*

Esnault M (2013c). Tep ou Pet-Scan (Scanner par image de rayons gamma). *Glioblastome Association Michèle Esnault*

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V *et al* (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* **343**: 1350-4.

Figarella-Branger D, Bouvier C (2005). [Histological classification of human gliomas: state of art and controversies]. *Bull Cancer* **92**: 301-9.

Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* **16**: 1472-87.

FitzGerald DB, Cosgrove GR, Ronner S, Jiang H, Buchbinder BR, Belliveau JW *et al* (1997). Location of language in the cortex: a comparison between functional MR imaging and electrocortical stimulation. *AJNR Am J Neuroradiol* **18**: 1529-39.

Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I (1987). Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 265-9.

Frenay M, Lebrun C, Mousseau M, Michallon A, Chatel M (1995). Principes généraux de la chimiothérapie des tumeurs neuroépithéliales primitives (TNEP) de l'adulte. *Neurology* **17-305-A-10**: 3.

Furois S (2005). Le scanner et l'IRM. *sciences ouest* **219**.

Geraud (2008). Les tumeurs intracrâniennes cours de neurologie Item 146.

Gerstner ER, Eichler AF, Plotkin SR, Drappatz J, Doyle CL, Xu L *et al* (2011). Phase I trial with biomarker studies of vatalanib (PTK787) in patients with newly diagnosed glioblastoma treated with enzyme inducing anti-epileptic drugs and standard radiation and temozolomide. *J Neurooncol* **103**: 325-32.

Gilbertson RJ, Rich JN (2007). Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer* **7**: 733-6.

Glantz M, Chamberlain M, Liu Q, Litofsky NS, Recht LD (2003). Temozolomide as an alternative to irradiation for elderly patients with newly diagnosed malignant gliomas. *Cancer* **97**: 2262-6.

Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM *et al* (1999). Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res* **59**: 3374-8.

Gupta VK, Jaskowiak NT, Beckett MA, Mauceri HJ, Grunstein J, Johnson RS *et al* (2002). Vascular endothelial growth factor enhances endothelial cell survival and tumor radioresistance. *Cancer J* **8**: 47-54.

Guyotat J, Signorelli F, Bret P (2005). [Usefulness of direct electrical stimulations during surgery for gliomas located within eloquent brain regions]. *Neurochirurgie* **51**: 368-78.

Haglund MM, Ojemann GA, Blasdel GG (1993). Optical imaging of bipolar cortical stimulation. *J Neurosurg* **78**: 785-93.

Harari PM, Huang SM (2002). Epidermal growth factor receptor modulation of radiation response: preclinical and clinical development. *Semin Radiat Oncol* **12**: 21-6.

Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN (2009). The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* **8**: 3274-84.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M *et al* (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **352**: 997-1003.

Helczynska K, Kronblad A, Jogi A, Nilsson E, Beckman S, Landberg G *et al* (2003). Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ. *Cancer Res* **63**: 1441-4.

Heron JF (2011). Principe du PetScan. *diagnostic du cancer*.

Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U *et al* (2004). A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14228-33.

Hottinger AF, Aissa AB, Espeli V, Squiban D, Dunkel N, Vargas MI *et al* (2014). Phase I study of sorafenib combined with radiation therapy and temozolomide as first-line treatment of high-grade glioma. *Br J Cancer* **110**: 2655-61.

Jaaskelainen J, Randell T (2003). Awake craniotomy in glioma surgery. *Acta Neurochir Suppl* **88**: 31-5.

Jiang Y, Uhrbom L (2012). On the origin of glioma. *Ups J Med Sci* **117**: 113-21.

Jogi A, Ora I, Nilsson H, Poellinger L, Axelson H, Pahlman S (2003). Hypoxia-induced dedifferentiation in neuroblastoma cells. *Cancer Lett* **197**: 145-50.

Kantor G, Loiseau H, Vital A, Mazon JJ (2001). [Gross tumor volume (GTV) and clinical target volume (CTV) in adult gliomas]. *Cancer Radiother* **5**: 571-80.

Karim AB, Maat B, Hatlevoll R, Menten J, Rutten EH, Thomas DG *et al* (1996). A randomized trial on dose-response in radiation therapy of low-grade cerebral glioma: European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Study 22844. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **36**: 549-56.

Karunanithi S, Sharma P, Kumar A, Khangembam BC, Bandopadhyaya GP, Kumar R *et al* (2013). 18F-FDOPA PET/CT for detection of recurrence in patients with glioma: prospective comparison with 18F-FDG PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **40**: 1025-35.

Kleihues P, Sobin LH (2000). World Health Organization classification of tumors. *Cancer* **88**: 2887.

Kombos T, Suess O, Kern BC, Funk T, Hoell T, Kopetsch O *et al* (1999). Comparison between monopolar and bipolar electrical stimulation of the motor cortex. *Acta Neurochir (Wien)* **141**: 1295-301.

- Lai A, Tran A, Nghiemphu PL, Pope WB, Solis OE, Selch M *et al* (2011). Phase II study of bevacizumab plus temozolomide during and after radiation therapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* **29**: 142-8.
- Lang D (1979). Capillary ultrastructure in human metastatic brain tumors. *J Neurosurg* **51**: 53-58.
- Lathia JD, Gallagher J, Myers JT, Li M, Vasani A, McLendon RE *et al* (2011). Direct in vivo evidence for tumor propagation by glioblastoma cancer stem cells. *PLoS One* **6**: e24807.
- Lecureur-Rolland V (2009). Etude fonctionnelle de la cellule: Cytométrie en flux. <http://www.med.univ-rennes1.fr>: 1-36.
- Levy S, Chapet S, Mazon JJ (2014). [Management of gliomas]. *Cancer Radiother* **18**: 461-7.
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V *et al* (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* **67**: 1030-7.
- Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S *et al* (2009). Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* **15**: 501-13.
- Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H *et al* (1985). Amplification and overexpression of the EGF receptor gene in primary human glioblastomas. *J Cell Sci Suppl* **3**: 161-72.
- Liu RG, Wang WJ, Song N, Chen YQ, Li LH (2006). Diazoxide preconditioning alleviates apoptosis of hippocampal neurons induced by anoxia-reoxygenation in vitro through up-regulation of Bcl-2/Bax protein ratio. *Sheng Li Xue Bao* **58**: 345-50.
- Lund-Johansen M, Bjerkvig R, Humphrey PA, Bigner SH, Bigner DD, Laerum OD (1990). Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in vitro. *Cancer Res* **50**: 6039-44.
- Matsumoto T, Tani E, Kaba K, Shindo H, Miyaji K (1991). Expression of P-glycoprotein in human glioma cell lines and surgical glioma specimens. *J Neurosurg* **74**: 460-6.
- Mazaux JM, Orgogozo JM (1982). [Analysis and quantitative study of language disorders in lesions of the left thalamus: thalamic aphasia]. *Cortex* **18**: 403-16.
- Mendelsohn J, Baselga J (2006). Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol* **33**: 369-85.
- Milano G, Magne N (2003). [Pharmacological consequences of the targeting of epidermal growth factor receptor]. *Bull Cancer* **90 Spec No**: S197-201.
- Mittler MA, Walters BC, Stopa EG (1996). Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. *J Neurosurg* **85**: 1091-4.

Mlynarik V, Cudalbu C, Clement V, Marino D, Radovanovic I, Gruetter R (2012). In vivo metabolic profiling of glioma-initiating cells using proton magnetic resonance spectroscopy at 14.1 Tesla. *NMR Biomed* **25**: 506-13.

Nabors LB, Fink KL, Mikkelsen T, Grujicic D, Tarnawski R, Nam do H *et al* (2015). Two cilengitide regimens in combination with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma and unmethylated MGMT gene promoter: results of the open-label, controlled, randomized phase II CORE study. *Neuro Oncol* **17**: 708-17.

Nabors LB, Mikkelsen T, Hegi ME, Ye X, Batchelor T, Lesser G *et al* (2012). A safety run-in and randomized phase 2 study of cilengitide combined with chemoradiation for newly diagnosed glioblastoma (NABTT 0306). *Cancer* **118**: 5601-7.

Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y *et al* (2001). p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* **11**: 159-68.

Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, Horstmann S, Jourde B, Fahey M *et al* (2004). Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol* **108**: 49-56.

Ortensi B, Setti M, Osti D, Pelicci G (2013). Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness. *Stem Cell Res Ther* **4**: 18.

Philippon J (2004). *Tumeurs cérébrales, du diagnostic au traitement. Astrocytomes et oligodendrogliomes*. 04/2004, 304pp.

Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G *et al* (2006). Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* **444**: 761-5.

Pourquier P (2011). [Alkylating agents]. *Bull Cancer* **98**: 1237-51.

Prados MD, Chang SM, Butowski N, DeBoer R, Parvataneni R, Carliner H *et al* (2009). Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. *J Clin Oncol* **27**: 579-84.

Quigley MR, Post C, Ehrlich G (2007). Some speculation on the origin of glioblastoma. *Neurosurg Rev* **30**: 16-20; discussion 20-1.

Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Friedman AH, Fuchs HE, Bigner DD *et al* (1995). Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* **10**: 2243-6.

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C *et al* (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**: 111-5.

Rich JN (2009). Brain tumor stem cell markers. In: Van Meir EG (ed). *CNS Cancer* Humana Press, Springer. pp 713-728.

Rich JN, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, Penne KL *et al* (2004). Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* **22**: 133-42.

Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ (2009). Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev* **35**: 553-62.

Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M *et al* (2009). Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *JAMA* **302**: 2127-34.

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* **19**: 183-232.

Sanson M, Taillibert S (2004). [Improving the prognosis of glioma]. *Presse Med* **33**: 1267.

Sarkaria JN, Galanis E, Wu W, Dietz AB, Kaufmann TJ, Gustafson MP *et al* (2010). Combination of temsirolimus (CCI-779) with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM) (NCCTG trial N027D) is associated with increased infectious risks. *Clin Cancer Res* **16**: 5573-80.

Sarkaria JN, Galanis E, Wu W, Peller PJ, Giannini C, Brown PD *et al* (2011). North Central Cancer Treatment Group Phase I trial N057K of everolimus (RAD001) and temozolomide in combination with radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **81**: 468-75.

Sartorius CJ, Berger MS (1998). Rapid termination of intraoperative stimulation-evoked seizures with application of cold Ringer's lactate to the cortex. Technical note. *J Neurosurg* **88**: 349-51.

Scaringi C, Enrici RM, Minniti G (2013). Combining molecular targeted agents with radiation therapy for malignant gliomas. *Onco Targets Ther* **6**: 1079-95.

Shaw E, Arusell R, Scheithauer B, O'Fallon J, O'Neill B, Dinapoli R *et al* (2002). Prospective randomized trial of low- versus high-dose radiation therapy in adults with supratentorial low-grade glioma: initial report of a North Central Cancer Treatment Group/Radiation Therapy Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* **20**: 2267-76.

Siegelin MD, Raskett CM, Gilbert CA, Ross AH, Altieri DC (2010). Sorafenib exerts anti-glioma activity in vitro and in vivo. *Neurosci Lett* **478**: 165-70.

Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB (2004a). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* **23**: 7267-73.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J *et al* (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**: 5821-8.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T *et al* (2004b). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**: 396-401.

Stewart LA (2002). Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* **359**: 1011-8.

Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* **7**: 392-401.

Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, Pica A, Maillard I, Maeder P *et al* (2002). Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* **20**: 1375-82.

Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong YK *et al* (2014). Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **15**: 1100-8.

Stupp R, Hegi ME, Neyns B, Goldbrunner R, Schlegel U, Clement PM *et al* (2010). 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* **28**: 2712-8.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ *et al* (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**: 987-96.

Stupp R, Reni M, Gatta G, Mazza E, Vecht C (2007). Anaplastic astrocytoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol* **63**: 72-80.

Tabatabai G, Frank B, Mohle R, Weller M, Wick W (2006). Irradiation and hypoxia promote homing of haematopoietic progenitor cells towards gliomas by TGF-beta-dependent HIF-1alpha-mediated induction of CXCL12. *Brain* **129**: 2426-35.

Taylor MD, Bernstein M (1999). Awake craniotomy with brain mapping as the routine surgical approach to treating patients with supratentorial intraaxial tumors: a prospective trial of 200 cases. *J Neurosurg* **90**: 35-41.

Tohma Y, Gratas C, Van Meir EG, Desbaillets I, Tenan M, Tachibana O *et al* (1998). Necrogenesis and Fas/APO-1 (CD95) expression in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**: 239-45.

van den Bent MJ, Brandes AA, Rampling R, Kouwenhoven MC, Kros JM, Carpentier AF *et al* (2009). Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *J Clin Oncol* **27**: 1268-74.

van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ *et al* (2006). Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol* **24**: 2715-22.

Walker MD, Alexander E, Jr., Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Jr., Mealey J, Jr. *et al* (1978). Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* **49**: 333-43.

Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang XF, White RR *et al* (2010). Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells* **28**: 17-28.

Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996). Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* **6**: 217-23; discussion 23-4.

Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae SS, Booth MF, Garkavtsev I *et al* (2004). Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* **6**: 553-63.

Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B (1987). Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6899-903.

Wu A, Wei J, Kong LY, Wang Y, Priebe W, Qiao W *et al* (2010). Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro Oncol* **12**: 1113-25.

Wurth R, Bajetto A, Harrison JK, Barbieri F, Florio T (2014). CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Front Cell Neurosci* **8**: 144.

Yang F, Brown C, Buettner R, Hedvat M, Starr R, Scuto A *et al* (2010). Sorafenib induces growth arrest and apoptosis of human glioblastoma cells through the dephosphorylation of signal transducers and activators of transcription 3. *Mol Cancer Ther* **9**: 953-62.

Yarden Y (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* **37 Suppl 4**: S3-8.

AUTEUR : ZENTKOWSKI David

TITRE en anglais: THERAPEUTIC MANAGEMENT OF GLIOMAS: PLACE OF THE RADIOTHERAPY AND FOCUS ON ITS EFFECTS ON GLIOMA CELL PHENOTYPIC STATUS IN VITRO.

RESUME en anglais:

Gliomas are the most frequent brain tumors and represent 1.3% of cancers occurring in humans, in 15th position. In 2005, the number of deaths linked to gliomas was about 3019 in France. This type of cancer can occur at all age ranges but a peak is observed around 70. The classification of gliomas acknowledged by the scientific community is the WHO classification which allows classifying gliomas in four grades of malignity, correlated to the disease prognostic and its therapeutic management. The classical glioma treatment associates 1 to 3 modalities: surgery, chemotherapy and radiotherapy. Despites this treatment, overall survival of patients developing a glioma, particularly grade IV, also called Glioblastoma, remains very low around 14 months. Indeed, these chemo- and radioresistant brain tumors recur almost systematically. Those considerations led the scientific community to study the different cellular and molecular causes of resistance to treatment, notably in a subpopulation of cancer stem-like cells discovered in glioblastomas around 20 years ago. These Glioblastoma stem-like cells are highly chemo- and radioresistant and could certainly contribute to the tumor recurrence. A better knowledge of this undifferentiated subpopulation within gliomas will allow in the coming years to setup a better therapeutic management of these brain tumors and then to increase the overall survival of patients with glioma.

AUTEUR : ZENTKOWSKI David

TITRE : PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES GLIOMES : IMPORTANCE DE LA RADIOTHERAPIE ET ETUDE DE SES EFFETS PHENOTYPIQUES IN VITRO

DIRECTEUR DE THESE : Dr LEMARIE Anthony

LIEU ET DATE DE LA SOUTENANCE : Le 16 juin 2015 à TOULOUSE

RESUME en français :

Les gliomes sont les tumeurs intracrâniennes du système nerveux central les plus fréquentes. Ils représentent 1.3% des cancers chez l'homme et la femme et se situent au 15^{ème} rang des cancers. En 2005 le nombre de décès dus aux gliomes représentait 3019 personnes en France. La survenue de ce cancer peut apparaître à tous les âges mais on retrouve un pic chez l'homme et la femme aux environs de 70 ans. La classification des gliomes reconnue au niveau scientifique est la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé. Elle permet de classer les gliomes en quatre grades de malignité croissante pouvant ainsi prédire l'évolution de la maladie et sa prise en charge thérapeutique. Cette prise en charge repose actuellement sur l'association de une à trois composantes, à savoir la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Malgré un traitement bien conduit, la survie des patients atteints de gliomes, et en particulier de gliomes de grade IV, appelés aussi glioblastomes (GBM), reste très faible, avec une survie moyenne de 14 mois. En effet, il se trouve que se sont des tumeurs très radio et chimiorésistantes, avec une récurrence quasi-systématique. Ceci a poussé les équipes de recherches actuelles à étudier les causes de cette résistance aux niveaux cellulaire et moléculaire, notamment vis-à-vis d'une sous-population de cellules cancéreuses dites « souches » découverte au sein des glioblastomes il y a une vingtaine d'années. En effet il a été montré que ces cellules souches de GBM jouent un rôle important dans la radio et chimiorésistance ainsi que dans la récurrence tumorale. Une connaissance plus approfondie de cette population cellulaire permettra dans un avenir proche de proposer une meilleure prise en charge thérapeutique de ces tumeurs cérébrales et ainsi d'augmenter la survie globale des patients atteints de gliomes.

TITRE ET RESUME EN ANGLAIS : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : Cancérologie

MOTS-CLES : Gliome, radiothérapie, radiorésistance, chimiorésistance, plasticité, cellules souches cancéreuses

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Equipe de radiorésistance tumorale dirigée par le Pr Elizabeth COHEN-JONATHAN MOYAL
UMR1037 - INSERM - CRCT - ICR
2 avenue Hubert Curien, ONCOPELE, entrée C, 31100 TOULOUSE

DIRECTEUR DE THESE : Dr LEMARIE Anthony
