HAL
open science

Utilisation d'une approche de chimie biologie intégrative dans la recherche de nouvelles molécules actives sur la prolifération et la différenciation des cellules souches cancéreuses

Marie Feve

To cite this version:

Marie Feve. Utilisation d'une approche de chimie biologie intégrative dans la recherche de nouvelles molécules actives sur la prolifération et la différenciation des cellules souches cancéreuses. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ075 . tel-00804357

HAL Id: tel-00804357

https://theses.hal.science/tel-00804357

Submitted on 25 Mar 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (UMR 7200)

THÈSE

présentée par : **Marie FEVE**

soutenue le : **29 juin 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Sciences du Vivant,
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Utilisation d'une approche de chimie biologie intégrative dans la recherche de nouvelles molécules actives sur la prolifération et la différenciation des cellules souches cancéreuses

THÈSE dirigée par :

Pr KILHOFFER Marie-Claude	Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr AL-DACCAK Reem	Chargée de recherche, Hôpital St-Louis, Paris
Dr CRESTEIL Thierry	Directeur de recherche, Université Paris Sud

---

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr ZENIOU Maria	Maître de conférences, Université de Strasbourg
Dr CHNEIWEISS Hervé	Directeur de recherche, Université Paris Descartes
Dr ROBINET Eric	Chargé de recherche, Université de Strasbourg

ABREVIATIONS :

7-AAD	7 amino-actinomycine D
ABC	ATP-binding cassette
ACTB	actine bêta
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	adénosine diphosphate
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
ATM	ataxia telengectasia mutation
ATP	adénosine triphosphate
BAI	inhibiteur spécifique de l'angiogenèse cérébrale
BCRP	protéine de résistance aux cancers du sein
bFGF	facteur de croissance de base des fibroblastes
BMP	protéine morphogène de l'os
CAF	fibroblastes associés aux cancers
CALCRL	récepteur à la calcitonine-like
CCKBR	récepteur de la cholecystokinine
CDK4	kinase dépendant des cyclines 4
CDxx	"cluster" de différenciation n° xx
Chk	checkpoint kinase
CHRM	récepteur cholinergique muscarinique
CNV	copy number variation
CO_2	dioxyde de carbone
CREB	protéine de liaison aux éléments de réponse à l'AMPc
CSC	cellules souches cancéreuses
CSN	cellules souches neurales
CXCR	récepteur à chimiokine à motif C-X-C
DDPM	déacétylbisacodyl
DEPC	pyrocarbonate d'éthyle
DMEM/F12	dubelcco's modified eagle medium nutrient mixture F12
DMSO	diméthylsulfoxide
EC50	concentration effective à 50%
EDGx	récepteur couplé aux protéines G de différenciation de l'endothélium
EDNRB	récepteur à l'endothéline de type B
EdU	éthynyl désoxyribo-uracile
EGF	facteur de croissance de l'épiderme
EGFR	récepteur du facteur de croissance de l'épiderme
F2R	récepteur de la thrombine
F2RL2	récepteur thrombine-like
FBS	sérum de veau fœtal
f-NSC	cellules souches neurales normales fœtales
FZD	Frizzled
GABBR1	récepteur B1 de l'acide gamma-aminobutyrique
GAPDH	glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

GBX2	protéine homéobox spécifique de la gastrulation dans le cerveau
GDP	guanosine diphosphate
GFAP	glial fibrillary acid protein
GLI	homologue de l'oncogène associé aux gliomes
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GPRxx	récepteur couplé aux protéines G n°xx
GSC-xxx	composé dérivé du bisacodyl
GSK3	kinase 3 de la gycogène synthase
GTP	guanosine triphosphate
Gy	Gray
HA	astrocytes humains
HEK	lignée cellulaire de rein embryonnaire
hERG	"ether à-go-go"humain
HGF	facteur de croissance des hépatocytes
HIF	facteur inducible de l'hypoxie
HRH2	récepteur histaminique H2
IDH1	isocitrate déshydrogénase
IGFR	récepteur du facteur de croissance insuline-like
IPC	cellules progénitrice intermédiaire
LOH	perte d'hétérozygotie
LPHN1/2	latrophiline 1/2
MA	Manteau
MAPK	kinase des protéines activées par les mitogènes
MC1R	récepteur 1 à la mélanocortine
MDM2	oncogène double minute de la souris
MDR	multi-drug resistance
MGMT	méthyle guanine méthyle transférase
miR	micro-ARN
MMP	métallo protéases matricielles
mTOR	cible de la rapamycine chez les mammifères
Multi-FISH	hybridation multi-fluorescence *in situ*
MZ	zone marginale
ND	non déterminé
NE	neuroépithélium
NES	Nestine
NICD	domaine intracellulaire de Notch
nIPC	précurseur intermédiaire des neurones
NO	oxyde nitrique
NOD/SCID	non obese diabetic / severe combined immunodeficiency
NS34	milieu de culture des cellules souches cancéreuses
OB1	cellules souches cancéreuses OB1
oIPC	précurseur intermédiaire des oligodendrocytes
Olig2	facteur de transcription 2 des oligodendrocytes
OMS	organisation mondiale de la santé
P	cellules en condition de prolifération
PARP	poly(ADP-ribose) polymérase

Pax	paired-box
PBS	tampon phosphate-salin
PCR	réaction de polymérisation en chaine
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGFR	récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGK1	phosphoglycérate kinase 1
pH	potentiel d'hydrogène
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PODXL	podocaxyline-like
POLR2A	grande sous-unité de l'ARN polymérase II
PTEN	phosphatase and tensin homolog
Q16	cellules en condition de quiescence à 16 jours
RAS	sarcome de rat
Rb	rétinoblastome
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
RG	cellules de la glie radiaire
RPLP0	protéine P0 de la grande sous-unité 60s du ribosome
RT-PCR	transcription inverse suivie d'une PCR
SDF1	= CXCL12, facteur dérivé des cellules stromales 1
SEMA3A	sémaphorine 3A
Shh	sonic hedgehog
SIDA	syndrome de l'immunodéficience acquise
SMAD	mother against dpp
SMO	Smoothened
SNP	single nucleotide polymorphism
SOD	superoxyde dismutase
Sox	sex determining region Y-box
SREB	récepteur exprimé dans le cerveau et super conservé
SVZ	zone subventriculaire
T.N.M.	tumeur, nodule lymphatique, métastases
TCF	facteur des cellules T
TEM	transition epithélio-mésenchymateuse
TERT	Télomérase
TFRC	récepteur de la transferrine
TG1	cellules souches cancéreuses TG1
TG16	cellules souches cancéreuses TG16
TGF	facteur de croissance des tumeurs
TGNM	tumeur glio neuronale maligne
TME	transition mésenchymo-épithéliale
TP53	protéine tumorale 53
U-87 MG	lignée cellulaire de glioblastomes
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VN1R1	récepteur voméronasal 1
VZ	zone ventriculaire
Wnt	site d’intégration « sans-aile »

TABLE DES MATIERES :

1. INTRODUCTION 7

1.1. Le cerveau : structure et genèse 7
1.1.1. Histologie du cerveau humain 7
1.1.2. Les cellules souches neurales 9

1.2. Tumeurs cérébrales : gliomes et glioblastomes 12
1.2.1. Classification des gliomes 12
1.2.2. Les glioblastomes 14
1.2.2.1. Incidence et diagnostic 16
1.2.2.2. Facteurs de risque 17
1.2.2.2.1. Facteurs de risque extrinsèques 17
1.2.2.2.2. Facteurs de risque intrinsèques 18
1.2.2.3. Traitements des glioblastomes 19
1.2.2.3.1. Traitement standard 19
1.2.2.3.2. Essais Cliniques 20

1.3. Cancer et cellules souches cancéreuses 22
1.3.1. Historique des cellules souches cancéreuses 24
1.3.2. Cellules à l'origine des cancers et cellules souches cancéreuses 25
1.3.3. Propriétés des cellules souches cancéreuses 28
1.3.3.1. Auto-renouvellement et différenciation 29
1.3.3.2. Résistance des cellules souches cancéreuses aux traitements anti-tumoraux. 30
1.3.3.2.1. Mécanismes de résistance à la radiothérapie 30
1.3.3.2.2. Mécanisme de résistance aux chimiothérapies 31
1.3.3.3. Quiescence des CSC 32
1.3.3.4. Hypoxie et acidité du microenvironnement tumoral 34
1.3.3.5. Cellules souches cancéreuses et nouveau paradigme en cancérologie 36

1.4. Les cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes 37
1.4.1. Mise en évidence des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes 37
1.4.2. Caractéristiques des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes 38
1.4.2.1. Marqueurs spécifiques des cellules souches issues de glioblastomes. 39
1.4.2.2. Mécanismes régissant la prolifération, la différenciation et la survie des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes 40
1.4.2.2.1. La voie Notch 40
1.4.2.2.2. La voie Sonic Hedgehog 41
1.4.2.2.3. La voie Wnt/β-caténine 42
1.4.2.2.4. Les voies de signalisation des facteurs de croissance 43
1.4.2.3. Conclusions sur les caractéristiques moléculaires des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes 45

1.5. Identification de molécules actives sur les cellules souches cancéreuses par criblage de chimiothèques 46

2. CARACTERISATION DES CSC 55

2.1. Résultats sur la caractérisation des CSC 56
2.1.1. Formation des neurosphères 56
2.1.2. Caractérisation moléculaire des CSC, comparaison par rapport aux autres cellules en culture 60
2.1.2.1. Etude de la variation génomique au cours des passages cellulaires 60

2.1.2.2. Etude de la transcription de gènes impliqués dans le caractère souche des cellules ou dans la différenciation de la lignée neurale 66

2.2. Discussion sur la caractérisation des CSC 72
2.2.1. Formation des neurosphères 73
2.2.2. Caractérisation moléculaire 74
2.2.2.1. Caractérisation génétique des cellules TG1 74
2.2.2.2. Expression de marqueurs de l'état souche et de la lignée neurale dans les cellules étudiées 77

2.3. Conclusions 80

3. ETUDE DU TRANSCRIPTOME RCPG DES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES.. 84

3.1. Les RCPG 84
3.1.1. Voies de signalisation des RCPG 85
3.1.2. Les RCPG : des cibles thérapeutiques 87
3.1.2.1. RCPG et cancers 87
3.1.2.2. RCPG et cellules souches 89

3.2. Etude du transcriptome RCPG dans les CSC 91
3.2.1. Répertoire des RCPG exprimés dans deux lignées de cellules souches cancéreuses de glioblastomes. Comparaison à l'expression dans d'autres lignées de cellules cancéreuses et non cancéreuses. 93
3.2.1.1. Gènes exprimés dans les cinq types cellulaires testés 98
3.2.1.2. Gènes exprimés préférentiellement dans les cellules à caractère souche 100
3.2.1.3. Gènes exprimés dans les cellules souches cancéreuses 103
3.2.2. Evolution du répertoire RCPG au cours de la mise en quiescence des cellules souches cancéreuses TG1. Recherche de biomarqueurs de l'état de quiescence. 105

3.3. Discussion de l'étude du transcriptome RCPG 111
3.3.1. Identification de gènes spécifiques des différents types cellulaires 112
3.3.2. Variation du transcriptome RCPG lors de la mise en quiescence des cellules TG1 117

3.4. Conclusions et perspectives 125

4. RECHERCHE DE MOLECULES ACTIVES SUR LES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES DE GLIOBLASTOMES 128

4.1. Criblage primaire de la chimiothèque Prestwick® 129

4.2. Criblage secondaire de la chimiothèque Prestwick® 133

4.3. Courbes dose-réponse des touches confirmées de la chimiothèque Prestwick® 137
4.3.1. Molécules connues pour leurs activités sur des lignées cellulaires cancéreuses 142
4.3.2. Molécules actives sur les cellules souches de glioblastomes, mais non connues pour leur effet sur des cellules cancéreuses 151

4.4. Le bisacodyl et ses dérivés 153
4.4.1. Effet du bisacodyl et de son métabolite actif sur les cellules souches cancéreuses de glioblastomes 154
4.4.1.1. Courbes doses-réponses du bisacodyl sur les CSC 154
4.4.1.2. Stabilité du bisacodyl 156
4.4.1.3. Effet du désacétylbisacodyl sur les cellules souches cancéreuses 158
4.4.1.4. Cinétique d'action du bisacodyl et du DDPM 159
4.4.1.5. Suivi de différents paramètres relatifs aux cellules et au milieu de culture dans les conditions de mise en quiescence : quiescence, viabilité cellulaire et pH du milieu de culture 161
4.4.1.6. Croisement des milieux des cellules TG1 proliférantes et quiescentes 162

4.4.1.7. Changement du pH des milieux des cellules TG1 proliférantes et quiescentes 163
4.4.1.8. Effet apoptotique du DDPM sur les cellules TG1 165
4.4.1.9. Effet du DDPM sur les cellules f-NSC, U-87 MG et HA en milieu acide 168
4.4.2. Etude de relation structure-activité 170
4.4.2.1. Importance des groupements R1 et R2 171
4.4.2.2. Importance de l'azote de la pyridine 176

4.5. Discussions / Perspectives 178

5. CONCLUSIONS / PERSPECTIVES 187

⇒ Interférer avec le réseau de signalisation des cellules tumorales 191

6. MATERIELS ET METHODES 196

6.1. Culture cellulaire 196
6.1.1. Les cellules TG1, TG16 et OB1 196
6.1.1.1. Conditions de culture des cellules 196
6.1.1.2. Congélation des cellules 197
6.1.1.3. Décongélation des cellules 198
6.1.1.4. Mise en quiescence des cellules 198
6.1.2. Les cellules souches neurales fœtales 198
6.1.3. Les astrocytes humains 199
6.1.4. La lignée cellulaire U-87 MG 200
6.1.5. La lignée cellulaire HEK 293 201

6.2. Contrôle de la stabilité génomique 202
6.2.1. Extraction de l'ADN 202
6.2.2. Contrôle de la qualité de l'ADN 202
6.2.3. Analyse du génome 202

6.3. Extraction et contrôle des ARN 202
6.3.1. Extraction des ARN totaux 202
6.3.2. Contrôle de la qualité des ARN 203

6.4. RT-PCR Quantitatives 203
6.4.1. Rétrotranscription 203
6.4.2. PCR quantitative 204
6.4.2.1. PCR quantitative à partir des cartes TaqMan® 204
6.4.2.2. PCR quantitative à partir des essais TaqMan® 205
6.4.2.3. Analyse des résultats de qPCR 206

6.5. Analyse de la quiescence des cellules 206

6.6. Criblage de la chimiothèque Prestwick® 208
6.6.1. La mise au point du criblage 210
6.6.2. Le criblage primaire 210
6.6.2.1. Préparation des cellules 210
6.6.2.2. Préparation des composés et traitement des cellules 211
6.6.2.3. Lecture des résultats 211
6.6.2.4. Analyse des résultats 212
6.6.3. Le criblage secondaire 213
6.6.3.1. Préparation des cellules 213
6.6.3.2. Préparation des composés et traitement des cellules 213
6.6.3.3. Lecture et analyse des résultats 213
6.6.4. Courbes dose-réponse 214

6.6.4.1. Préparation des cellules 214
6.6.4.1.1. Préparation des cellules souches cancéreuses..... 214
6.6.4.1.2. Préparation des cellules f-NSC 214
6.6.4.1.3. Préparation des cellules HEK, HA, et U-87 MG..... 215
6.6.4.2. Préparation des composés 215
6.6.4.3. Lecture et analyse des résultats 215

6.7. Etude de l'apoptose des cellules TG en réponse à une molécule 216

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES : 220

ANNEXE I : Liste des gènes des cartes TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array Card d'Applied Biosystems 244

ANNEXE II : Liste des gènes des cartes RCPG TaqMan® Array Card d'Applied Biosystem. 248

ANNEXE III : Expression des gènes des cartesTaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array Card d'Applied Biosystems 261

ANNEXE IV : Expression des gènes des RCPG TaqMan® Array Card d'Applied Biosystem pour tous les types cellulaires 263

ANNEXE V : Variation de l'expression des gènes des RCPG TaqMan® Array Card d'Applied Biosystem pour les cellules souches cancéreuses de glioblastome TG1 lors de leur mise en quiescence 267

ANNEXE VI : Courbes doses-réponse des molécules issues du criblage sur les cellules souches cancéreuses TG16 en prolifération et en quiescence. 269

ANNEXE VII : Courbes dose-réponse des molécules issues du criblage, sur les cellules souches cancéreuses OB1 en prolifération et en quiescence. 271

ANNEXE VIII : Courbes dose-réponse des molécules issues du criblage sur les cellules souches neurales fœtales f-NSC. 273

ANNEXE IX : Courbes dose-réponse des composés issus du criblage sur les cellules HEK. 275

ANNEXE X : Courbes dose-réponse des composés issus du criblage, sur la lignée cellulaire de glioblastome U-87 MG. 277

ANNEXE XI : Courbes dose-réponse des composés issus du criblage, sur les astrocytes humains (HA). 279

ANNEXE XII : High-throughput screening identifies bisacodyl as potently cytotoxic towards glioblastoma stem cells in an acidic pH environment 282

ANNEXE XIII : BREVET : Bisacodyl et dérivés comme médicament destiné au traitement du cancer. 283

ANNEXE XIV : Liste des autres publications 285

ANNEXE XV : CV 286

TABLE DES ILLUSTRATIONS :

⇨ FIGURES :

Figure 1 : Anatomie du cerveau. 8
Figure 2 : Le développement cérébral. 10
Figure 3 : Zones des cellules souches neurales. 11
Figure 4 : Distribution de toutes les tumeurs primitives du cerveau et du système nerveux central. 12
Figure 5 : Principales différences génétiques entre les glioblastomes primaires et secondaires. 15
Figure 6 : Répartition des différents types de gliomes 17
Figure 7 : Répartition des études cliniques sur les glioblastomes dans le monde. 20
Figure 8 : Modèles expliquant l'hétérogénéité cellulaire des tumeurs. 23
Figure 9 : La plasticité cellulaire 27
Figure 10 : Cellule d'origine et cellule souche cancéreuse. 28
Figure 11 : Caractéristique des cellules souches : les divisions symétriques et asymétriques 30
Figure 12 : Comparaison du cycle cellulaire des cellules proliférantes et des cellules quiescentes. 33
Figure 13 : Paradigme des cellules souches cancéreuses. 36
Figure 14 : Schéma simplifié de la voie Notch. 41
Figure 15 : Schéma simplifié de la voie Sonic Hedgehog. 42
Figure 16 : Schéma simplifié de la voie Wnt/β-caténine. 43
Figure 17: Schéma simplifié de la voie de signalisation des facteurs de croissance 45
Figure 18 : Suivi photographique des cellules TG1 en culture. 58
Figure 19 : « Confluence » des cellules TG1 en fonction du temps. 59
Figure 20 : « Confluence » des cellules TG1 en fonction du nombre initial de cellules par puits. 60
Figure 21 : Résultats de l'analyse des SNP des cellules TG1 au passage 8. 62
Figure 22 : Caryotype reconstitué d'après les données de la puce Affymetrix pour les cellules TG1 au passage 8. 63
Figure 23 : Caryotype reconstitué d'après les données de la puce Affymetrix pour les cellules TG1 aux passages 13, 22, 38 et 48. 64
Figure 24 : Etude de la variation des SNP dans les cellules f-NSC en fonction du nombre de passage. 65
Figure 25 : Détermination du meilleur gène rapporteur pour l'analyse des la transcription de gènes marqueurs des cellules souches par un graphique de boîte à moustaches. 68
Figure 26 : Expression de gènes connus pour jouer un rôle dans le caractère souche des cellules. 70
Figure 27 : Expression de gènes connus pour jouer un rôle dans la différenciation des cellules de la lignée neurale. 72
Figure 28 : Carytotype des cellules TG1 par Multi-FISH. 75
Figure 29 : Diversité de la voie d'activation des récepteurs couplés aux protéines G. 86
Figure 30 : Mécanismes potentiels pour les voies de régulation de la pluripotence par les récepteurs couplés aux protéines G. 90
Figure 31 : Détermination du meilleur gène rapporteur pour l'analyse de la transcription des RCPG par un graphique de boîte à moustaches. 93
Figure 32 : Expression de GPR56 dans les différents types cellulaires 95
Figure 33 : Clustering hiérarchique de l'expression des RCPG dans les différents types cellulaires testés. 97
Figure 34 : Récepteurs couplés aux protéines G exprimés dans les cinq types cellulaires testés. 99
Figure 35 : Récepteurs couplés aux protéines G spécifiquement exprimés dans les cellules à caractère souche. 101
Figure 36 : Récepteurs couplés aux protéines G préférentiellement exprimés dans les cellules à caractère souche. 102
Figure 37 : Récepteurs couplés aux protéines G préférentiellement exprimés dans les cellules souches cancéreuses. 104
Figure 38 : Expression de FZD6 dans les différents types cellulaires testés. 105
Figure 39 : Variation de l'expression des gènes de ménage en fonction du nombre de jours de mise en quiescence des cellules TG1. 107
Figure 40 : Variation de l'expression des RCPG en fonction du nombre de jours de mise en quiescence des cellules TG1. 109

Figure 41 : Criblage de molécules agonistes et antagonistes du récepteur histaminique H2 sur les cellules TG1 proliférantes. 115
Figure 42 : Schéma de la glycolyse. 119
Figure 43 : Variations du taux de β-actine et de la sous-unité A de l'ARN polymérase II en relation avec la cinétique d'entrée en quiescence des cellules TG1. 122
Figure 44 : Résultats du criblage primaire de la chimiothèque Prestwick® sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. 131
Figure 45 : Résultats du criblage secondaire de la chimiothèque Prestwick® sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. 134
Figure 46 : Résultats des criblages primaires et secondaires de la chimiothèque Prestwick sur les CSC de glioblastome TG1. 135
Figure 47 : Histogrammes de l'efficacité des molécules issues de la chimiothèque Prestwick sur les CSC de glioblastomes en prolifération et en quiescence (Q16) et sur les cellules HEK, U-87 MG, f-NSC et les astrocytes humains (HA). 143
Figure 48 : Réponse calcique des cellules TG1 en prolifération à différentes concentrations de terfénadine. 146
Figure 49 : Structures de la prazosine, de la doxazosine et de la térazosine. 147
Figure 50 : Histogrammes de l'efficacité de molécules de la chimiothèque Prestwick® toxiques sur les CSC de glioblastomes, non décrites précédemment pour leur activité anti-cancéreuses 152
Figure 51 : Structure moléculaire du bisacodyl ou 4,4'-(pyridin-2-ylméthylène)bis(4,1-phénylène) diacétate 153
Figure 52 : Structure moléculaire du désacétylbisacodyl (DDPM) 154
Figure 53 : Courbes doses-réponses du bisacodyl sur les cellules souches cancéreuses en prolifération et en quiescence et sur les cellules contrôles. 155
Figure 54 : Courbe dose-réponse du bisacodyl sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence à de faibles concentrations. 156
Figure 55 : Stabilité du bisacodyl dans le milieu des cellules proliférantes et dans le milieu des cellules quiescentes 157
Figure 56 : Stabilité du DDPM dans le milieu des cellules proliférantes et dans le milieu des cellules quiescentes 158
Figure 57 : Action du DDPM sur les cellules souches cancéreuses et sur les cellules contrôles. 159
Figure 58 : Cinétique d'action du bisacodyl et du DDPM sur les cellules TG1 quiescentes 160
Figure 59 : Suivi de la viabilité et de la prolifération des cellules et évolution du pH du milieu extracellulaire, en fonction du nombre de jours de mise en culture. 161
Figure 60 : Influence du milieu de culture sur l'effet du DDPM sur les cellules TG1 proliférantes et quiescentes. 163
Figure 61 : Etude de la survie des cellules TG1 proliférantes et quiescentes traitées au DDPM en fonction du pH. 165
Figure 62 : Rôle des caspases 3 et 7 dans l'apoptose cellulaire. 166
Figure 63 : Apoptose induite par le DDPM sur les cellules TG1 proliférantes et quiescentes en fonction du pH. 167
Figure 64 : Réponse des cellules f-NSC, U-87 MG et HA au DDPM en fonction du pH du milieu extracellulaire. 169
Figure 65 : Structure de base exploitée pour l'étude RSA du bisacodyl 170
Figure 66 : Schéma présentant l'hypothèse de la double mutation, de l'évolution clonale et de la création de la tumeur. 188
Figure 67 : L'hétérogénéité tumorale. 190
Figure 68 : Photographies des cellules souches cancéreuses en prolifération. 196
Figure 69 : Photographie des cellules f-NSC. 198
Figure 70 : Photographie des astrocytes humains primaire. 199
Figure 71 : Photographie des cellules de la lignée U-87 MG. 200
Figure 72 : Photographie de la lignée cellulaire HEK 293. 201
Figure 73 : Réaction Click du kit Click-iT EdU Flow Cytometry Alexa Fluor® 488 Azide d'Invitrogen™. 207
Figure 74 : Stratégie de chimie-biologie. 208
Figure 75 : Principe du test basé sur l'ATP, Cell Titer-Glo® de Promega. 209

⇨ TABLEAUX :

Tableau 1 : Classification des astrocytomes selon l'Organisation Mondiale de la Santé. 13
Tableau 2 : Grade et sévérité des tumeurs selon la classification de l'hôpital Ste-Anne. 14
Tableau 3 : Profil moléculaire type des glioblastomes primaires ou secondaires. 16
Tableau 4 : Etude de la corrélation de l'expression des gènes marqueurs des cellules souches pour les différentes lignées testées. 67
Tableau 5 : Récapitulatif des caractéristiques des cellules TG1 81
Tableau 6 : RCPG les plus exprimés dans chaque type cellulaire testé 96
Tableau 7 : Position des gènes RCPG surexprimés dans les cellules souches cancéreuses TG1 et OB1 sur les chromosomes. 116
Tableau 8 : Molécules de la chimiothèque Prestwick issues du criblage secondaire et actives sur les CSC de glioblastomes TG1. 136
Tableau 9 : EC_{50} des molécules sélectionnées lors du criblage secondaire. 140
Tableau 10 : Effet de l'ellipticine sur les cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes en prolifération ou en quiescence (Q16). 144
Tableau 11 : Effet de la prazosine, de la doxazosine et de la térazosine sur la viabilité des cellules TG1 proliférantes et quiescentes lors des criblages primaire et secondaire de la chimiothèque Prestwick®. 148
Tableau 12 : Effet de la prazosine sur les cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes en prolifération ou en quiescence (Q16). 148
Tableau 13 : Effet des molécules sur des lignées de cellules cancéreuses dans la littérature. 150
Tableau 14 : Stabilité du bisacodyl dans le milieu des cellules proliférantes et quiescentes 157
Tableau 15 : Effet de dérivés hydrolysables du bisacodyl sur les cellules TG1 en prolifération (P) et en quiescence (Q) 172
Tableau 16 : Analogues symétriques non hydrolysables du bisacodyl 173
Tableau 17 : Analogues dissymétrique non hydrolysables du DDPM sélectifs pour les cellules TG1 en quiescence (Q) 174
Tableau 18 : Molécules ayant un groupement hydroxyle ou hydrolysable et un groupement non hydrolysable actives sur les cellules TG1 proliférantes (P) et sur les cellules quiescentes (Q). 175
Tableau 19 : Analogue dissymétrique non hydrolysable du DDPM non actif sur les cellules TG1 en prolifération (P) ou en quiescence (Q) 176
Tableau 20 : Analogues du DDPM modifié au niveau de la pyridine (cycle A) et activité sur les cellules TG1 en prolifération (P) et en quiescence (Q) 177

AVANT-PROPOS

Les glioblastomes, gliomes de grade IV selon la classification de l'OMS, sont les tumeurs cérébrales les plus agressives qui se développent à partir de cellules gliales. Ce sont des tumeurs très infiltrantes, très résistantes aux chimiothérapies et radiothérapies classiques et présentant un fort taux de récurrence. Elles présentent une forte hétérogénéité cellulaire et malgré de nombreuses études, leur physiopathologie reste mal connue. La découverte au sein de ces tumeurs de cellules malignes possédant des propriétés de cellules souches (Galli et al., 2004; Singh et al., 2003; Singh et al., 2004) et appelées cellules souches cancéreuses (CSC) a jeté un éclairage nouveau sur le développement des glioblastomes. Les CSC douées de propriétés d'autorenouvellement, de prolifération, de différenciation et capables d'induire de nouvelles tumeurs après xénogreffes à des animaux immuno-déficients, seraient à l'origine de la tumeur, responsables de son développement et de son hétérogénéité cellulaire. Leur résistance aux composés chimiques et aux radiations les désignent en outre, comme responsables des échecs thérapeutiques et des récidives après traitements. Les cellules souches cancéreuses, retrouvées dans de nombreuses tumeurs, sont devenues l'objet principal de multiples études visant à comprendre la physiopathologie tumorale et la cible de choix dans la recherche de nouvelles thérapies anti-cancéreuses (Reya et al., 2001) .

Mon travail de thèse se place dans le contexte des cellules souches cancéreuses et vise à comprendre la physiopathologie de cellules souches cancéreuses isolées de glioblastomes primitifs et à rechercher des petites molécules chimiques actives sur la prolifération, la différenciation ou induisant la mort de ces cellules dans le but de développer de nouveaux outils pharmacologiques permettant de disséquer le fonctionnement de ces cellules et de trouver des candidats-médicaments.

Mes études ont porté sur des cellules souches cancéreuses isolées de glioblastomes primitifs de patients de l'hôpital St Anne de Paris par l'équipe du Dr Chneiweiss (INSERM UMR 894, Paris). Trois types de cellules souches cancéreuses TG1, TG16 et OB1) provenant de trois patients ont été utilisées. Des cellules non cancéreuses, à savoir, des souches neurales foetales et une lignée d'astrocytes humains ont servi de référence. Les cellules souches cancéreuses ont été étudiées dans des conditions de culture sans sérum, en présence de facteurs de croissance où les cellules prolifèrent et forment des neurosphères et dans des conditions de quiescence où les cellules entrent (de manière réversible) en phase G_0 du cycle cellulaire. Cet état de quiescence est considéré comme

étant un état plus proche de l'état physiologique des cellules souches dans leur niche environnementale (Lasky and Liau, 2006).

Afin de travailler sur un modèle le plus précis possible, je me suis d'abord attachée à compléter la caractérisation des cellules souches cancéreuses TG1. Une étude de la variation des SNP au cours de la culture cellulaire a été entreprise afin de vérifier la stabilité de la population cellulaire étudiée et de mieux connaitre les variations génétiques présentes dans ces cellules. D'autre part, une étude de l'expression de gènes associés aux caractères souches ou différenciés des cellules a été réalisée à l'aide de puces « TaqMan Low Density Array Human StemCells » d'Applied Biosystems. Cette étude nous permet de confirmer la présence au niveau ARN de marqueurs spécifiques des cellules souches et des cellules d'origine neurale.

En faisant l'hypothèse que le dysfonctionnement cellulaire observé dans la cellule tumorale implique, soit la communication intercellulaire, soit la communication intracellulaire, j'ai également mené une étude visant à caractériser l'expression d'une famille de récepteurs membranaires, à savoir la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), très importante dans la signalisation cellulaire.

L'analyse de l'expression des RCPG a été réalisée à l'aide de puces « TaqMan Low Density Array Human GPCR » d'Applied Biosystems. Ont été étudiées, les cellules souches cancéreuses TG1 et OB1 issues de glioblatomes primitifs de deux patients, la lignée de glioblasome U-87 MG, ainsi que dans des cellules non cancéreuses et notamment des cellules souches neurales foetales (NSC) et des astrocytes humains (HA).

J'ai d'autre part réalisé un suivi de l'expression des RCPG dans les cellules TG1 au cours de leur mise en quiescence G_0 (par opposition à l'état proliférant des cellules, les cellules quiescentes sont vivantes mais n'entrent pas dans le cycle cellulaire).

Cependant, le principal objectif de mon travail de thèse étant de trouver des molécules actives sur les cellules souches cancéreuses, j'ai mis au point un test permettant de mesurer l'activité métabolique des CSC en prolifération continue et en quiescence, en présence d'une molécule. Une collection de 1120 composés a ainsi été testée en criblages primaires et secondaires sur les cellules TG1 en prolifération continue et en quiescence sur la plateforme de criblage « Chimie Biologie Intégrative de Strasbourg » (PCBIS, ESBS, Illkirch). Vingt cinq molécules, présentant un effet sur l'activité métabolique des cellules souches TG1 ont été testées en courbes doses-réponses sur les cellules TG1, mais aussi TG16 et OB1, et sur les cellules contrôles NSC, U-87 MG et HA, ainsi que les cellules

embryonnaires de rein humain (HEK293). Les 4 types de cellules souches cancéreuses répondent aux composés de manière similaire et leurs EC_{50} sont proches. Cependant la plupart des molécules inhibant ou induisant la mort des cellules souches cancéreuses ont également un effet sur les cellules souches neurales foetales. Une molécule qui présente une spécificité d'action pour les cellules souches en quiescence a été étudiée plus en détail et a été brevetée. Des analogues de cette molécule ont été synthétisés au laboratoire et sont testés pour des études de relation structure-activité.

Après une introduction (chapitre 1) sur les principaux points abordés dans ce manuscrit, ma thèse s'articulera de la manière suivante. Le chapitre 2 sera consacré à la caractérisation des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes sur lesquelles j'ai travaillé. Le chapitre 3 exposera mon travail sur l'étude de l'expression des récepteurs couplés aux protéines G et enfin, le chapitre 4 présentera l'étude de criblage et le début de la caractérisation de l'effet de la molécule brevetée, le bisacodyl. Enfin la conclusion replacera mon travail dans le cadre général des tumeurs et s'élargira aux cellules souches cancéreuses en général.

INTRODUCTION

1. Introduction

1.1. Le cerveau : structure et genèse

1.1.1. Histologie du cerveau humain

Le cerveau est un organe complexe recevant, intégrant et émettant une variété de messages permettant à l'organisme de vivre et de survivre dans un environnement changeant. Il se différencie très tôt dans la vie embryonnaire. La neurulation qui consiste en la formation du tube neural à partir de la plaque neurale, prend place dès le 16ème jour après la fécondation. Des cellules migrent de ce tube neural pour former la crête neurale qui donne lieu au système nerveux périphérique et aux mélanocytes. Le tube neural, quant à lui, se différencie en système nerveux central, donnant ainsi le cerveau et la moelle épinière.

Le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral forment l'encéphale (figure 1). Il existe, dans les hémisphères cérébraux, des cavités appelées ventricules latéraux. Ces ventricules sont reliés avec le troisième ventricule (qui constitue l'espace entre le corps calleux et le thalamus) et le quatrième ventricule (qui constitue l'espace entre le cervelet et le pont). Les ventricules sont bordés par des cellules épithéliales qui sont appelées des épendymocytes. Grâce à leurs cils, ces cellules font circuler le liquide céphalo-rachidien contenu dans les cavités. Les épendymocytes sont des cellules gliales qui peuvent être à l'origine de gliomes appelés épendymomes (Del Bigio, 2009). Les épendymocytes proviennent des cellules souches neurales. Les cellules souches neurales (CSN) seront plus détaillées au paragraphe 1.1.2., mais elles sont capables de se différencier pour produire des neurones et des cellules gliales. Parmi les cellules gliales sont donc retrouvés les épendymocytes et deux autres types cellulaires, les astrocytes et les oligodendrocytes.

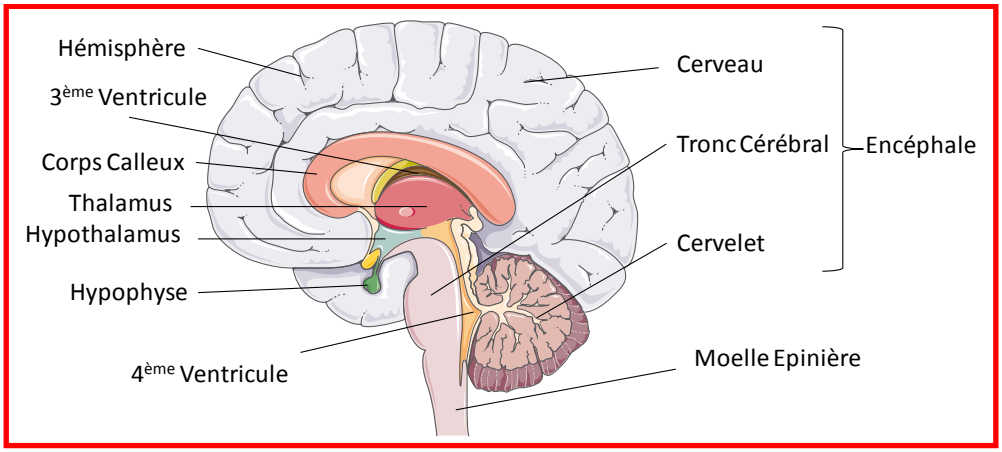


Figure 1 : Anatomie du cerveau.
Représentation schématique d'une coupe sagittale de l'encéphale. L'encéphale est constitué du cerveau (télencéphale et diencéphale), du tronc cérébral (mésencéphale) et du cervelet (métencéphale). Les ventricules latéraux (non visibles sur cette coupe) et les 3ème et 4ème ventricules sont reliés entre eux et permettent le drainage du liquide céphalo-rachidien. Cette figure a été réalisée à l'aide de Servier Medical Art.

Les astrocytes constituent l'essentiel de la population cellulaire du cerveau. Ces cellules contrôlent la formation des synapses et leur fonctionnalité. Ils participent aussi à la formation des néo-neurones en régulant la neurogénèse et ont un rôle de protection du cerveau, car ils participent à la formation de la barrière hémato-encéphalique (Nag, 2011). Les astrocytes sont des cellules excitables capables de délivrer un message aux neurones et aux cellules endothéliales par un mécanisme appelé la gliotransmission. Ces cellules ne sont pas capables de générer de potentiel d'action, mais leur excitation peut se traduire par une variation du signal calcique intracellulaire et l'oscillation de ce signal. Les astrocytes peuvent être excités spontanément ou par les neurones *via* les synapses. Le signal calcique des astrocytes peut être transmis aux astrocytes voisins par deux voies, l'une impliquant les *gaps junctions* reliant les astrocytes les uns aux autres et l'autre impliquant un passage extracellulaire *via* le relargage d'ATP (adénosine triphosphate). En réponse à ce signal calcique, les astrocytes peuvent moduler la transmission synaptique en relargant par exocytose dans les synapses, des gliotransmetteurs tels que le glutamate et l'ATP. Les astrocytes fonctionnent ainsi comme des ponts reliant les neurones, les cellules endothéliales et les autres cellules gliales. Ces cellules peuvent donner lieu à des pathologies comme les astrocytomes, une forme de gliome, ou participer à l'aggravation de pathologies comme le SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise), en ayant un rôle neurotoxique, ou comme la sclérose amyotrophique latérale où le gène SOD1 (super oxyde dismutase) doit être muté à la fois dans les neurones et dans les astrocytes pour que la maladie survienne (Volterra and Meldolesi, 2005).

Les oligodendrocytes matures ont pour rôle principal de former la myéline autour des axones des neurones. La myéline est constituée de membrane plasmique qui s'enroule autour d'un axone. Les oligodendrocytes accélèrent ainsi le signal nerveux grâce à la formation des nœuds de Ranvier. Parmi les pathologies associées au dysfonctionnement de ces cellules on peut citer la sclérose en plaques et des gliomes. (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

1.1.2. Les cellules souches neurales

In utero, lors de la formation du cerveau, les cellules neuroépithéliales de la plaque neurale qui donne plus tard lieu au tube neural et à la crête neurale, se transforment en cellules de la glie radiaire en réprimant Sox1 (*Sex determining region Y-box 1*) et en exprimant Pax6 (*Paired box 6*) (Suter et al., 2009). Les cellules de la glie radiaire sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier en progéniteurs neuraux et en tous les types de cellules neurales sous l'effet d'un gradient de Shh (*Sonic hedgehog*) secrété par la notochorde. Les cellules de la glie radiaire sont localisées directement au dessus des ventricules latéraux (zone ventriculaire) où elles forment un épithélium pseudo-stratifié. La couche de cellules surplombant la zone ventriculaire est la zone subventriculaire qui contient des progéniteurs neuraux (ou astrocytes de la zone subventriculaire ou cellules de type B) également capables de s'auto-renouveler et de se différencier en neurones et en cellules gliales (figure 2) (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

Les progéniteurs neuraux communément appelés cellules souches neurales (CSN) sont présents dans le cerveau en développement, mais persistent après la naissance et dans le cerveau adulte. A l'âge adulte, ces progéniteurs neuraux sont retrouvés dans la zone subventriculaire et dans la zone subgranulaire, au niveau du gyrus denté de l'hippocampe où ils continuent de produire des neurones et des cellules gliales (figure 3) (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). A l'abri dans leurs niches, les cellules souches neurales sont dans un état quiescent relatif induit par PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) (Groszer et al., 2006).

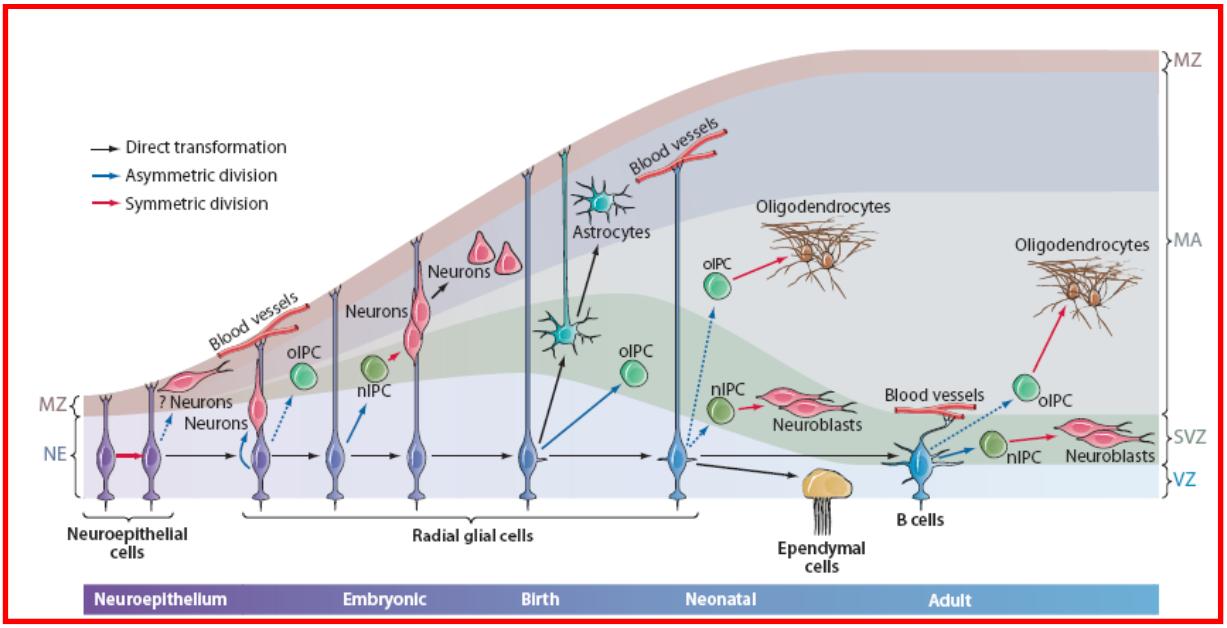


Figure 2 : Le développement cérébral.
Pendant le développement précoce du système nerveux central, les cellules neuroépithéliales se divisent symétriquement pour générer plus de cellules neuroépithéliales. Ensuite, quelques cellules neuroépithéliales génèrent des neurones précoces. L'épithélium cérébral s'épaissit et les cellules neuroépithéliales s'allongent pour se transformer en cellules de la glie radiaire (RG). Les RG se divisent asymétriquement pour former des précurseurs intermédiaires des neurones (nIPC) et des oligodendrocytes (oIPC). A la fin du développement embryonnaire, la plupart des RG se détachent de la zone ventriculaire (VZ) (en bas) et se convertissent en astrocytes. La production d'astrocytes peut également être due à des progéniteurs intermédiaires. Les RG qui restent attachées à la VZ continuent à produire des nIPC et des oIPC alors que certains RG se convertissent en cellules épendymaires et d'autres en astrocytes de la zone sub-ventriculaire (SVZ) (cellules de type B). Ces astrocytes de la SVZ continuent de fonctionner comme des cellules souches neurales à l'âge adulte.
Légende : flèches pleines, étapes prouvées expérimentalement ; flèches en pointillé, étapes supposées ; flèches noires, transformation directe ; flèche bleue, division asymétrique ; flèche rouge, division symétrique ; IPC, cellules de type progéniteur intermédiaire ; MA, manteau ; MZ, zone marginale ; NE, neuroépithélium ; SVZ, zone sub-ventriculaire ; VZ, zone ventriculaire.
Figure de Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009.

Ces CSN trouvées dans le cerveau adulte sont définies, comme toutes les cellules souches, par trois caractéristiques : leur capacité d'auto-renouvellement, leur capacité à proliférer à l'infini, et leur multi-potentialité, c'est-à-dire leur capacité à se différencier en cellules plus spécialisées. Les cellules souches neurales trouvées dans le cerveau adulte ont donc la capacité de générer des neurones et des cellules gliales *via* leurs précurseurs gliaux et neuronaux. Les cellules dites précurseurs sont également capables de s'auto-renouveler, mais leur capacité proliférative est limitée comparée aux CSN.

L'absence de biomarqueurs connus qui distinguerait les cellules souches neurales des progéniteurs neuraux ne permet pas de prouver l'existence directe de cellules souches

neurales *in vivo* dans le cerveau adulte. La première caractérisation de CSN consistait à les isoler *in vitro* en présence de bFGF (*basic fibroblast growth factor*) et/ou d'EGF (*epidermal growth factor*), à partir d'un explant de la zone subgranulaire ou de la zone subventriculaire du cerveau (Reynolds and Weiss, 1992). Les cellules souches neurales forment alors des neurosphères flottantes qui peuvent ainsi être maintenues en culture aussi longtemps qu'il y a de l'EGF et/ou du bFGF dans le milieu de culture. Cette structure tridimensionnelle, adoptée par les cellules en culture, créé une niche qui est physiologiquement plus pertinente qu'une culture adhérente (en deux dimensions), et qui permet la modulation d'un environnement dynamique où les concentrations en facteurs de croissance et en nutriments varient (Ahmed, 2009). Ces cellules peuvent être différenciées en neurones ou en cellules gliales sur un support adhérent dans du milieu favorisant la différenciation des cellules, en présence de sérum de veau fœtal par exemple (Jin and Galvan, 2007).

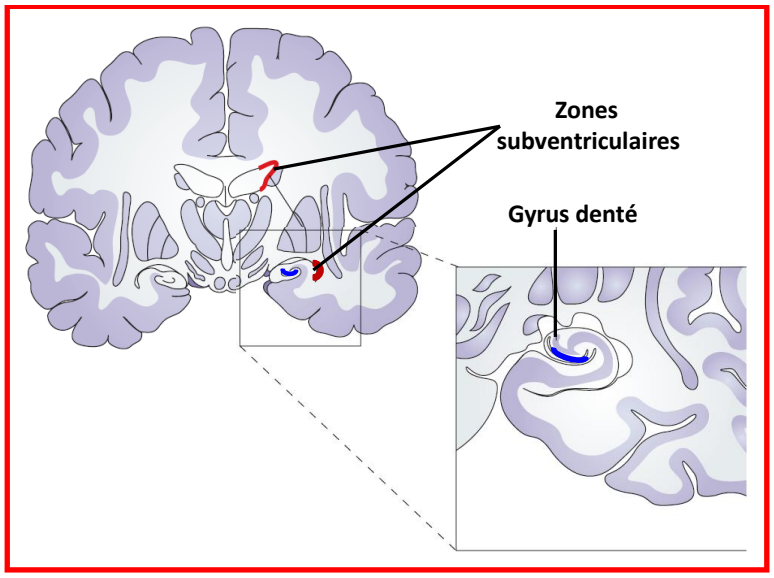


Figure 3 : Zones des cellules souches neurales.
Les cellules souches neurales de l'adulte se trouvent dans les zones subventriculaires, le long des parois des ventricules latéraux (en rouge), et dans la zone subgranulaire au niveau du gyrus denté (en bleu).
Shéma adapté de Vescovi et al., 2006.

A la fin du développement cortical chez la plupart des mammifères, les cellules de la glie radiaire se transforment en astrocytes *via* un changement de morphologie. En effet, ces cellules passent d'une morphologie bipolaire à une morphologie unipolaire et se détachent de la base du ventricule, adoptant ainsi progressivement une morphologie astrocytaire (Noctor et al., 2008).

1.2. Tumeurs cérébrales : gliomes et glioblastomes

Les gliomes sont des tumeurs du cerveau ayant pour origine la prolifération excessive des cellules gliales. Ce sont les tumeurs cérébrales primitives malignes les plus fréquentes (figure 4). En France, les gliomes ont une incidence de 5 à 8 cas pour 100000 habitants selon les régions. Ils représentent de 2000 à 3000 nouveaux cas par an (Haberer et al., 2010). Les gliomes peuvent toucher les enfants, même s'ils sont plus fréquents chez les adultes notamment à partir de 60 ans (Baldi et al., 2010).

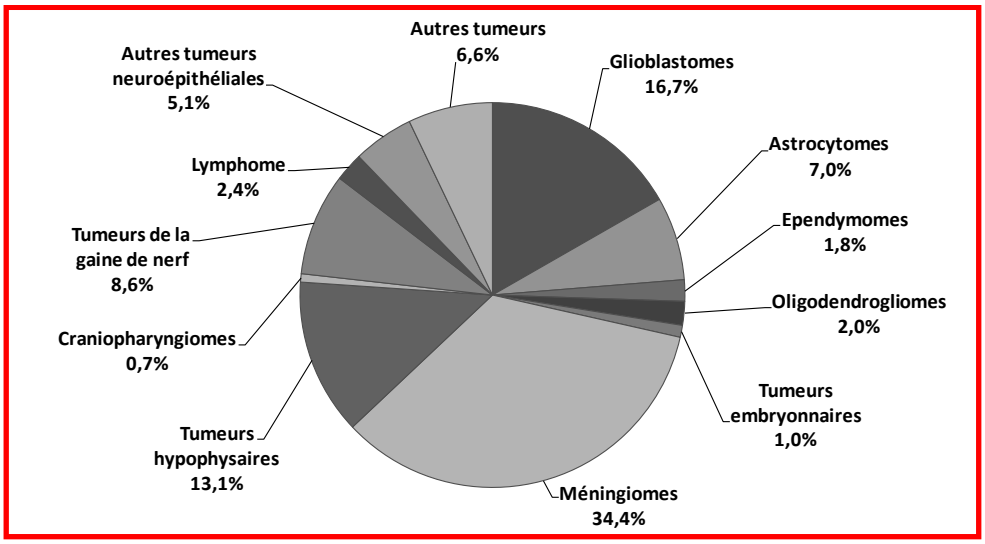


Figure 4 : Distribution de toutes les tumeurs primitives du cerveau et du système nerveux central.
Les gliomes représentent environ 30% de toutes les tumeurs primitives du cerveau et du système nerveux central (SNC), et 80% des tumeurs primitives malignes du cerveau et du SNC. Dans ce graphique, les médulloblastomes sont comptés avec les tumeurs embryonnaires.
Graphique réalisé d'après le rapport CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States) de février 2011, regroupant les données de 2004 à 2007.

1.2.1. Classification des gliomes

Contrairement aux autres tumeurs, la classification internationale « T.N.M » (tumeur primitive, nodule lymphatique, métastases) ne s'applique pas aux tumeurs cérébrales. En effet, pour les tumeurs primitives cérébrales malignes, il n'y a ni envahissement des ganglions lymphatiques, ni métastases externes au cerveau, et donc pas de stade clinique selon la classification « T.N.M » (Szuwart et al., 1989).

Cependant, les gliomes étant des tumeurs de nature très variée, il était nécessaire de créer une classification acceptée et utilisée mondialement. Une classification a été proposée

par l'OMS (organisation mondiale de la santé) en 1979 et a été mise à jour en 1993, 2000 et 2007. Cette classification établit le degré de malignité et l'aspect différencié des cellules tumorales et attribue un grade de I à IV en se basant sur une observation histologique d'une biopsie de tumeur.

En simplifié, dans la version de 2007, le grade I s'applique aux lésions tumorales avec un faible potentiel de prolifération. Ces tumeurs sont susceptibles de disparaitre après une exérèse chirurgicale seule. Le grade II désigne des néoplasmes infiltrants qui, malgré une faible activité proliférative, sont souvent récurrents. Ces tumeurs de grade II tendent à progresser vers des gliomes de grades plus élevés. Le grade III s'applique aux tumeurs malignes, c'est-à-dire qu'on observe histologiquement des cellules avec des atypies nucléaires et une activité mitotique importante. Les tumeurs de grade III tendent à progresser vers un gliome de grade IV. Les gliomes de grade IV sont définis comme étant très malins avec une forte activité mitotique, des zones de nécrose, une évolution rapide après exérèse et une issue fatale (tableau 1). Les glioblastomes sont des gliomes de grade IV (Louis et al., 2007).

Tumeur	Grade	Gravité
Astrocytome pilocytique	I	-
Astrocytome	II	+
Astrocytome anaplasique	III	++
Glioblastome	IV	+++

Tableau 1 : Classification des astrocytomes selon l'Organisation Mondiale de la Santé.

Cette classification de l'OMS est la plus utilisée à travers le monde mais elle reste insatisfaisante, notamment à cause de son manque de précision et de reproductibilité. La classification des gliomes sur un critère purement histologique, sans prendre en compte les données de l'imagerie (PET-SCAN, IRM), peut entrainer des confusions entre astrocytomes et oligodendrogliomes et une moins bonne prise en charge du patient qui ne reçoit pas le traitement optimal. Une classification prenant en compte les données de l'imagerie a donc été créée. Il s'agit de la classification de l'hôpital Sainte-Anne. Cette classification repose sur l'étude de la prise de contraste de la tumeur à l'IRM et sur l'étude histologique de biopsies. Elle ne distingue que trois catégories de gliomes parmi les formes les plus courantes de gliomes : les oligodendrogliomes de grade A ou B, les oligoastrocytomes (dont la composition cytologique est formée d'astrocytes et d'oligodendrocytes) de grade A ou B et les glioblastomes (tableau 2). Cette classification recommande l'utilisation d'immunomarquages pour bien distinguer les gliomes contenant uniquement des cellules

tumorales issues de la glie et les neurogliomes contenant en plus, une part neuronale. En effet, les gangliogliomes et tumeurs neuro-épithéliales dysembryoplasiques sont deux tumeurs bénignes pouvant être confondues avec des astrocytomes de grade I et II et les TGNM (tumeur glioneuronale maligne) sont classées la plupart du temps dans les glioblastomes lorsque la classification de l'OMS est utilisée (Daumas-Duport et al., 2000).

Tumeur	Grade	Sévérité
Oligodendrogliome	A	+
	B	++
Oligoastrocytome	A	+
	B	++
Glioblastome		+++

Tableau 2 : Grade et sévérité des tumeurs selon la classification de l'hôpital Ste-Anne.

1.2.2. Les glioblastomes

Les glioblastomes sont les gliomes les plus agressifs, ils sont hautement angiogéniques et invasifs. Ils peuvent apparaître *de novo*, et sont alors appelés glioblastomes primaires, ou de la transformation anaplasique d'un gliome infiltrant de grade II ou III, et sont dits glioblastomes secondaires (figure 5). Cependant, les glioblastomes sont primaires dans 90% des cas et ceux-ci sont de moins bon pronostic que les glioblastomes secondaires (Figarella-Branger et al., 2010).

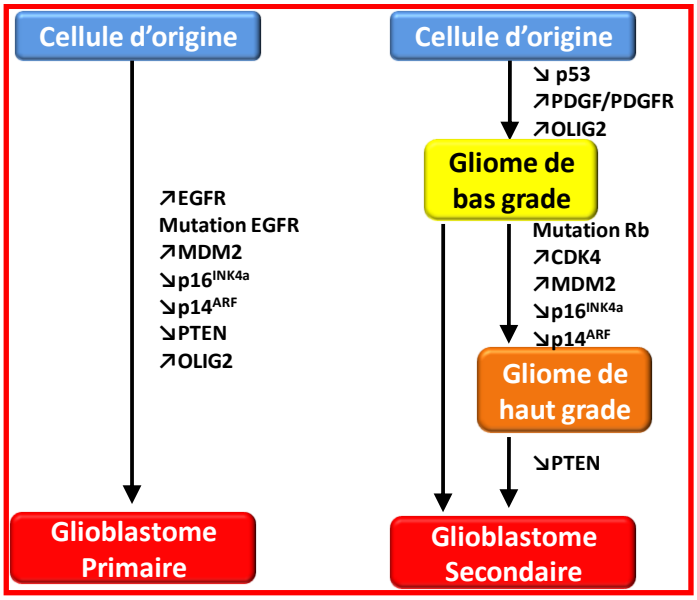


Figure 5 : Principales différences génétiques entre les glioblastomes primaires et secondaires. *Les glioblastomes primaires apparaissent de novo, ils sont caractérisés par une amplification et des mutations de l'EGFR fréquentes. Les glioblastomes secondaires se forment par progression des gliomes de bas grade. Les mutations de p53, perte de PTEN et amplification de PDGFR sont retrouvés dans la plupart des glioblastomes secondaires.*
Abréviations : EGFR, facteur de croissance de l'épiderme ; MDM2, oncogène double minute de la souris ; PTEN, phosphatase homologue de la tensine ; Olig2, facteur de transcription 2 des oligodendrocytes ; PDGF, facteur de croissance des plaquettes ; PDGFR, récepteur du facteur de croissance des plaquettes ; Rb, rétinoblastome ; CDK4, kinase dépendant des cyclines 4. Adapté de Oghaki and Kleihues, 2007.

La distinction entre les glioblastomes primaires et secondaires est importante car ils diffèrent d'un point de vue moléculaire. En effet, le gène EGFR (facteur de croissance de l'épiderme) est très amplifié dans 40% des cas de glioblastomes primaires, et des mutations de PTEN et de TP53 sont observées dans respectivement 25% et 28% des cas de glioblastomes primaires. A l'inverse, les mutations de TP53 sont retrouvées dans 65% des cas de glioblastomes secondaires, alors que des mutations de PTEN et des amplifications de l'EGFR sont présentes dans respectivement 4% et 8% des cas de glioblastomes secondaires (tableau 3) (Ohgaki and Kleihues, 2007). Un autre gène marqueur, *IDH1* (isocitrate déshydrogénase 1), a été proposé comme marqueur permettant d'affiner la caractérisation des glioblastomes. Des mutants d'IDH1 sont exprimés préférentiellement dans les gliomes de grade II et III (astrocytomes diffus, astrocytomes anaplasiques, oligodendrogliomes), ainsi que dans les glioblastomes secondaires (78%). L'expression de ces mutants dans les glioblastomes primaires est faible (7,1%). Leur mise en évidence, associée aux autres marqueurs, contribue à l'établissement d'un diagnostic différentiel entre glioblastomes primaires et glioblastomes secondaires. L'expression du mutant de l'IDH1 (le mutant R123H) dans les glioblastomes primaires serait un marqueur de bon pronostic.

L'IDH1 sauvage serait notamment impliqué dans les dommages oxydatifs et les dérégulations épigénétiques (Gupta et al., 2011). Il est donc important de faire la distinction entre glioblastomes primaires et secondaires lors du diagnostic car, en plus d'être de pronostic différents, ces tumeurs peuvent nécessiter des traitements différents (Parsons et al., 2008).

Glioblastome	Amplification EGFR	Mutation PTEN	Mutation TP53	LOH 10q	IDH1*
Primaire	40%	25%	28%	60%	7%
Secondaire	8%	4%	65%	60%	78%

Tableau 3 : Profil moléculaire type des glioblastomes primaires ou secondaires.
Les données sont représentées en pourcentage des cas de glioblastomes primaires ou secondaires présentant cette particularité moléculaire, d'après Ohgaki and Kleihues, 2007 et Gupta et al., 2011.
Abréviations : EGFR, récepteur du facteur de croissance épidermique ; PTEN, homologue de la phosphatase et de la tensine ; TP53, protéine tumorale 53 ; LOH, perte d'hétérozygotie ; 10q, bras long du chromosome 10 ; IDH1, mutant R123H de l'isocitrate déshydrogénase 1.*

1.2.2.1. Incidence et diagnostic

Les glioblastomes représentent plus de la moitié des gliomes (figure 6). Il existe en Gironde, un registre spécialisé dans le recensement des cancers, l'incidence pour les glioblastomes dans cette région est de 4,96 cas pour 100000 habitants par an. Une augmentation de l'incidence des glioblastomes a été constatée au cours des 30 dernières années à l'échelle mondiale. En réalité, cette augmentation est probablement le fruit du vieillissement de la population car la plupart des glioblastomes surviennent après 60 ans. L'amélioration des techniques de détection et un meilleur accès aux techniques de détection les plus avancées, ainsi que la modification des classifications des gliomes sont également susceptibles de provoquer artificiellement cette augmentation de l'incidence des glioblastomes (Baldi et al., 2010).

Les gliomes étant des tumeurs rares et d'un pronostic peu encourageant, il n'existe pas de dépistage systématique de ces tumeurs comme il peut y en avoir pour les cancers du sein, de la prostate et du colon par exemple. Les circonstances de diagnostic sont donc la présence de symptômes associés aux gliomes qui peuvent être des maux de tête, une perte de la vision, un changement de personnalité, une paralysie ou perte de sensation, des discours incohérents, des crises d'épilepsie et des vomissements qui traduisent une hypertension intracrânienne. L'association de plusieurs de ces symptômes amène le

médecin à proposer un scanner ou une IRM suivi d'une biopsie en cas de détection d'une anomalie afin de déterminer le type de gliome et son grade.

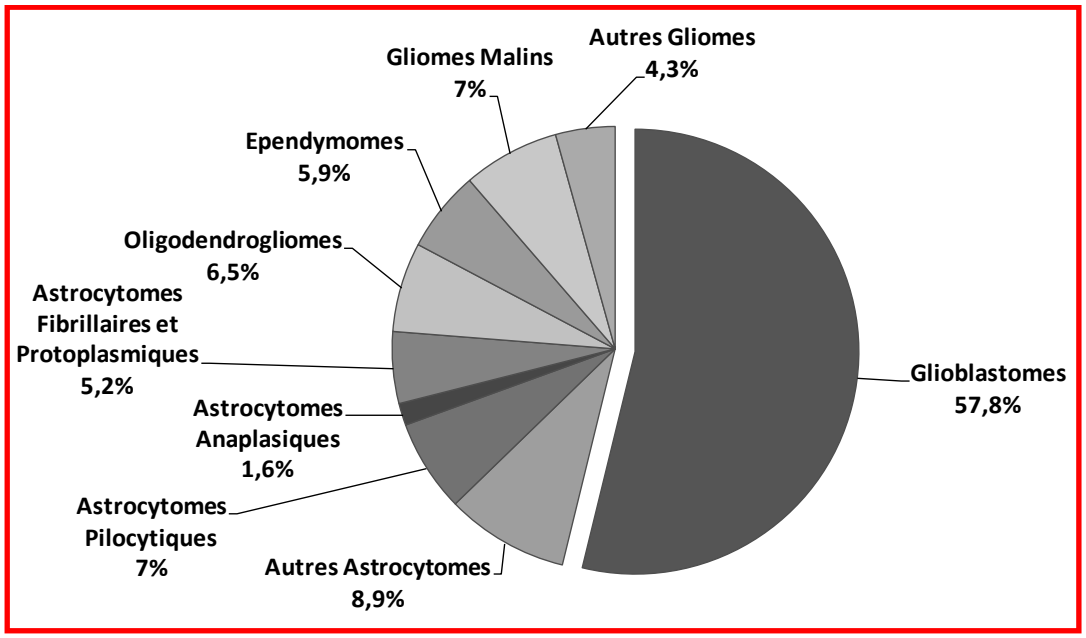


Figure 6 : Répartition des différents types de gliomes
Les glioblastomes représentent plus de 50% de tous les gliomes.
Graphique réalisé d'après le rapport CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States) de février 2011, regroupant les données de 2004 à 2007.

1.2.2.2. Facteurs de risque

1.2.2.2.1. Facteurs de risque extrinsèques

L'identification des facteurs de risque extrinsèques est délicate car la plupart des études analysent la survenue des glioblastomes en relation à des expositions extérieures par comparaison avec un groupe témoin. Pour des raisons liées à la maladie, le patient ne peut parfois répondre lui-même au questionnaire qui est alors rempli par des proches ce qui ajoute encore un biais aux études réalisées. Ainsi, des études peuvent parfois avoir des résultats contradictoires.

Cependant des facteurs sont connus pour augmenter le risque de gliome. Ainsi, une méta-analyse montre que chez les femmes, une consommation supérieure à deux paquets de cigarettes par jour augmenterait le risque de développer un gliome de 16%. Ce risque resterait élevé jusqu'à 10 ans après l'arrêt du tabac (Mandelzweig et al., 2009). De même, une exposition aux radiations ionisantes semble augmenter le risque de développer un gliome (Fisher et al., 2007).

Le 31 mai 2011, suite au rapport INTERPHONE (The INTERPHONE Study Group, 2010), l'OMS a classé les champs électromagnétiques de radiofréquence en classe 2B du CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer). Cette classe correspond aux substances et agents qui sont « peut-être cancérogènes pour l'Homme ». Les téléphones portables au même titre que les réseaux *WiFi*™ et les micro-ondes produisent de tels champs pour leur fonctionnement. L'OMS préconise donc pour les utilisateurs les plus chevronnés des téléphones portables, l'utilisation des kits mains-libres et l'envoi de SMS.

1.2.2.2.2. Facteurs de risque intrinsèques

L'étude des facteurs intrinsèques est également délicate à cause de la comparaison de registres n'utilisant pas la même méthodologie dans les différents pays et régions d'un même pays. Cependant, le CBTRUS (*central brain tumor registry of United States*) permet de faire des comparaisons en admettant que l'accès aux soins est identique pour toutes les ethnies des États-Unis. Dans ce registre, les individus de type caucasien sont plus susceptibles de développer un gliome (risque augmenté d'1,7 fois) et les gliomes sont prédominants chez les femmes (57% contre 43% chez les hommes).

Certains syndromes d'origine génétique sont connus pour prédisposer les individus porteurs de ces mutations aux gliomes. Ainsi, le syndrome de Li Fraumeni (mutation du gène TP53, transmission autosomique dominante), les neurofibromatoses de type 1 et de type 2 (respectivement mutations des gènes NF1 et NF2, transmission autosomique dominante) et le syndrome de Turcot de type 1 (mutation des gènes hMLH1 (*mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2*), hPMS2 (*postmeiotic segregation increased 2*) ou hMSH2 (*human Mut-S-Homologon*-2 gene), des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (transmission autosomique dominante), prédisposent aux gliomes.

Des études montrent également une corrélation positive entre certains polymorphismes et la survenue de gliomes. Ces polymorphismes peuvent toucher les systèmes de réparation de l'ADN (dont les gènes PARP1 (Poly [ADP-ribose] polymérase 1) et MGMT (Méthyle guanine méthyle transférase) (Liu et al., 2008)), les métalloprotéases matricielles 1, 3 et 9 (MMP1, MMP3 et MMP9) (Lu et al., 2007), ou la région 5'UTR (région non traduite) de l'EGFR (récepteur du facteur de croissance épidermique) (Costa et al., 2007).

1.2.2.3. Traitements des glioblastomes

Les glioblastomes sont des gliomes très agressifs (stade IV selon la classification de l'OMS). L'évolution d'un glioblastome primaire est très rapide. La médiane de survie sans traitement est de moins de 3 mois après le diagnostic. L'évolution d'un glioblastome secondaire, c'est-à-dire un gliome de bas grade qui a évolué en glioblastome, est plus longue (Figarella-Branger et al., 2010), mais la prise en charge des patients doit être la plus rapide possible.

1.2.2.3.1. Traitement standard

Le protocole de traitement standard des glioblastomes est le protocole de Stupp (Stupp et al., 2005). Dans les six semaines suivant le diagnostic avec confirmation histologique et après une exérèse chirurgicale la plus large possible (lorsqu'elle est possible), les patients sont traités par radiothérapie, et reçoivent quotidiennement une dose de 2Gy (gray), 5 jours par semaine pendant 6 semaines. La dose totale appliquée sur la masse tumorale, avec une marge de 2-3cm, est de 60Gy. En même temps que la radiothérapie, le patient reçoit quotidiennement une dose de témozolomide de 75mg/m², 7 jours par semaine. Suite à la radiothérapie et la chimiothérapie concomitante, le traitement est arrêté pendant 4 semaines. Ensuite, une chimiothérapie adjuvante au témozolomide est appliquée en 6 cycles de 5 jours de témozolomide tous les 28 jours. Lors du premier cycle, une dose de témozolomide de 150mg/m² est administrée. Si le patient ne présente pas d'effets toxiques hématologiques, la dose est augmentée à 200mg/m² à partir du deuxième cycle.

L'ensemble de ce protocole de traitement permet alors de passer à une médiane de survie de 14,6 mois et améliore la médiane de survie de 2,5 mois par rapport à une exérèse et une radiothérapie seule (Stupp et al., 2005). Le témozolomide est un agent alkylant de l'ADN ayant déjà prouvé son efficacité lors d'une utilisation seule. Le témozolomide, commercialisé sous le nom de Témodal en Europe, est capable d'alkyler les résidus guanines de l'ADN en position N7 et O6. Une enzyme fréquemment surexprimée dans les glioblastomes, la MGMT (méthyl-transférase des méthyl-guanines) est capable d'enlever les méthyles en O6 des guanines, réduisant ainsi l'effet du témozolomide (Jiang et al., 2011).

1.2.2.3.2. Essais Cliniques

Malgré les améliorations apportées ces dernières années dans le traitement des glioblastomes et dans la prise en charge des patients, les traitements actuels ne permettent pas de guérir ce cancer dont l'issue est fatale. La recherche pour améliorer les traitements est donc toujours active. Un site internet (http://www.clinicaltrials.gov) au service de l'Institut National de la Santé des Etats-Unis, recense les études cliniques visant à améliorer les traitements contre les glioblastomes dans 174 pays. Ce site recense 673 études cliniques, de la phase I à la phase IV. Les essais cliniques peuvent prendre place dans plusieurs pays en même temps. L'Europe accueille ainsi 103 études dont 31 se déroulent aussi en France. La plupart des études sont des études de phase I ou de phase II (figure 7).

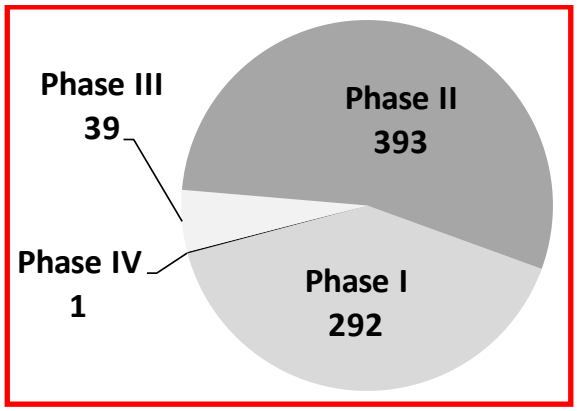


Figure 7 : Répartition des études cliniques sur les glioblastomes dans le monde.
Les études sont classées selon leur phase clinique, le nombre indique le nombre d'études cliniques en cours. Ce graphique a été réalisé d'après les données du site internet (http://www.clinicaltrials.gov) au service de l'Institut National de la Santé des Etats-Unis, en 2011.

Parmi les molécules en essai clinique, les plus utilisées, avec des combinaisons différentes sont le témozolomide (utilisé dans le traitement standard), le bevacizumab, l'irinotécan, le carboplatine, la carmustine et l'erlotinib.

Le bévacizumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF-A (facteur A de croissance de l'endothélium vasculaire) qui est l'un des principaux facteurs impliqués dans l'angiogenèse tumorale. Cette molécule est testée dans 70 essais cliniques en cours. Le 5 mai 2009, la FDA (*food and drug administration* des USA) a approuvé l'utilisation du bévacizumab en complément du témozolomide et de la radiothérapie du protocole de Stupp, pour le traitement des glioblastomes en récidive. En effet, le bévacizumab est capable d'améliorer la survie sans progression à 6 mois, c'est-à-dire que le pourcentage de patients dont le glioblastome ne progresse pas pendant 6 mois est plus

important lorsqu'ils reçoivent le traitement avec du bevacizumab que lorsqu'ils n'en reçoivent pas (Cohen et al., 2009). Des études cliniques sont menées pour déterminer les bénéfices que le bévacizumab pourrait apporter pour une utilisation en première ligne, mais une optimisation de la dose nécessaire et des combinaisons des molécules les plus adaptées pour obtenir les plus grands bénéfices du bevacizumab chez les patients, restent à définir (Lai et al., 2011).

L'irinotécan est un inhibiteur de la topoisomérase I qui joue un rôle dans la topologie de l'ADN et qui intervient dans les processus de réplication, réparation et transcription de l'ADN. L'irinotécan, en bloquant la topoisomérase I, induit l'apparition de coupures dans l'ADN. Cette molécule est souvent associée au bevacizumab et/ou au témozolomide dans les essais cliniques. En association avec le bevacizumab, l'irinotécan améliore la survie sans progression à 6 mois des patients (Cohen et al., 2009).

Le carboplatine est un agent alkylant de l'ADN proche du cisplatine, plus soluble que ce dernier et présentant une toxicité rénale moindre. Il est souvent associé au témozolomide et/ou au bevacizumab et d'autres molécules, comme l'étoposide, un inhibiteur de topoisomérase II. En association avec l'étoposide et le bevacizumab, le carboplatine a montré une bonne tolérance de la part des patients et une activité sur les glioblastomes récurrents (Francesconi et al., 2010).

La carmustine, de la famille des nitroso-urées, est également un agent alkylant de l'ADN. Elle peut induire aussi une carbamylation des protéines. La carmustine peut être appliquée sous forme d'implant en gaufrette lors de la chirurgie de résection (Gliadel® wafer). En association avec le témozolomide et la radiothérapie, les implants de carmustine permettent de faire passer la survie globale à 1 an de 62,5% (témozolomide + radiothérapie) à 75% (témozolomide + radiothérapie + implant de carmustine) et la survie globale à 2 ans de 0% à 38,9% (Noel et al., 2011).

L'erlotinib est un inhibiteur du domaine à activité tyrosine kinase de l'EGFR (récepteur du facteur de croissance de l'épiderme). L'EGFR, surexprimé dans 40% des glioblastomes primaires (tableau 3, page16), semble être une cible intéressante dans le traitement des glioblastomes. Cependant, les études cliniques menées jusqu'à présent s'avèrent décevantes. Des études menées sur des glioblastomes en récidive montrent que l'erlotinib a une activité minimale lorsqu'il est utilisé seul (Raizer et al., 2011) ou en association avec le bévacizumab (Sathornsumetee et al., 2011). Une autre étude clinique, menée sur des glioblastomes nouvellement diagnostiqués, s'avère catastrophique puisque la morbidité très élevée a conduit à l'arrêt de l'essai clinique (Peereboom et al., 2011). Cependant, d'autres associations de la molécule pourraient être testées afin d'avoir un effet

positif sur la survie globale et la survie sans progression des patients atteints de glioblastomes.

Les études cliniques menées pour tester de nouvelles molécules ou de nouvelles associations de molécules, ainsi que la prise en charge du bien-être du patient ont permis de faire passer la survie à deux ans des patients de 10% à 40% entre 2000 et 2010. Cependant, de nombreux facteurs restent à prendre en compte pour les essais cliniques comme l'âge du patient (les glioblastomes répondent souvent moins bien aux thérapies après 70 ans) et les glioblastomes nouvellement diagnostiqués (choix du traitement en première ligne) ou récurrents (traitements choisis en fonction du traitement en première ligne) (Holdhoff and Grossman, 2011). De nouveaux axes thérapeutiques peuvent être explorés comme les vaccins anticancéreux. En effet, une étude clinique a montré les bénéfices d'un vaccin contre le variant de l'EGFR*vIII* (variant de l'EGFR dont le domaine extracellulaire est tronqué et qui est constitutivement actif) chez les patients atteints de glioblastomes exprimant ce variant (Sampson et al., 2010). Ceci pourrait ouvrir la voie vers de nouveaux traitements et améliorer la survie à deux ans des patients dans les années à venir.

1.3. Cancer et cellules souches cancéreuses

Les tumeurs peuvent être considérées comme un organe. Elles sont hétérogènes d'un point de vue cellulaire, c'est-à-dire qu'elles sont formées de cellules présentant différentes caractéristiques phénotypiques et génotypiques, différentes morphologies et qui répondent de manières différentes aux traitements (Visvader, 2011). L'hétérogénéité histologique et fonctionnelle des cellules tumorales au sein d'une même tumeur peut provenir de modifications génétiques ou épigénétiques et peut être expliquée par deux modèles (figure 8). Le premier modèle est le modèle stochastique (ou modèle de l'évolution clonale). Dans ce modèle, la plupart des cellules cancéreuses ont la capacité de proliférer et de former potentiellement des tumeurs, les nouveaux clones qui créent l'hétérogénéité cancéreuse apparaissent de manière aléatoire. Dans le second modèle, le modèle hiérarchique, seule une sous-population des cellules cancéreuses possède des propriétés tumorigènes. Ces cellules ont des propriétés d'auto-renouvellement et sont capables de reformer une tumeur similaire à la tumeur d'origine composée de cellules cancéreuses présentant des phénotypes différents. Les deux modèles ne sont pas exclusifs et suivant la tumeur et le contexte de la tumeur (type de tumeur, microenvironnement tumoral) l'un et/ou

l'autre des deux modèles peuvent être utilisés pour expliquer l'hétérogénéité tumorale (Lindeman and Visvader, 2011; Reya et al., 2001; Vescovi et al., 2006).

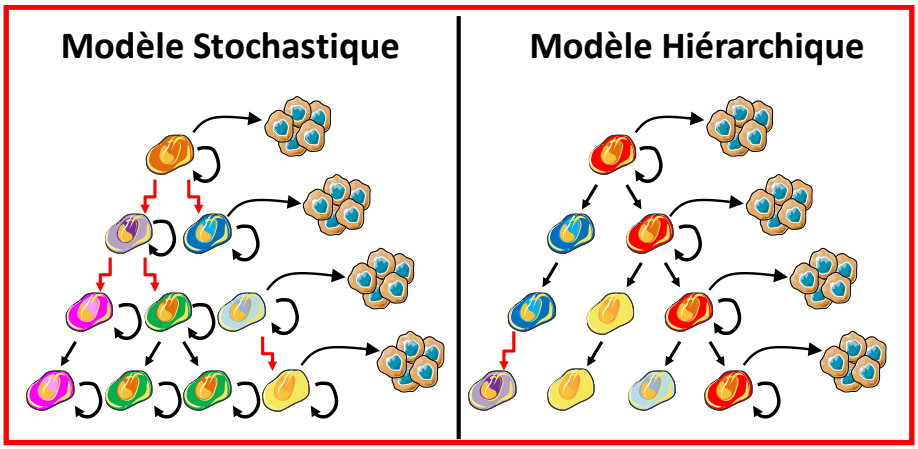


Figure 8 : Modèles expliquant l'hétérogénéité cellulaire des tumeurs.
A gauche, le modèle stochastique ou modèle de l'évolution clonale. Toutes les cellules de la tumeur ont des propriétés d'auto-renouvellement et peuvent, en théorie, reformer une tumeur. Des mutations (flèches rouges) surviennent pour donner des cellules différentes, créant ainsi l'hétérogénéité cellulaire.
A droite, le modèle hiérarchique. Seules quelques cellules (ici en rouge) ont des propriétés d'auto-renouvellement et peuvent reformer la tumeur d'origine. L'hétérogénéité cellulaire est expliquée par la différenciation de ces cellules. Les cellules filles ont des propriétés prolifératives limitées et peuvent dans certains cas subir des mutations (flèche rouge) ajoutant à l'hétérogénéité tumorale.
Cette figure est adaptée de Reya et al., 2001 et a été réalisée à l'aide de Servier Medical Art.

Le modèle hiérarchique est basé sur la théorie des cellules souches cancéreuses. Les cellules souches cancéreuses (CSC) sont des cellules qui ont des capacités hautement prolifératives dans les tumeurs, des capacités de différenciation et d'auto-renouvellement. La proportion de ces cellules, par rapport aux cellules différenciées de la masse tumorale, serait variable selon les tumeurs et leur grade, mais elle est généralement faible (0,01% à 5% des cellules dans les tumeurs) (Dell'Albani, 2008). Le degré de différenciation des cellules tumorales d'une tumeur est d'ailleurs un critère de pronostic pour le patient. En effet, moins la tumeur est différenciée, plus elle est agressive et de mauvais pronostic (Bonavia et al., 2011).

Pour parler de cette population de cellules tumorales qui possèdent la propriété de s'auto-renouveler en culture, la capacité de reformer une tumeur du même phénotype que la tumeur d'origine (c'est-à-dire que la tumeur reformée présente la même hétérogénéité cellulaire que la tumeur originale) lorsqu'elles sont transplantées en petit nombre à des

souris immunodéprimées et qui sont capables de générer différentes cellules-filles *in vivo* ou *in vitro*, le terme de « cellule souche cancéreuse » est employé. Cependant, au sens strict, le terme « cellule souche cancéreuse » fait référence à une cellule souche somatique devenue cancéreuse, mais l'origine de ces cellules souches cancéreuses fait toujours débat (Visvader, 2011). Elles pourraient provenir de cellules souches (ou de progéniteurs) voire de cellules différenciées. Pour ces raisons, certains préfèrent employer le terme de « cellule initiatrice de tumeur » puisque c'est la caractéristique commune à ces cellules de pouvoir régénérer la tumeur initiale (Visvader, 2011). Cependant, ce terme fait également débat puisqu'une telle cellule n'est pas nécessairement à l'origine de la tumeur initiale (voir paragraphe 1.3.2, page 25). Généralement, les deux termes sont donc employés, même si le terme de « cellule propagatrice de tumeur » serait finalement mieux adapté pour parler de ces cellules aux propriétés si particulières (Visvader, 2011). Dans ce manuscrit, pour faire référence à ces cellules cancéreuses ayant des propriétés de cellules souches, le terme de « cellule souche cancéreuse » sera employé tel qu'il a été défini par l'association américaine pour le groupe de travail sur les cellules souches cancéreuses (American Association for Cancer Research Workshop on Cancer Stem Cells) (Clarke et al., 2006).

1.3.1. Historique des cellules souches cancéreuses

La notion de cellules souches cancéreuses a été pressentie pour la première fois en 1855 par Rudolph Virchow qui proposait dans un éditorial que le cancer pourrait provenir de cellules de type embryonnaire. C'est la ressemblance des tératomes avec un fœtus en développement qui lui suggère cette hypothèse (Virchow, 1858).

Ensuite, de la moitié à la fin du XIXème siècle, de nombreux chercheurs tels que Lobstein ou Cohnheim commentent les similitudes entre l'embryogenèse et la biologie des cellules cancéreuses (Stiles and Rowitch, 2008).

L'existence des cellules souches cancéreuses a été suggérée pour la première fois en 1994 dans le cadre des leucémies. Dans leurs travaux, l'équipe de Dick a démontré qu'une seule cellule de leucémie myéloïde aigüe humaine est capable de reformer une leucémie chez une souris immunodéprimée (NOD/SCID), et que les cellules leucémiques issues de cette cellule, plus ou moins différenciées, expriment toutes le même phénotype ($CD34^{+/+}$; $CD38^{-}$) (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994).

Le concept de cellule souche cancéreuse a ensuite été étendu aux tumeurs solides, comme les cancers du cerveau, du sein, de la prostate et du pancréas. Initialement, les cellules souches cancéreuses de gliome (Singh et al., 2003), de cancer du colon (O'Brien et

al., 2007) et de cancer du pancréas (Hermann et al., 2007) ont été identifiées parce qu'elles exprimaient le marqueur CD133 et qu'un enrichissement par cytométrie en flux en cellules CD133+ augmentait la tumorigénicité des cellules lorsqu'elles étaient greffées à des souris immunodéprimées. Ainsi, une centaine de cellules $CD133^{+}$ suffisent à induire une tumeur dans ces conditions alors que des dizaines de milliers de cellules $CD133^{-}$ échouent dans les mêmes conditions. Les cellules souches de cancer du sein ont initialement été identifiées sur la base phénotypique $CD44^{+}/CD24^{-/low}$. Une centaine de ces cellules suffisent également à induire une tumeur dans une souris immunodéprimée lorsque des dizaines de milliers de cellules cancéreuses de sein n'en sont pas capables (Al-Hajj et al., 2003; Ginestier et al., 2007). De même, les cellules souches issues de cancer de la prostate ont été initialement identifiées sur la base de l'expression du marqueur CD34 (Collins et al., 2005) et sont capables, à partir d'une seule cellule greffée dans le pancréas d'une souris mâle immunodéficiente de reformer une tumeur (Wang et al., 2009).

Des cellules souches cancéreuses ont également été isolées à partir d'autres tumeurs solides. Ainsi, les mélanomes (Schatton et al., 2008), les cancers de la vessie (Chan et al., 2009), de la tête et du cou (Prince et al., 2007), des ovaires (Szotek et al., 2006; Zhang et al., 2008), du foie (Yang et al., 2008) et des poumons (Eramo et al., 2008; Kim et al., 2005) contiennent des cellules présentant les mêmes caractéristiques.

1.3.2. Cellules à l'origine des cancers et cellules souches cancéreuses

Les tumeurs sont le fruit de la mutation de quelques cellules ou d'une seule cellule fondatrice ayant muté dans des gènes régulateurs clés. Cette (ou ces) cellule(s) finit (finissent) par acquérir des propriétés de prolifération illimitée et incontrôlée. L'origine de cette cellule est inconnue. L'une des hypothèses est que des cellules d'une même lignée peuvent acquérir, par suite de mutations, des propriétés de cellules cancéreuses. Ces cellules peuvent à leur tour accumuler des mutations épigénétiques durant la progression néoplasique qui peut résulter en l'apparition d'une cellule souche cancéreuse (Visvader, 2011).

Cette cellule à l'origine des cancers ne doit pas être confondue avec les cellules souches cancéreuses. La cellule à l'origine des cancers fait plutôt référence au terme de « cellule initiatrice de tumeur » (d'où la confusion avec les CSC), alors que les cellules souches cancéreuses sont plutôt des cellules propagatrices de tumeurs (Visvader, 2011). La cellule qui subit une mutation dans un gène régulateur clé peut être une cellule qui n'est pas totalement différenciée et qui peut donner naissance à plusieurs types de cellules

différenciées (une cellule souche neurale qui peut donner des neurones et des cellules gliales par exemple). Il a été démontré que la réactivation des gènes *Ras* et *Akt* dans des progéniteurs neuraux peut former un glioblastome lorsque les progéniteurs sont réimplantés dans le cerveau de souris immunodéprimées (Holland et al., 2000).

Cependant, de plus en plus, l'hypothèse que le microenvironnement tumoral joue un rôle dans la formation des cellules souches cancéreuses, émerge. Il a en effet été montré pour certains cancers, que les fibroblastes associés aux cancers (CAFs) peuvent induire des transitions épithélio-mésenchymateuses (TEM) (Giannoni et al., 2011). Il existe plusieurs types de transitions épithélio-mésenchymateuses. Les TEM de type 1 interviennent lors de l'embryogenèse et de la morphogenèse des tissus. Les TEM de type 2 interviennent par la régénération et la réparation des tissus après une blessure dans les cas normaux, ou anormalement dans les fibroses en réponse à une réaction inflammatoire inappropriée. Enfin, les TEM de type 3 se produisent pour les cellules cancéreuses, aidant les cellules tumorales pour l'invasion et la formation de métastases (Taylor et al., 2010). Les TEM sont régulées par le microenvironnement tumoral qui secrète des cytokines et des facteurs de croissance tels que le TGF-β (facteur de croissance des tumeurs β). De nombreux facteurs induisant les TEM sont impliqués dans la prolifération cellulaire, l'invasion des cellules cancéreuses et la formation des métastases. Ainsi, les facteurs, Snail-1 et Twist sont les plus actifs, mais les facteurs Snail-2, ZEB (*Zinc E-box Binding factor*), FOXC2 (*forkhead box C2*), TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) et Goosecoid sont également impliqués dans les TEM. Phénotypiquement, une cellule épithéliale qui subit une TEM voit une perte de ses molécules d'adhérences (E-cadhérine, caténines et cytokératine). A l'inverse, elle va sécréter d'avantage de métalloprotéases matricielles (MMP) impliquées dans le clivage des protéines de la matrice extracellulaire. En parallèle, la cellule qui subit une TEM exprime également la fibronectine et du collagène. Enfin, elle subit un changement métamorphique, puisqu'elle perd sa polarité baso-apicale et adopte un cytosquelette favorable à la mobilité de la cellule (Al Saleh et al., 2011). La TEM est réversible, le phénomène est alors appelé transition mésenchymo-épithéliale (TME). Elle peut se produire lorsque la cellule cancéreuse a terminé sa migration et atteint sa destination. Dans le cas des cancers, cette étape est importante pour la formation des métastases et se fait sous le signal de BMP-7 (protéine morphogène de l'os 7), des facteurs de croissance des fibroblastes 1, 3 et 7 et de Wnt 4. La TEM confère différents avantages à la cellule cancéreuse en lui permettant d'augmenter sa survie, de créer de l'angiogenèse, d'augmenter sa tumorigénicité, de lui conférer des propriétés de cellules souches et d'accroître sa résistance aux thérapies (figure 9).

Il a été démontré dans le cadre du cancer du sein que les cellules cancéreuses qui subissent une transition épithélio-mésenchymateuse ont des propriétés d'auto-

renouvellement, leur conférant ainsi des caractéristiques les rapprochant des cellules souches cancéreuses (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). Ceci n'est pas surprenant car les voies de signalisation impliquées dans la TEM sont également impliquées dans le maintien et l'auto-renouvellement des cellules souches normales et cancéreuses (Wnt et Notch) (Singh and Settleman, 2010).

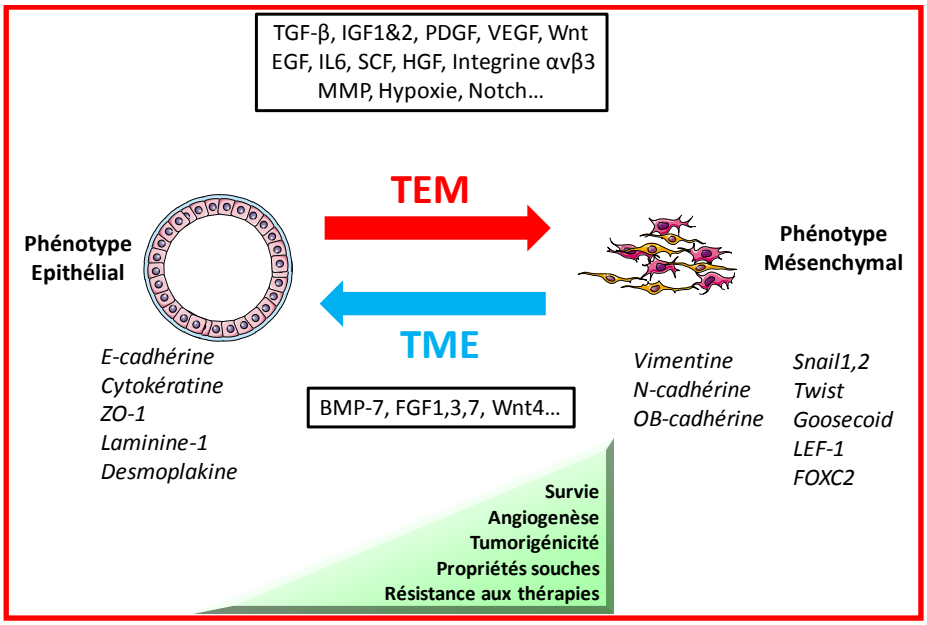


Figure 9 : La plasticité cellulaire
Les cellules épithéliales peuvent entreprendre une transition epithélio-mésenchymateuse (TEM) sous l'impulsion de TGF-β (facteur de croissance des tumeurs β), IGF1&2 (insulin-like growth factor 1 et 2), PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes), VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, EGF (facteur de croissance de l'épiderme), HGF (facteur de croissance des hépatocytes). Elles acquièrent alors un phénotype mésenchymal en perdant l'expression de protéines d'adhésion comme l'E-cadhérine, la ZO-1 (occludine) et la desmoplakine et des protéines du cytosquelette comme la cytokératine mais en exprimant d'autres protéines d'adhésions (N- et OB-cadhérines) et la protéine du cytosquelette vimentine plus aptes à la migration cellulaire. Ce faisant, la cellule cancéreuse augmente sa survie, sa tumorigénicité et sa résistance aux thérapies, acquiert des propriétés de cellules souches et augmente l'angiogenèse. Le phénomène inverse TME (transition mésenchymo-épithéliale) se produit lorsque la cellule arrive à destination et forme une métastase. Elle ré-acquiert alors un phénotype épithélial.
Cette figure est adaptée de van der Pluijm 2011 *et a été réalisée à l'aide de Servier Medical Art.*

La TEM est l'un des mécanismes qui peut expliquer l'existence de cellules souches cancéreuses dans les tumeurs. D'autant plus que les CSC sont plus fréquentes dans les tumeurs d'un stade plus avancé, c'est-à-dire des tumeurs qui vont former des métastases et dont les cellules vont subir une TEM (Krantz et al., 2011). Cependant, l'hypothèse qu'une cellule souche subit une mutation, acquérant ainsi un phénotype cancéreux et se

différenciant pour former la masse tumorale, est également répandue (Lindeman and Visvader, 2011).

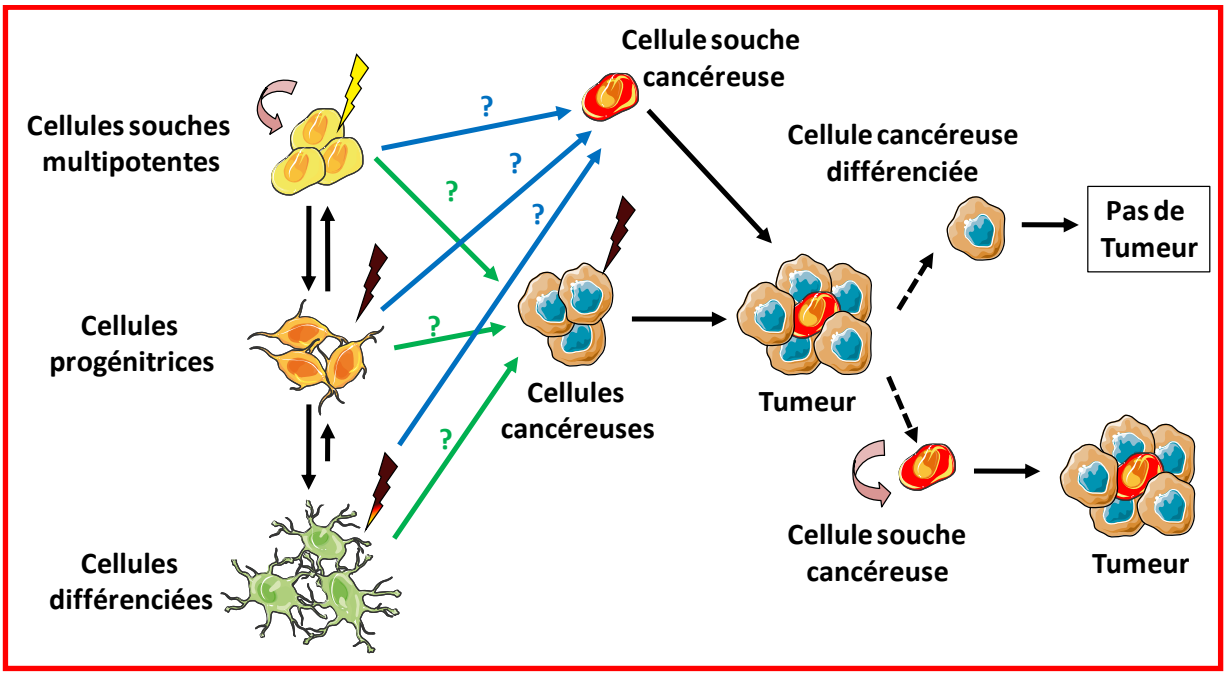


Figure 10 : Cellule d'origine et cellule souche cancéreuse.
La cellule à l'origine des tumeurs peut être une cellule différenciée ou indifférenciée (flèches vertes). Ces cellules cancéreuses peuvent subir des pressions du microenvironnement tumoral qui induisent l'apparition d'une cellule souche cancéreuse. Une autre possibilité est que les cellules souches, progénitrices ou différenciées acquièrent des mutations les transformant directement en cellule souche cancéreuse. Cette cellule, dans des conditions environnementales favorables, est alors capable de former une tumeur (flèches bleues).
La tumeur est formée de cellules cancéreuses différenciées et de cellules souches cancéreuses. Les cellules cancéreuses différenciées sont incapables de reformer une tumeur d'elles-mêmes alors que les cellules souches cancéreuses en sont capables lorsqu'elles se trouvent dans des conditions environnementales adéquates.
Cette figure a été réalisée à l'aide de Servier Medical Art.

Ainsi, les cellules souches cancéreuses pourraient provenir soit de cellules de n'importe quel stade de différenciation ayant subi une mutation dans un gène de régulation clé, les transformant ainsi en cellules souches cancéreuses, soit de cellules tumorales ayant subi une transition épithélio-mésenchymateuse leur conférant des propriétés d'auto-renouvellement illimitées (figure 10).

1.3.3. Propriétés des cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses, quelle que soit leur provenance, sont donc des cellules capables de reformer une tumeur ayant le même phénotype que la tumeur d'origine,

par des mécanismes de différenciation. Elles ont également des propriétés d'auto-renouvellement en théorie illimitées, et peuvent acquérir la capacité de former des métastases. Ces cellules sont très résistantes aux chimiothérapies et aux radiothérapies classiquement utilisées dans le traitement des cancers. Ces différentes propriétés conduisent à désigner les CSC, non seulement comme des cellules entretenant la tumeur, mais aussi comme les cellules responsables des rechutes après traitements.

1.3.3.1. Auto-renouvellement et différenciation

La principale caractéristique des cellules souches (cancéreuses ou non) est que ces cellules sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier. L'auto-renouvellement permet à une cellule souche de donner lieu à une ou deux autre(s) cellule(s) souche(s) et la différenciation permet à une cellule souche de former une ou deux cellules dont les capacités de prolifération et de différenciation sont plus limitées que celles de la cellule-mère. L'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches sont régis par des divisions symétriques et asymétriques (figure 11). Les divisions symétriques permettent d'accroître le stock de cellules souches dans les niches (la zone subventriculaire pour les cellules souches neurales par exemple). Dans le cas normal, elles surviennent particulièrement lors du développement embryonnaire, mais elles peuvent également survenir à l'âge adulte pour régénérer un stock de cellules souches entamé par une blessure ou une maladie. Les divisions symétriques peuvent également donner naissance à deux cellules-filles différenciées. Les divisions asymétriques des cellules souches sont les plus fréquentes à l'âge adulte. En effet, les cellules se divisent alors pour produire une cellule-fille différenciée et une autre cellule souche (Wang et al., 2011b). Les divisions asymétriques semblent être gérées, au moins en partie, par la voie de signalisation de Notch (détaillée dans le paragraphe 1.4.2.2.1 page 40) qui est particulièrement activée dans les cellules souches. En cas de dérèglement, les divisions asymétriques peuvent se transformer en divisions symétriques incontrôlées et pourraient être à l'origine d'un cancer (Morrison and Kimble, 2006).

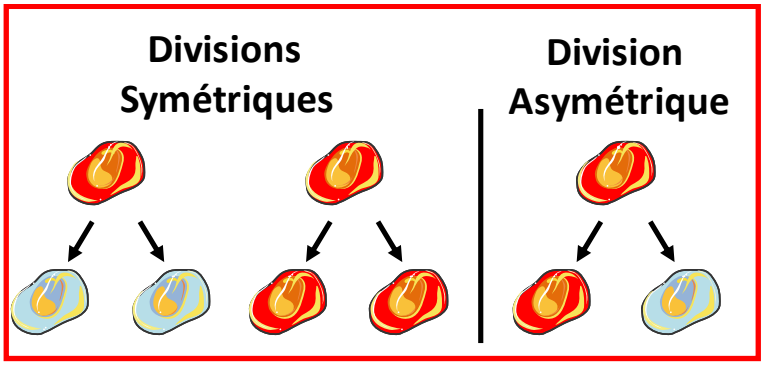


Figure 11 : Caractéristique des cellules souches : les divisions symétriques et asymétriques
Lors de la division symétrique, la cellule souche (rouge) qui entreprend une division donne naissance à deux cellules-filles souches (rouge) ou deux cellules-filles différenciées (bleues). Lors de la division asymétrique, la cellule souche (rouge) donne naissance à une cellule-fille souche (rouge) et à une cellule-fille différenciée aux capacités de prolifération limitées (bleue).

1.3.3.2. Résistance des cellules souches cancéreuses aux traitements anti-tumoraux.

Les cellules souches cancéreuses présentent divers mécanismes de résistance aux chimiothérapies et radiothérapies. La plupart de ces mécanismes sont dus à une surexpression ou à la répression de l'expression de certains gènes clés, permettant ainsi aux cellules d'échapper à la mort cellulaire.

1.3.3.2.1. Mécanismes de résistance à la radiothérapie

Les cellules souches cancéreuses ont des mécanismes qui leur permettent d'échapper à la mort induite par la radiothérapie (radiations ionisantes). En effet, lorsqu'elles sont irradiées *in vitro*, les cellules souches cancéreuses réparent leur ADN avec plus d'efficacité que les cellules différenciées de la masse tumorale. Plusieurs mécanismes interviennent après l'irradiation des cellules souches cancéreuses. Une étude (Bao et al., 2006) montre qu'après une irradiation de 2Gy, les CSC gardent leur capacité à se différencier en divers types cellulaires et à reformer une tumeur hétérogène. De plus, l'irradiation induit une augmentation de 3 à 5 fois le nombre de CSC (CD133+) dans des xénogreffes de souris. Ceci est dû à une phosphorylation plus importante des protéines telles qu'ATM (*ataxia télengectasia mutation*), Rad17 (régulateur crucial lors des dommages à l'ADN) et des protéines Chk1 et Chk2 (*Checkpoint kinase 1 et 2*) dans les CSC par rapport aux cellules différenciées de la masse tumorale. Ces protéines phosphorylées sont activées et interviennent pour stopper le cycle cellulaire et permettre la réparation des cassures

double brin de l'ADN (Bao et al., 2006). Une autre étude sur des cellules souches mammaires non cancéreuses qui sont également résistantes à l'irradiation (2Gy) suggère que la voie Wnt/β-Caténine (détaillée au paragraphe 1.4.2.2.3 page 42) serait impliquée dans les mécanismes de résistance des cellules. En activant le facteur de transcription TCF (*T-cell factor*), la β-caténine augmenterait la production de survivine, une protéine inhibitrice de l'apoptose, impliquée dans la survie des cellules (Woodward et al., 2007).

1.3.3.2.2. Mécanisme de résistance aux chimiothérapies

De même que pour échapper à la radiothérapie, les cellules souches cancéreuses se servent de plusieurs mécanismes afin d'échapper aux traitements chimiothérapeutiques. L'un des principaux mécanismes de résistance des cellules souches cancéreuses à la chimiothérapie est la surexpression de transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*, contenant un domaine de liaison à l'ATP). Ces protéines sont des transporteurs actifs car ils nécessitent l'utilisation d'une molécule d'ATP pour faire sortir une molécule dans le milieu extracellulaire. Il existe plusieurs types de transporteurs ABC, mais les plus surexprimés dans les cellules souches cancéreuses sont les transporteurs ABCB1 (ou glycoprotéine P, ou MDR-1 pour multi-drogue résistant-1) et le transporteur ABCG2 (ou BCRP1 pour protéine de résistance aux cancers du sein). En effet, le transporteur ABCB1 semble être surexprimé dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome et induit des résistances à la doxorubicine, à l'étoposide, au carboplatine et à la carmustine (Nakai et al., 2009). Le transporteur ABCG2 quant à lui est connu pour induire une résistance des cellules souches cancéreuses de gliomes par efflux des molécules comme la mitoxantrone, l'adriamycine, la daunorubicine, l'étoposide, le topotécan et l'irinotécan. Ce transporteur est également connu pour exclure le composé Hoechst 33342 des cellules. Cette propriété est parfois utilisée pour identifier et trier les cellules souches cancéreuses des cellules différenciées (Liu et al., 2006).

D'autre part, comme mentionné précédemment, les cellules souches cancéreuses sont capables de réparer les dommages causés à l'ADN par le témozolomide grâce à la surexpression de la protéine MGMT (voir paragraphe 1.2.2.3.1 page 19) (Liu et al., 2006). Les cellules souches cancéreuses ont également un mécanisme de résistance anti-apoptotique (au déclanchement de l'apoptose). En effet, les cellules souches issues de glioblastomes surexpriment les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-XL et des inhibiteurs de protéines pro-apoptotiques dont la survivine qui a pour rôle d'inhiber les caspases 3, 7 et 9 (Liu et al., 2006). Les cellules souches issues d'hépatocarcinomes activent la voie Akt/PKB (protéine kinase B) qui altère la phosphorylation des facteurs Bcl-2 (anti-apoptotique) et Bad

(pro-apoptotique) incitant la cellule à survivre et contribuant ainsi à la chimiorésistance (Ma et al., 2008). Enfin, il a été démontré que les cellules souches issues de cancer du pancréas surexpriment la Cycline D1 (Yin et al., 2011) qui est un facteur de régulation de la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Ce facteur a été démontré comme ayant des activités améliorant la survie des cellules (Biliran et al., 2005).

D'autres mécanismes qui ne sont pas propres aux cellules souches cancéreuses jouent également un rôle dans la résistance des cellules souches cancéreuses aux chimiothérapies telles que la surexpression ou la mutation des protéines-cibles de la molécule anticancéreuse. L'inactivation de la molécule-médicament par une augmentation de la métabolisation (surexpression des protéines qui dégradent la molécule) est également un mécanisme intervenant dans la chimiorésistance. Enfin, la compartimentalisation des molécules est également un mécanisme des cellules visant à réduire les effets des chimiothérapies (Dean, 2009).

1.3.3.3. Quiescence des CSC

Comme mentionné au paragraphe 1.3.3.2.1, les cellules souches cancéreuses sont capables d'arrêter leur cycle cellulaire afin de pouvoir réparer leur ADN après une irradiation. Cependant, ce mécanisme n'a pas lieu uniquement après une irradiation. En effet, les cellules souches cancéreuses sont capables d'arrêter leur cycle cellulaire en phase G_0, même en absence de traitement (figure 12). Ce phénomène est appelé la « quiescence » ou la « dormance ». Les cellules sont bloquées en phase G1 et n'entrent pas dans le cycle cellulaire.

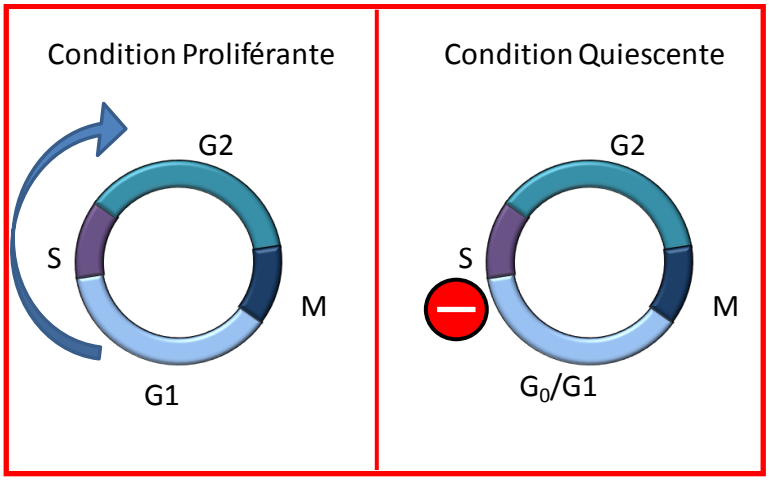


Figure 12 : Comparaison du cycle cellulaire des cellules proliférantes et des cellules quiescentes.
Pour les cellules en prolifération (à gauche) le cycle cellulaire est continu, les cellules entrent en phase de synthèse de l'ADN (S) dès que le cycle est terminé. Pour les cellules en quiescence (à droite), le cycle cellulaire est bloqué en phase G_0/G1 et n'entre pas dans la phase de synthèse de l'ADN.

Pour les fibroblastes primaires en culture, trois programmes permettent l'entrée des cellules en quiescence. Il s'agit de 1) la privation d'agents mitogènes, 2) l'inhibition de contact et 3) la perte d'adhérance. Des variations de l'expression de certains gènes sont montrées pour l'entrée et le maintien de la quiescence des cellules. Ainsi sont observées, une diminution de l'expression de gènes associés à la progression du cycle cellulaire tels que la cycline B1, cdc20 (protéine 20 du cycle cellulaire), cul-1 (culline-1) et myc (*myelocytomatosis viral oncogene homolog*), ainsi qu'une augmentation de gènes importants dans la régulation du cycle cellulaire tels que TP53 (*tumor protein 53*), cycline D2 et MXI1 (protéine 1 interagissant avec le facteur X associé à myc) et une augmentation des régulateurs clés de la voie de signalisation de l'état souche tels que FZD2 et TCF7L2 pour la voie de régulation Wnt (site d'intégration « sans ailes »), SMAD1 (*mothers against DPP homolog 1*) pour la voie de régulation BMP (protéine morphogénique de l'os) et Hes1 (*hairy and enhancer of split 1*) pour la voie de régulation Notch. Enfin, l'augmentation de l'expression d'inhibiteurs des kinases dépendant des cyclines tels que p21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) qui joue un rôle essentiel pour l'entrée et le maintien des cellules en quiescence et $p16^{INK4a}$ (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) est également observée (Coller et al., 2006). Ces mécanismes pourraient également intervenir dans la quiescence des cellules souches cancéreuses, bien que la culture des cellules requiert déjà la perte des conditions adhérentes (Moore and Lyle, 2010). D'autre part, il a été montré que les progéniteurs neuraux sont maintenus en quiescence par des chimiokines telles que SDF-1 (facteur 1 dérivant des cellules stromales) par action sur les récepteurs CXCR4 (récepteur 4

de chimiokine à motif C-X-C) et CCR3 (récepteur 3 de chimiokine à motif C-C) (Krathwohl and Kaiser, 2004).

Les chimiothérapies et radiothérapies conventionnelles ciblent les cellules en prolifération et requièrent l'activation du cycle cellulaire pour enclencher l'apoptose. La nature quiescente des cellules souches cancéreuses est donc un mécanisme inhérent de résistance et de survie de ces cellules aux traitements anticancéreux conventionnels. Les facteurs mentionnés ci-dessus, notamment les facteurs clés intervenant dans les voies de régulation de l'état souche, seraient donc des cibles intéressantes pour forcer les cellules à sortir de quiescence afin de les rendre sensibles aux traitements conventionnels (Moore and Lyle, 2010).

1.3.3.4. Hypoxie et acidité du microenvironnement tumoral

L'hypoxie est une caractéristique des tumeurs solides. Les cellules cancéreuses se développent en effet plus rapidement que le réseau vasculaire associé, entrainant une insuffisance de l'apport d'oxygène au niveau de la tumeur. Pour contrer ce phénomène, les cellules cancéreuses s'adaptent et adaptent leur environnement au manque d'oxygène. En effet, en état d'hypoxie, les facteurs de transcription HIF (facteurs inductibles par l'hypoxie) des cellules cancéreuses sont stabilisés. Ceci a pour conséquence de modifier l'expression d'environ 200 gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire, le métabolisme glucidique et lipidique, la régulation du pH, l'angiogenèse et les métastases, comme par exemple PAI-1 (inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1), VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), PGK1 (phosphoglycérate kinase-1), la transferrine et l'érythropoïétine. L'activation des facteurs de transcription HIF confère ainsi aux tumeurs un phénotype plus agressif et une résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie. L'hypoxie tumorale et HIF sont donc des facteurs de mauvais pronostic (Vaupel et al., 1989).

L'observation d'une interaction directe entre HIF-1α et le domaine intracellulaire de Notch (NICD) a mis en évidence un lien très étroit entre l'hypoxie et le maintien du caractère souche des cellules souches (Gustafsson et al., 2005). Notch est un récepteur transmembranaire impliqué dans le maintien du caractère souche des cellules (voir paragraphe 1.4.2.2.1 et figure 14, page 41). La même interaction entre HIF-1α et NICD favoriserait la prolifération des cellules souches neurales (Panchision, 2009; Qiang et al., 2011). D'autre part, HIF-1α inhibe la voie SMAD induite par l'activation des récepteurs BMP (protéine morphogénique de l'os) empêchant ainsi les cellules de se différencier et d'entrer en apoptose. L'hypoxie peut donc jouer un rôle dans le maintien de l'état souche et dans la survie des cellules.

Une autre conséquence majeure de l'hypoxie est la diminution du pH au niveau extracellulaire du microenvironnement tumoral. En effet, en condition hypoxique les cellules cancéreuses répondent par un changement de métabolisme, passant de la phosphorylation oxydative à la glycolyse. En 1956, Warburg propose que le changement de métabolisme des cellules est à l'origine de la cellule cancéreuse (Warburg, 1956). On sait maintenant que ce sont des mutations génétiques qui sont à l'origine des cellules cancéreuses, mais ce changement de métabolisme des cellules cancéreuses a gardé le nom d' « effet Warburg ».

La glycolyse étant moins efficace que la phosphorylation oxydative pour produire de l'ATP, la cellule cancéreuse consomme encore plus de glucose pour pourvoir à ses besoins énergétiques (Chiche et al., 2010). En absence d'oxygène, le facteur HIF-1α stabilisé active la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1). PDK1 inhibe la pyruvate déshydrogénase (PDH) dont le rôle est de transformer le pyruvate en Acétyl-CoA (Kim et al., 2006). Incapable de poursuivre le cycle de l'acide tricarboxylique, le pyruvate est alors transformé en lactate par la lactate déshydrogénase A (LDHA) et le lactate est expulsé des cellules par le transporteur de monocarboxylate 4 (MCT4) (Marie and Shinjo, 2011). Durant tout ce processus et lors de l'hydrolyse de l'ATP, les cellules produisent des protons H^+ (Chiche et al., 2010). Ces protons sont transportés activement dans le milieu extracellulaire par des échangeurs Na^+/H^+. Dans des conditions normoxiques, ces protons sont évacués par la circulation sanguine. En hypoxie, les protons et le lactate s'accumulent et acidifient le milieu extracellulaire dont le pH est alors compris entre 6,2 et 6,8. L'acidité du milieu extracellulaire ralentit la prolifération cellulaire, les cellules arrêtent leur cycle cellulaire et entrent en quiescence (phase G_0, voir paragraphe 1.3.3.3). L'acidité du milieu extracellulaire favorise également la radiorésistance des cellules et peut moduler la cytotoxicité de certaines molécules chimiothérapeutiques. Ainsi, l'activité cytotoxique d'une molécule peut être diminuée. C'est un mécanisme de résistance notamment vis-à-vis des molécules de chimiothérapie qui sont des bases faibles, telles que la mitoxantrone et la doxorubicine qui sont deux intercalants de l'ADN (Raghunand et al., 2003). D'autres molécules voient leur cytotoxicité augmenter. Par exemple, l'acide cis-urocanique est une molécule qui induit une diminution progressive du pH intracellulaire de plusieurs lignées cellulaires comme la lignée cellulaire A2058 de mélanome, d'une manière dépendant du pH extracellulaire. Ces cellules répondent alors par un signal apoptotique. La particularité de l'acide cis-urocanique est que cette molécule est active à pH extracellulaire 6,5, mais lorsque le pH extracellulaire est de 7,4, la molécule n'induit plus de diminution du pH intracellulaire des cellules A2058 et donc plus de signal apoptose (Laihia et al., 2010).

1.3.3.5. Cellules souches cancéreuses et nouveau paradigme en cancérologie

L'existence des CSC apporte une vision différente des tumeurs cancéreuses et de leur traitement. Dans cette hypothèse, les tumeurs sont considérées comme un organe et les CSC jouent le même rôle que les cellules souches des tissus normaux (sains). Leur aptitude à générer une nouvelle tumeur dans un environnement adéquat laisse à penser qu'elles sont également impliquées dans la formation des métastases (Kraljevic Pavelic et al., 2011). Enfin, leur résistance aux chimiothérapies et radiothérapies les désigne également comme responsables des récidives après traitements. En effet, même si les thérapies existantes permettent d'éliminer les cellules différenciées de la masse tumorale, la plupart des cellules souches cancéreuses survivent aux traitements. La conséquence est que la masse tumorale diminue, parfois même totalement pour les agents chimiothérapeutiques les plus efficaces, mais le patient ne guérit pas car les cellules souches cancéreuses survivantes seraient à l'origine de la rechute tumorale en proliférant et en se différenciant (figure 13). Ainsi, le nouveau paradigme prône de cibler non seulement les cellules de la masse tumorale mais également les cellules souches cancéreuses afin d'éradiquer la tumeur (Reya et al., 2001).

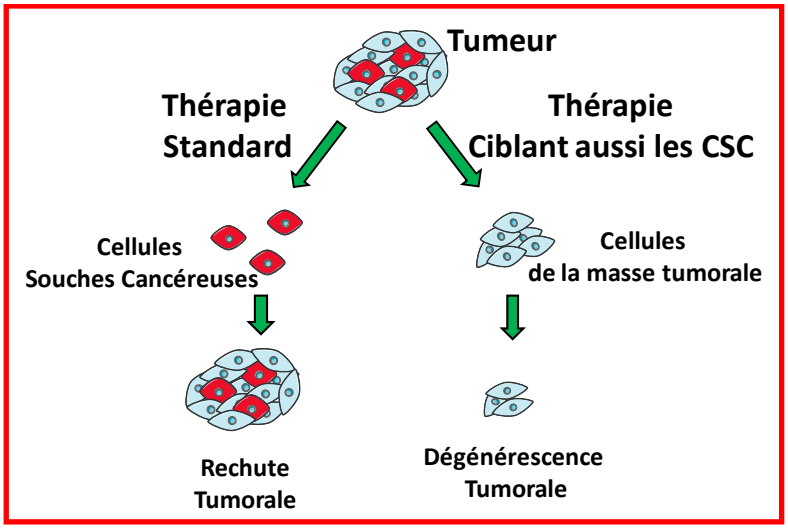


Figure 13 : Paradigme des cellules souches cancéreuses.
Légende : en bleu, les cellules différenciées de la masse tumorale ; en rouge, les cellules souches cancéreuses.
Cette figure a été adaptée de Reya et al., 2001.

1.4. Les cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes

1.4.1. Mise en évidence des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes

La présence de cellules souches dans les tumeurs solides les plus agressives a été suspectée pendant longtemps (Reya et al., 2001). Cependant, des cellules souches cancéreuses ont été identifiées dans les glioblastomes pour la première fois en 2003 par l'équipe de P. B. Dirks (Singh et al., 2003). Ces cellules ont été isolées à partir d'une suspension unicellulaire de tumeur du cerveau triées par cytométrie grâce à l'expression du marqueur CD133 (= prominine 1, « cluster » de différenciation 133) également retrouvé dans les cellules souches leucémiques. En plus de pouvoir former des neurosphères en culture, ces cellules $CD133^+$ sont capables de s'auto-renouveler et de proliférer, mais elles sont également capables de se différencier pour reformer le phénotype de la tumeur originale *in vivo* et *in vitro*. Ainsi, plusieurs tumeurs pédiatriques semblent posséder des cellules souches cancéreuses. Des neurosphères primaires obtenues par dissociation de la tumeur et dépôt de 3.10^6 cellules vivantes par plaque de 60mm dans du milieu favorisant la croissance des cellules souches neurales, ont été observées principalement dans les médulloblastomes (≈17%), les glioblastomes (11%) et les épendymomes anaplasiques (8%) mais plus rarement pour les astrocytomes pilocytiques (moins de 1%). La comparaison de la fréquence de formation des neurosphères primaires, indiquant la présence de cellules souches cancéreuses, dans les médulloblastomes (grade IV), les glioblastomes (grade IV), les épendymomes anaplasiques (grade III) et les astrocytomes pilocytiques (grade I) suggère que les cellules souches cancéreuses sont plus fréquentes dans les gliomes de haut grade (Singh et al., 2003).

Quelques mois suivant la publication de l'équipe de Dirks, une autre équipe, celle de Kornblum (Hemmati et al., 2003), montre que des neurosphères dérivées de glioblastomes multiformes pédiatriques peuvent former des tumeurs, migrer, proliférer et se différencier lorsqu'elles sont implantées dans le cerveau de rats et que ces neurosphères sont transplantables en série dans le cerveau de souris. De manière intéressante, l'étude suggère l'importance du microenvironnement tumoral en montrant que 100% des greffes intracrâniennes donnent des tumeurs alors que seules 50% des greffes sous-cutanées en sont capables. Ces cellules partagent de nombreuses caractéristiques avec les cellules souches neurales non tumorales, dont des caractéristiques morphologiques (capacité à former des neurosphères) et des marqueurs protéiques dont CD133, mushashi-1 (marqueur

des cellules souches neurales), Sox2 (*sex determining region Y-box 2* ; un facteur de transcription), PSP (phosphosérine phosphatase ; marqueur des progéniteurs neuraux) et bmi-1 (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog* ; impliqué dans l'auto-renouvellement des cellules souches) (Hemmati et al., 2003).

Quelques mois plus tard, l'équipe de Dirks montre que les cellules $CD133^+$ issues de glioblastomes pédiatriques et de l'adulte, peuvent régénérer des tumeurs de phénotype identique à la tumeur d'origine lorsqu'elles sont greffées dans le cerveau de souris immunodéprimées (NOD/SCID : souris diabétiques non obèses combiné à une immunodéficience sévère), ce qui suggère que la présence de cellules souches cancéreuses dans les glioblastomes non seulement chez les enfants, mais également chez les adultes. Une centaine de ces cellules suffisent à créer une tumeur, alors que des dizaines de milliers de cellules $CD133^-$ ne sont pas capables de générer de tumeur dans les mêmes conditions (Singh et al., 2004).

D'autres équipes ont également isolé et caractérisé des cellules souches cancéreuses à partir de glioblastomes. Ainsi, l'équipe de Vescovi a isolé de telles cellules et a montré leur multipotentialité, c'est-à-dire leur capacité à se différencier *ex vivo* en cellules exprimant des marqueurs spécifiques de cellules de la lignée neurale telles que des marqueurs des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes (Galli et al., 2004). Depuis, d'autres équipes ont isolé des cellules souches cancéreuses de glioblastomes pédiatriques ou adultes (Patru et al., 2010).

1.4.2. Caractéristiques des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes

Les cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes partagent de nombreux caractères avec les cellules souches neurales adultes. Ainsi, plusieurs marqueurs sont communs à la fois aux cellules souches neurales et aux cellules souches cancéreuses. De même, les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation, et les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la survie et de la prolifération cellulaires, sont des points communs entre les cellules souches neurales adultes et les cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes. Enfin, les cellules souches neurales adultes et les cellules souches cancéreuses présentent toutes les deux une activité télomérasique, une résistance à l'apoptose et une augmentation de l'activité des transporteurs membranaires.

1.4.2.1. Marqueurs spécifiques des cellules souches issues de glioblastomes.

L'un des marqueurs les plus utilisés pour isoler et caractériser les cellules souches cancéreuses est le marqueur CD133. CD133 est une glycoprotéine à 5 domaines transmembranaires, aussi appelée prominine-1. Ce marqueur est exprimé par d'autres cellules souches cancéreuses comme les cellules souches leucémiques et il est également exprimé par les cellules souches neurales adultes, alors qu'il n'est pas ou très peu exprimé dans les cellules différenciées (Kania et al., 2005). Ainsi ce marqueur membranaire s'est révélé être fondamental pour la découverte des propriétés biologiques des cellules souches issues de glioblastomes. La caractérisation et l'isolement de ces cellules grâce à CD133 a permis de mieux comprendre des mécanismes comme la progression tumorale et les résistances de ces cellules à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Cependant, une étude montre que des cellules $CD133^-$ issues de glioblastomes peuvent aussi avoir des propriétés de cellules souches et qu'elles sont capables d'induire la formation de tumeurs lorsqu'elles sont greffées dans le cerveau de souris immunodéprimées (Beier et al., 2007). Une autre étude révèle que CD133 peut être perdu lorsque les cellules souches cancéreuses sont en culture pendant un certain temps, sans pour autant perdre leurs caractéristiques spécifiques des cellules souches (formation de neurosphères et résistance aux agents chimiques comme le témozolomide) (Patru et al., 2010). Le marqueur CD133 ne semble donc pas indispensable aux cellules souches cancéreuses, et, bien qu'utile dans l'histoire de la découverte des cellules souches cancéreuses de glioblastomes, il n'est pas un marqueur absolu des cellules souches de glioblastome. Sa présence dans les tumeurs pourrait cependant révéler la nature de la cellule d'origine de la tumeur, car les cellules $CD133^+$ ont un profil transcriptomique proche de celui des cellules souches neurales fœtales alors que les cellules $CD133^-$ ont un profil transcriptomique proche de celui des cellules souches neurales adultes localisées au niveau de la zone subgranulaire de l'hippocampe (Lottaz et al., 2010).

Un autre marqueur fréquemment utilisé est la nestine. Il s'agit d'une protéine des filaments intermédiaires (constituant du cytosquelette) qui est présent dans les cellules souches et les progéniteurs de la lignée neurale dans le système nerveux central des mammifères durant le développement. Lors de la différenciation, les cellules cessent de produire de la nestine et produisent des neurofilaments si la différenciation se fait en neurone ou de la GFAP si la différenciation suit la voie des cellules gliales (Dell'Albani, 2008). La nestine est un marqueur des cellules proliférantes et migrantes et des auteurs ont formulé l'hypothèse que la nestine puisse affecter l'organisation de la chromatine lors des

divisions symétriques ou asymétriques des cellules souches ou puisse servir de régulateur de l'expression des gènes (Veselska et al., 2006). Cependant, la nestine étant un marqueur intracellulaire, elle ne peut pas être utilisée pour trier les cellules souches cancéreuses afin de les mettre en culture pour pouvoir les caractériser, car l'utilisation de ce marqueur nécessite la fixation et la perméabilisation des cellules.

1.4.2.2. Mécanismes régissant la prolifération, la différenciation et la survie des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes

1.4.2.2.1. La voie Notch

Notch est un récepteur transmembranaire largement impliqué dans le développement embryonnaire du système nerveux central, le maintien des propriétés des cellules souches neurales chez l'adulte et dans la formation des cancers. Lorsqu'il est activé par l'un de ses ligands, Dll1 (*delta-like 1*) ou Jagged, le domaine intra-cellulaire de Notch (NICD) est clivé par un complexe d'α-secrétases. NICD se transloque alors dans le noyau de la cellule où il s'associe avec le facteur de transcription RBPJ (*Recombining binding protein suppressor of hairless*) et recrute d'autres co-activateurs pour exprimer des gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaires (Hu et al., 2011) (figure 14).

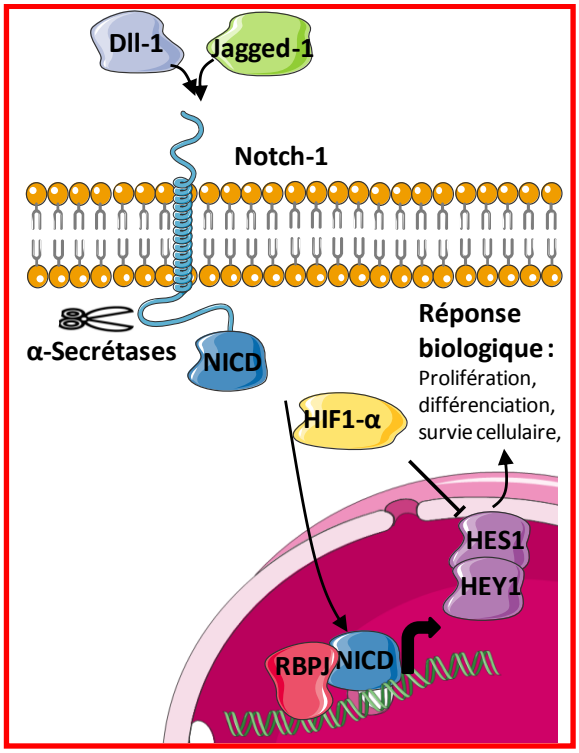


Figure 14 : Schéma simplifié de la voie Notch.
La liaison de Dll-1 (Delta-like-1) ou de Jagged-1 sur le récepteur Notch entraine le clivage du domaine intracellulaire de Notch (NICD) par des secrétases. NICD se lie alors à la protéine de liaison à la séquence de recombinaison de J-kappa (RBPJ), un facteur de transcription qui induit la transcription de HES-1 (hairy and enhancer of split) et HEY-1 (hairy and enhancer of split with YRPW motif 1), deux autres facteurs de transcription. La cellule répond à ce signal en proliférant, en se différenciant ou en n'entrant pas en apoptose.
En conditions hypoxiques, HIF-α (facteur induit par l'hypoxie) empêche la différenciation de la cellule.
Figure réalisée à l'aide de Servier Medical Art.

Pendant le développement embryonnaire, Notch assure d'abord la maintenance des cellules souches neurales et empêche leur différenciation en cellules précurseurs intermédiaires. Puis, plus tard dans le développement du système nerveux central, Notch induit la différenciation des cellules souches neurales vers la voie astrocytaire et assure la non-différenciation des cellules souches neurales en neurones. A l'âge adulte, Notch module le cycle cellulaire pour garder les propriétés d'auto-renouvellement des cellules souches neurales (Hu et al., 2011).

Notch et ses ligands sont fréquemment surexprimés dans les gliomes. Des ARN interférents de Notch, Dll1 ou Jagged induisent une inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose dans des lignées cellulaires de gliomes (Purow et al., 2005) et dans des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes (Wang et al., 2011a). Les facteurs de transcription HES (*hairy and enhancer of split*), effecteurs de la voie Notch, sont également impliqués dans la différenciation et la prolifération des cellules souches cancéreuses de glioblastomes (Fan et al., 2010; Hu et al., 2011) et le facteur HIF-α, impliqué dans les conditions hypoxiques, maintient les cellules souches cancéreuses dans un état indifférencié (Wang et al., 2011c) (voir paragraphe 1.3.3.4 page 34).

1.4.2.2.2. La voie Sonic Hedgehog

Sonic Hedgehog (SHH) est un ligand du récepteur patched (PTCH). En absence de son ligand, PTCH inhibe le récepteur couplé aux protéines G (RCPG) Smoothened (SMO).

La liaison de SHH à PTCH lève l'inhibition de SMO qui induit une transduction de signal *via* les protéines de la famille GLI (homologue de l'oncogène associé aux gliomes). La voie SHH est importante dans l'embryogenèse, dès les premières étapes de formation du tube neural et pour le développement du cerveau (Uchida et al., 2011). La voie SHH maintient les cellules souches cancéreuses dans les niches cellulaires, dans un état indifférencié et régule leur prolifération (Bar et al., 2007). La voie SHH est impliquée dans la progression des tumeurs (Dahmane et al., 2001) en induisant la motilité et le caractère invasif des cellules souches cancéreuses des glioblastomes. L'inhibition de SHH par ARN interférant réduit la migration des cellules CD133+ (Uchida et al., 2011) (figure 15).

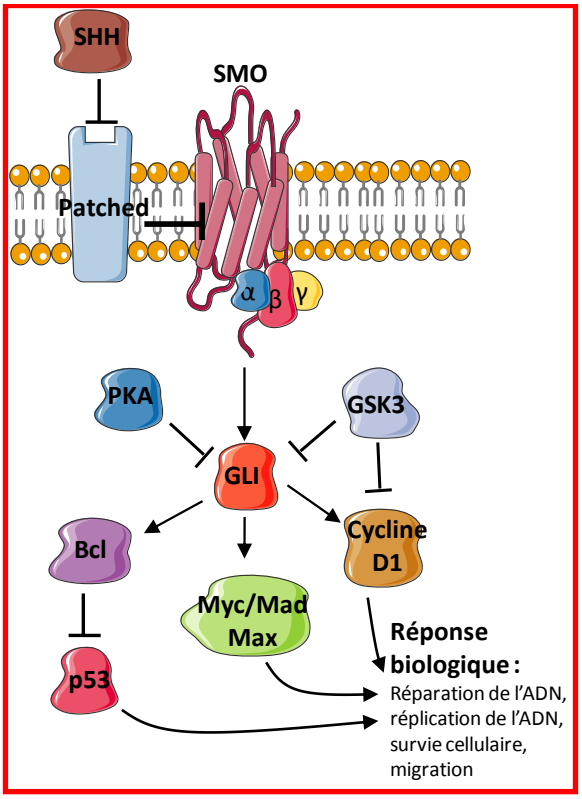


Figure 15 : Schéma simplifié de la voie Sonic Hedgehog.
La liaison de Sonic Hedgehog (SHH) inhibe le récepteur Patched. Smoothened (SMO, un RCPG) est alors libéré et active les facteurs de la famille GLI (homologue de l'oncogène associé aux gliomes). Ces facteurs activent les facteurs de transcription Myc, Mad et Max qui jouent un rôle dans la prolifération et le maintien des propriétés souches des cellules. Les facteurs GLI activent aussi Bcl, impliqué dans la survie cellulaire et la Cycline D1, impliquée dans le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Les protéines GSK3 (kinase 3 de la glycogène synthase) et PKA (protéine kinase A) sont capables d'inhiber GLI.
Figure réalisée à l'aide de Servier Medical Art.

Une étude très récente montre qu'un ensemble de micro-ARN (miR 302-367) non transcrits dans les cellules souches de glioblastomes sont rapidement transcrits dans un milieu favorisant la différenciation cellulaire. Ce cluster de miR supprime l'état souche des cellules en empêchant l'auto-renouvellement et l'infiltration des cellules en bloquant la voie de CXCR4 entrainant la perturbation de la voie SHH-GLI (Fareh et al., 2011).

1.4.2.2.3. La voie Wnt/β-caténine

En absence de Wnt, la β-caténine est associée à un complexe multiprotéique de destruction, phophorylée, ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. Lorsque Wnt se fixe

sur son récepteur Frizzled (FZD), la β-caténine est libérée de son complexe, transloquée dans le noyau de la cellule et se lie au facteur de transcription TCF (*T-cell factor*) pour activer la transcription de gènes dont la cycline D1, c-Myc et c-Jun qui ont été largement impliqués dans le développement des cancers (Barker, 2008) (figure 16).

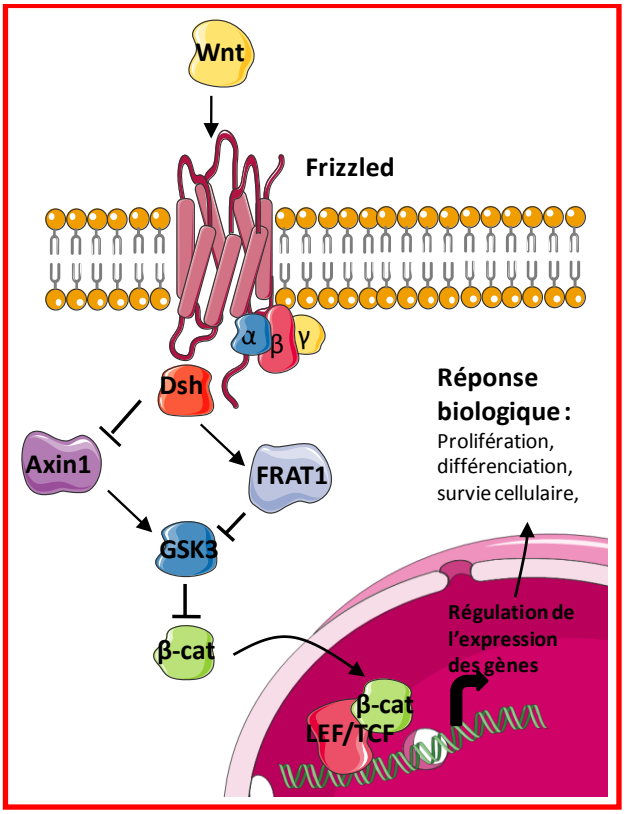


Figure 16 : Schéma simplifié de la voie Wnt/β-caténine.
La liaison de Wnt sur son récepteur Frizzled entraine l'activation de Dsh (dishevelled) qui inhibe GSK3 (kinase 3 de la glycogène synthase) et bloque la β-caténine. La β-caténine se lie au facteur de transcription LEF/TCF pour exprimer des facteurs impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.
Figure réalisée à l'aide de Servier Medical Art.

Une étude sur des cellules non souches de glioblastome montre que l'inhibition de la β-caténine par ARN interférant induit l'apoptose, une diminution de la croissance cellulaire, un arrêt du cycle cellulaire en phase G_0/G1, et une diminution de l'expression de la cycline D1, de c-Myc et de c-Jun (Liu et al., 2011). Une étude récente sur des cellules souches cancéreuses issues d'une lignée cellulaire de glioblastome montre que Frizzled 4 est impliqué dans les transitions épithélio-mésenchymateuses, l'invasion et le caractère souche de ces cellules (Jin et al., 2011).

1.4.2.2.4. Les voies de signalisation des facteurs de croissance

Les récepteurs des facteurs de croissance EGFR (récepteur du facteur de croissance de l'épiderme) et PDGFR (récepteur du facteur de croissance des plaquettes) et leurs ligands EGF (facteur de croissance de l'épiderme), TGFα (facteur α de croissance des

tumeurs) et PDGF (facteur de croissance des plaquettes), sont fréquemment amplifiés et surexprimés dans les gliomes bien que peu caractérisés dans les cellules souches cancéreuses. La surexpression de ces ligands et de leurs récepteurs, ainsi que des mutations induisant une activité constitutive des récepteurs, entrainent une suractivation des voies de transduction associées (Howard et al., 2010; Nazarenko et al., 2011). Ainsi, l'activation des domaines à activité tyrosine-kinase de ces récepteurs entraine d'une part l'activation de RAS (sarcome de rat) stimule la voie des MAP kinases (mitogen-activated protein kinase), conduisant à l'activation des facteurs de transcription CREB (*cAMP response element-binding*), c-Jun/c-Fos et Myc. D'autre part, la voie de la PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) est également activée en aval de la stimulation des voies de ces récepteurs. L'activation de cette voie conduit à la production de PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) qui active la protéine kinase AKT. Cette kinase inactive GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) et active mTor (cible de la rapamycine chez les mammifères). La stimulation de l'activité des facteurs de transcription CREB, c-Jun/c-Fos et Myc ainsi que de la kinase mTor conduit à une augmentation de la croissance, de la survie et de la migration cellulaire.

L'inhibition de la voie de signalisation induite par la liaison d'un ligand sur PDGFR s'avère décevante dans le traitement des gliomes. En effet, l'imatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase, n'a pas d'effet anti-prolifératif sur les cellules de gliomes. Les cellules compensent le blocage de PDGFR par un mécanisme préexistant ou développent très rapidement un mécanisme de croissance indépendant du PDGFR (Raymond, 2009).

Les études menées sur l'inhibition de la voie de signalisation de l'EGFR se sont également avérées décevantes. Cependant, des associations de molécules inhibant la signalisation de l'EGFR et des molécules inhibant d'autres voies de signalisation pourraient être testées afin d'avoir un effet positif sur la survie globale et la survie sans progression des patients atteints de glioblastomes (voir chapitre 1.2.2.3.2 : Essais Cliniques).

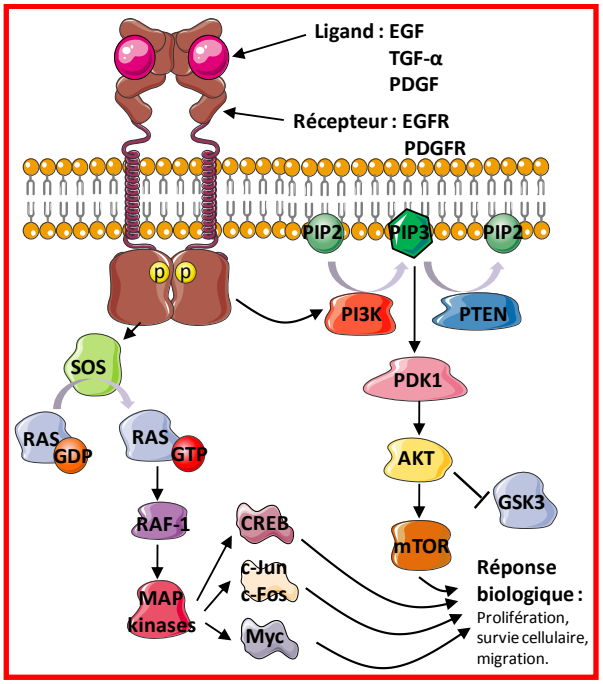


Figure 17: Schéma simplifié de la voie de signalisation des facteurs de croissance
La liaison du ligand sur le récepteur à activité tyrosine kinase entraine la dimérisation du récepteur et l'autophosphorylation des résidus tyrosine intracellulaires. Ceci conduit à l'activation, d'une part, de la voie RAS (sarcome de rat) MAP-kinases (mitogen activated protein kinase) qui stimule les facteurs de transcription c-Jun/c-Fos, Myc et CREB (protéine de liaison aux éléments de réponse à l'AMPcyclique). D'autre part, la voie de la PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase) est activée et conduit à la formation de PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). Ce phospholipide induit la voie AKT et mTOR (cible de la rapamycine chez les mammifères). mTOR et les facteurs de transcription favorisent la prolifération, la survie et la migration cellulaire. La protéine PTEN (homologue de la phosphatase et de la tensine) régule négativement la voie PI3K/AKT en transformant le PIP3 en PIP2 (phosphatidylinositol-3,4-diphosphate).
Abréviations : EFG, facteur de croissance de l'épiderme ; TGF-α, facteur de croissance des tumeurs α ; PDGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes ; EGFR, récepteur de l'EGF ; PDGFR, récepteur du PDGF ; P, phosphate ; GSK3, kinase 3 de la glycogène synthase.
Figure réalisée à l'aide de Servier Medical Art.

1.4.2.3. Conclusions sur les caractéristiques moléculaires des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes

Les cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes sont donc parfois caractérisées par l'expression du marqueur CD133 et de la nestine. Cependant, CD133 n'est pas un marqueur indispensable aux cellules souches cancéreuses car des cellules n'exprimant pas ce marqueur ont été identifiées comme ayant des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation semblables aux cellules souches neurales adultes, tout en gardant la capacité d'induire des tumeurs dans des souris immunodéprimées (Wang et

al., 2008a). Ce marqueur n'est donc pas un marqueur universel des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes, d'autant plus qu'il est également exprimé dans des cellules souches non cancéreuses.

D'autres protéines sont surexprimées dans les cellules souches de glioblastome. Beaucoup ont un rôle dans la protection des cellules contre les agressions subies lors des traitements anticancéreux dont le transporteur ABCG2, la méthyltransférase MGMT, les protéines clés du cycle cellulaire Chk-1 et Chk-2 (*checkpoint kinases 1 et 2*), Rad17 et ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), les inhibiteurs de protéines de l'apoptose dont la survivine et les suppresseurs de l'apoptose Bcl-2 et Bcl-XL (voir paragraphe 1.3.3.2 page 30). Les autres protéines surexprimées ont des rôles variés tels que CXCR4, un récepteur couplé aux protéines G codant le récepteur 4 à chimiokine à motif C-X-C (Liu et al., 2006). Ce récepteur joue un rôle dans l'orientation de la migration des cellules lors du développement du système nerveux central (Ehtesham et al., 2004), et est également impliqué dans la voie SHH/GLI (Fareh et al., 2011). CXCR4 est donc impliqué dans la migration intracérébrale des cellules souches de glioblastome, en plus de jouer un rôle dans le maintien de la quiescence des cellules (Krathwohl and Kaiser, 2004).

Il existe donc peu de marqueurs fiables pour étudier les cellules souches cancéreuses et de nombreuses voies de signalisation impliquées dans l'embryogenèse sont dérégulées dans les cellules souches cancéreuses. Des protéines surexprimées ou constitutivement actives dans ces voies de signalisation suractivent ces voies de signalisation et confèrent aux cellules souches cancéreuses, un avantage de résistance aux radiothérapies et aux chimiothérapies classiquement utilisées dans les traitements anticancéreux. Ces facteurs, et toutes les protéines impliquées dans ces voies de signalisation, sont des cibles pertinentes pour de futurs traitements anticancéreux.

1.5. Identification de molécules actives sur les cellules souches cancéreuses par criblage de chimiothèques

Depuis la mise en évidence des cellules souches cancéreuses, leur mécanisme de résistance aux radiothérapies et chimiothérapies classiquement utilisées, ainsi que le paradigme qui découle de leurs propriétés d'auto-renouvellement et de prolifération font de ces cellules des « cibles à abattre » dans le traitement des cancers. Ces cibles pertinentes ont déjà fait l'objet de plusieurs études visant à découvrir des molécules actives sur leur prolifération ou leur différenciation. La plupart des études se basent sur l'inhibition d'un ou de

plusieurs facteurs-clés des voies de signalisation régissant la prolifération, le maintien de l'état indifférencié ou la survie des cellules souches cancéreuses nouvellement identifiées. Cependant, les études décrites ci-dessous se basent sur la découverte de molécules dont l'activité inhibe directement la prolifération ou la survie des cellules souches cancéreuses. La clé pour conduire des études visant à identifier des inhibiteurs des cellules souches cancéreuses est de générer suffisamment de cellules souches cancéreuses pour pouvoir réaliser les tests, tout en maintenant le caractère souche de ces cellules.

Afin de s'affranchir de cette étape, l'équipe de Dirks (les premiers à avoir isolé des cellules souches de glioblastomes) ont réalisé un criblage sur des cellules souches neurales fœtales murines (f-NSC murines). Bien qu'elles ne soient ni humaines, ni tumorales, l'équipe postule que ces cellules possèdent tout de même des propriétés souches identiques aux cellules souches cancéreuses humaines. Abolir ces propriétés souches reviendrait à cibler directement les cellules souches cancéreuses. Dans leur étude, l'équipe de Dirks a testé les composés de la chimiothèque LOPAC (Chimiothèque de composés pharmacologiquement actifs ; Sigma®) en tant qu'inhibiteurs des cellules souches neurales fœtales en utilisant un test colorimétrique dosant l'activité de la succinate déshydrogénase des mitochondries. Dans ce test, l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase, mesurée par absorbance, est proportionnelle à la survie cellulaire en présence des molécules de la chimiothèque. Les résultats montrent que les f-NSC murines sont sensibles à 160 composés de la chimiothèque LOPAC lorsqu'elles sont incubées pendant 96 heures à 37°C en présence de 3µM de composé. Après vérification de l'effet de 43 des composés ayant eu un effet sur les cellules f-NSC murines au criblage primaire, 40 molécules ont été confirmées dans les mêmes conditions lors d'un criblage secondaire. Ces composés ont ensuite été testés sur des cellules souches de médulloblastome de souris hétérozygotes pour Patched (*Ptch*$^{+/-}$) qui intervient dans la voie de signalisation de Sonic Hedgehog (voir paragraphe 1.4.2.2.2). Les composés sont également actifs sur ces cellules cancéreuses murines et parfois avec plus d'efficacité. Cette approche originale a permis d'identifier de nouvelles voies de signalisation impliquées dans la croissance des cellules souches neurales murines et laisse supposer que ces voies de signalisation, dont beaucoup sont impliquées dans la neurotransmission (tels que les voies de signalisation des récepteurs dopaminergiques, muscariniques et opioïdes), jouent aussi un rôle dans la croissance des cellules souches cancéreuses (Diamandis et al., 2007).

Plus tard, la même équipe a rendu les cellules souches cancéreuses adhérentes afin de pouvoir utiliser un test de suivi photographique et distinguer les différents types cellulaires présents dans la culture en réalisant un marquage des différents lignages cellulaires. La « NIH clinical collection », chimiothèque de 460 composés déjà utilisés dans des essais

cliniques sur l'Homme, a été testée à 10µM pendant 48h sur ces cellules souches cancéreuses adhérentes et la réponse des cellules a été évaluée en utilisant un appareil IncucyteHD system (Essen Instruments, USA) permettant de faire un suivi photographique en temps réel. Les résultats confirment ce qui a été observé pour les cellules souches neurales fœtales murine dans la publication de Diamandis et al., 2007, à savoir que les cellules souches issues de glioblastomes humains sont sensibles aux médicaments qui modifient les voies de signalisation impliquées dans la neurotransmission (Pollard et al., 2009).

Une autre étude utilisant des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes de plusieurs patients et de lignées cellulaires de glioblastomes montre la mise au point d'un test basé sur la capacité des cellules souches à former des sphères lorsqu'elles sont en culture (Gal et al., 2007). Ainsi, les molécules actives sur les cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes de patients ou de lignées cellulaires de glioblastomes, les empêchent de former des neurosphères et la mortalité cellulaire est évaluée par l'utilisation du bleu de Trypan. Ce test présente l'avantage de n'utiliser que 20000 cellules fraichement isolées de glioblastomes par puits et de tester à la fois la mortalité et la fonctionnalité des cellules souches cancéreuses. Cependant, il présente l'inconvénient de ne pas être automatisable dû à l'absence de mesure de l'activité des cellules vivantes. Peu de molécules peuvent donc être testées en même temps (Gal et al., 2007).

Une autre étude surmonte la limitation de la quantité de cellules souches cancéreuses disponibles, en utilisant des cellules ayant subi une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Suite à cette TEM, les cellules peuvent acquérir des caractères de cellules souches (voir la description dans le paragraphe 1.3.2 page 25). L'équipe de Lander a induit une transition épithélio-mésenchymateuse dans une lignée cellulaire de cancer du sein par transfection d'un ARN interférant qui inhibe la traduction de la Cadhérine E (molécule d'adhésion exprimée dans les cellules épithéliales). Ils observent l'apparition de cellules $HMLE^{shEcad}$ présentant des caractères d'auto-renouvellement, de prolifération, de différenciation, de tumorigénicité dans des souris immunodéprimées et de résistance à des composés chimiothérapeutiques. Ils ont donc utilisé ces cellules présentant des caractères de cellules souches, pour cribler une chimiothèque de 16000 composés contenant des molécules de chimiothèques commerciales et de chimiothèques d'extraits naturels. La toxicité de ces composés sur les cellules a été évaluée avec un test basé sur la présence d'ATP dans les puits contenant les cellules et les molécules testées, le test Cell Titer-Glo® (Promega). Le signal lumineux mesuré est directement proportionnel à la viabilité cellulaire. Plusieurs composés actifs sur les cellules $HMLE^{shEcad}$ produites par TEM ont été testés sur les cellules de la lignée cellulaire de cancer du sein n'ayant pas subi de TEM, afin de tester

la sélectivité des composés actifs pour les cellules HMLE^{shEcad}. Une molécule, la salinomycine, a été retenue car elle présente cette sélectivité pour les cellules HMLE^{shEcad}. Cette molécule est un ionophore potassique. Des tests *in vivo* sur modèle murin montrent que la salinomycine est aussi active sur des tumeurs formées par injection de cellules cancéreuses de sein. Les mécanismes par lesquels la salinomycine induit une cytotoxicité spécifique des cellules souches cancéreuses restaient inconnus lors de l'étude. Cependant, cette publication a ouvert la voie sur l'étude des mécanismes de la salinomycine et depuis, de nombreuses autres équipes les étudient.

Enfin, une dernière étude publiée en août 2011 utilise une culture cellulaire isolée de glioblastome qui forme des neurosphères dans un milieu supplémenté en EGF et bFGF. Ces cellules présentent la capacité de former des tumeurs lorsqu'elles sont greffées à des souris, alors que les mêmes cellules cultivées dès l'extraction tumorale dans un milieu contenant du sérum et qui sont adhérentes, n'en sont pas capables. Le criblage de différentes chimiothèques (30000 composés en tout parmi lesquels les composés de la chimiothèque Prestwick, une chimiothèque de molécules commercialisées) sur ces cellules a révélé 694 composés capables d'induire une diminution de la prolifération/survie de la population cellulaire ainsi enrichie en CSC. Le test basé sur la mesure de l'ATP (ATPLite, PerkinElmer) met en évidence 11 molécules qui présentent une sélectivité avec un log(10) de différence par rapport aux mêmes cellules dans du milieu contenant du sérum. Cependant, l'efficacité *in vivo* de ces composés n'a pas encore été démontrée.

Ces différentes études ont mené à l'identification de quelques molécules actives sur des cellules souches cancéreuses. Ces molécules peuvent permettre d'améliorer les traitements anticancéreux actuels et de mieux comprendre la physiopathologie de ces cellules souches cancéreuses. Cependant, la spécificité d'action de ces molécules sur différents types cellulaires n'a guère été abordée dans certaines de ces études tandis que les modèles *in vivo* manquent dans d'autres études.

OBJECTIFS

OBJECTIFS :

Les cellules souches cancéreuses identifiées au sein de nombreuses tumeurs sont devenues des cibles de choix dans le traitement anticancéreux. Leurs propriétés d'auto-renouvellement, de différenciation et de résistance aux chimiothérapies et radiothérapies classiquement utilisées dans les traitements anticancéreux les rendraient responsables du développement des tumeurs, de l'hétérogénéité des tumeurs et des récidives après traitements. Comprendre le fonctionnement de ces cellules et trouver de nouvelles molécules actives capables d'induire leur mort ou leur différenciation est devenu un enjeu majeur pour le développement de nouvelles thérapies.

Mes études ont porté sur des CSC isolées de tumeurs glioneuronales malignes (TGNM) correspondant aux gliomes de grade III et IV selon la classification de l'OMS, de patients de la Pitié-Salpétrière par l'équipe du Dr Hervé Chneiweiss (INSERM UMR 894) à Paris. Trois types de cellules ont été utilisés (TG1, TG16 et OB1). Ces cellules et surtout les cellules TG1 ont été caractérisées pour leur clonogénicité, leur capacité à se différencier en absence d'EGF et de b-FGF et en présence de sérum, leur capacité à être maintenues en culture pendant plusieurs années et leur capacité à générer des tumeurs lorsqu'elles sont greffées dans le cerveau de souris immuno-déficientes (Patru et al., 2010). Les objectifs de ma thèse ont été les suivants :

1- Poursuivre la caractérisation des CSC en examinant leur plasticité. Cette caractérisation a été effectuée *in vitro* en regardant leur comportement morphologique, en étudiant leur stabilité génétique et en étudiant l'expression de marqueurs de l'état souche des CSC.
2- Etudier la gestion de l'information par les CSC en analysant le profil d'expression des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).
3- Comprendre la physiopathologie des CSC par une approche de chimie biologie intégrative en recherchant par criblage de nouvelles molécules potentiellement actives sur les CSC de glioblastomes et en étudiant leur mécanisme d'action.

Ces différents points feront l'objet des chapitres suivants de ma thèse.

CARACTERISATION

DES

CELLULES

SOUCHES CANCEREUSES

2. Caractérisation des CSC

Les cellules qui font l'objet de notre étude ont été isolées par l'équipe du Dr Hervé Chneiweiss (INSERM U894, Paris). L'obtention de CSC de tumeurs cérébrales n'a lieu qu'avec des tumeurs de haut grade. Ainsi, les glioblastomes et les tumeurs glioneuronales malignes (TGNM) sont les tumeurs qui donnent le plus fréquemment des CSC, mais les TGNM semblent être les seules tumeurs qui donnent des CSC capables de se renouveler plus de 6 mois (Patru et al., 2010). Les CSC utilisées (TG1, TG16 et OB1) ont été isolées de TGNM. Ces cellules, et principalement les TG1, ont été caractérisées. Ces cellules forment des neurosphères qui peuvent être maintenues en cultures pendant longtemps et leur clonogénicité a été démontrée en mettant 500 cellule/puits, 200 cellules/puits et 1 cellule/puits de plaques 96 puits. Dans ces conditions, certaines cellules TG1 sont capables de reformer des neurosphères. Les cellules peuvent être différenciées en enlevant les facteurs de croissance EGF et b-FGF et en ajoutant du sérum de veau fœtal dans leur milieu de culture. Les cellules TG1 adhèrent alors dans le fond de la boite de culture et forment des prolongements. L'hétérogénéité cellulaire est maintenue pendant la différenciation des cellules car certaines expriment des marqueurs tels qu'Olig2 (facteur de transcription des oligodendrocytes) et d'autres, la tubuline β3 spécifique des neurones. Les cellules TG1 ont également été testées pour l'expression d'antigènes de surface, ainsi, 90% des cellules expriment les marqueurs CD56/NCAM (molécule d'adhésion des cellules neurales), CXCR4, CD90/Thy1 (antigène de différenciation des thymocytes) et VLA2 (*very late activation 2*) qui sont exprimés dans les progéniteurs neuraux, 10% des cellules expriment CD15/LeX/ssea1 (Lewis-X / *stage-specific embryonic antigen 1*) et CD34 (« cluster » de différenciation 34). Enfin, 20 à 30% des cellules TG1 initiales expriment le marqueur CD133, traditionnellement utilisé pour la caractérisation des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes, mais après plusieurs passages, seules quelques cellules maintiennent l'expression de ce marqueur, tout en gardant leurs propriétés de clonogénicité et de formation de neurosphères. Ces résultats suggèrent que les caractéristiques souches des cellules dépendent de l'environnement cellulaire plutôt que de CD133. L'expression de transcrits jouant un rôle dans le maintien des propriétés souches des cellules a également été testée. Les cellules expriment POU5F1 (POU classe 5 homeobox 1), TERT (télomérase) et Nanog. Le caryotype des cellules TG1 montre un profil féminin avec une haplotriploïdie avec des gains des chromosomes 1q, 5, 7, 9q, 12 et 14 et des pertes des chromosomes 9p et 18q. Le profil protéomique des cellules TG1 ne semble pas varier en culture entre la semaine 40 et la semaine 160. Les cellules TG1 sont capables de former des tumeurs lorsque 200 à 1000

cellules sont greffées dans le cerveau de souris NOD/SCID. Dans ces conditions, la prolifération des cellules est observée et quelques cellules peuvent migrer le long des fibres neurales montrant le caractère infiltrant de ces cellules. Enfin, les cellules TG1 sont résistantes à 1000µM de témozolomide (60% de survie cellulaire) en présence et en absence de sérum de veau fœtal, alors que la concentration thérapeutique utilisée pour le traitement des patients atteints de glioblastomes correspond à 60µM sur les cellules.

Notre objectif est de connaitre ces cellules le mieux possible pour travailler sur un modèle bien défini en caractérisant d'avantage les cellules TG1 sur un plan phénotypique en observant la formation des neurosphères en culture et sur un plan moléculaire en étudiant la variation du caryotype cellulaire à partir d'une technique complémentaire au multi-FISH (multi fluorescence in situ hybridation) et l'expression de certains gènes spécifiques des cellules souches au niveau transcriptomique à l'aide d'une carte permettant l'étude simultanée de l'expression de plusieurs gènes.

2.1. Résultats sur la caractérisation des CSC

2.1.1. Formation des neurosphères

Les cellules souches cancéreuses de glioblastome TG1 ont la capacité de former des sphères appelées neurosphères et de pousser en suspension dans un milieu défini contenant de l'EGF et du bFGF (voir Matériels et méthodes paragraphe 6.1.1.1 page 196). Les neurosphères sont, comme leur nom l'indique, des structures sphériques tridimensionnelles constituées de cellules souches d'origine neurale. Ces neurosphères ont été longtemps considérées comme une preuve du caractère souche des cellules car elles étaient supposées être d'origine clonale. Or, les neurosphères sont souvent hétérogènes, résultant de l'agrégation de plusieurs cellules ou sphères, comme montré par des expériences de suivi de la culture cellulaire de cellules souches neurales murines par photographie (Singec et al., 2006).

Une expérience de suivi photographique des cellules TG1 en fonction du temps sur les cellules TG1 a été réalisée à l'aide d'un appareil IncuCyte™. Les cellules TG1 sont dissociées pour former une suspension unicellulaire la plus homogène possible. Huit puits d'une plaque 96 puits sont ensuite ensemencés avec cette suspension cellulaire à raison de 60000 cellules/puits. L'appareil IncuCyte™ photographie le même champ visuel d'un puits toutes les deux heures. Les résultats montrent que les cellules TG1 peuvent former des neurosphères en s'agrégeant. Dans les 12 heures qui suivent la dissociation des cellules en

culture, celles-ci se rapprochent et attirent les cellules et neurosphères qui se trouvent à proximité, parfois en formant des prolongements cytoplasmiques (figure 18, voir la flèche rouge indiquée 8h après la mise en culture des cellules). Les cellules vont ainsi former une neurosphère plus grosse (figure 18, voir la neurosphère encerclée en rouge, 10h après la mise en culture des cellules). Environ 90 heures après la mise en culture des cellules sans renouveler le milieu de culture des cellules, les neurosphères ainsi formées commencent à se désagréger. Des cellules se détachent et le contour des neurosphères n'est plus aussi net (figure 18, 168h après la mise en culture des cellules).

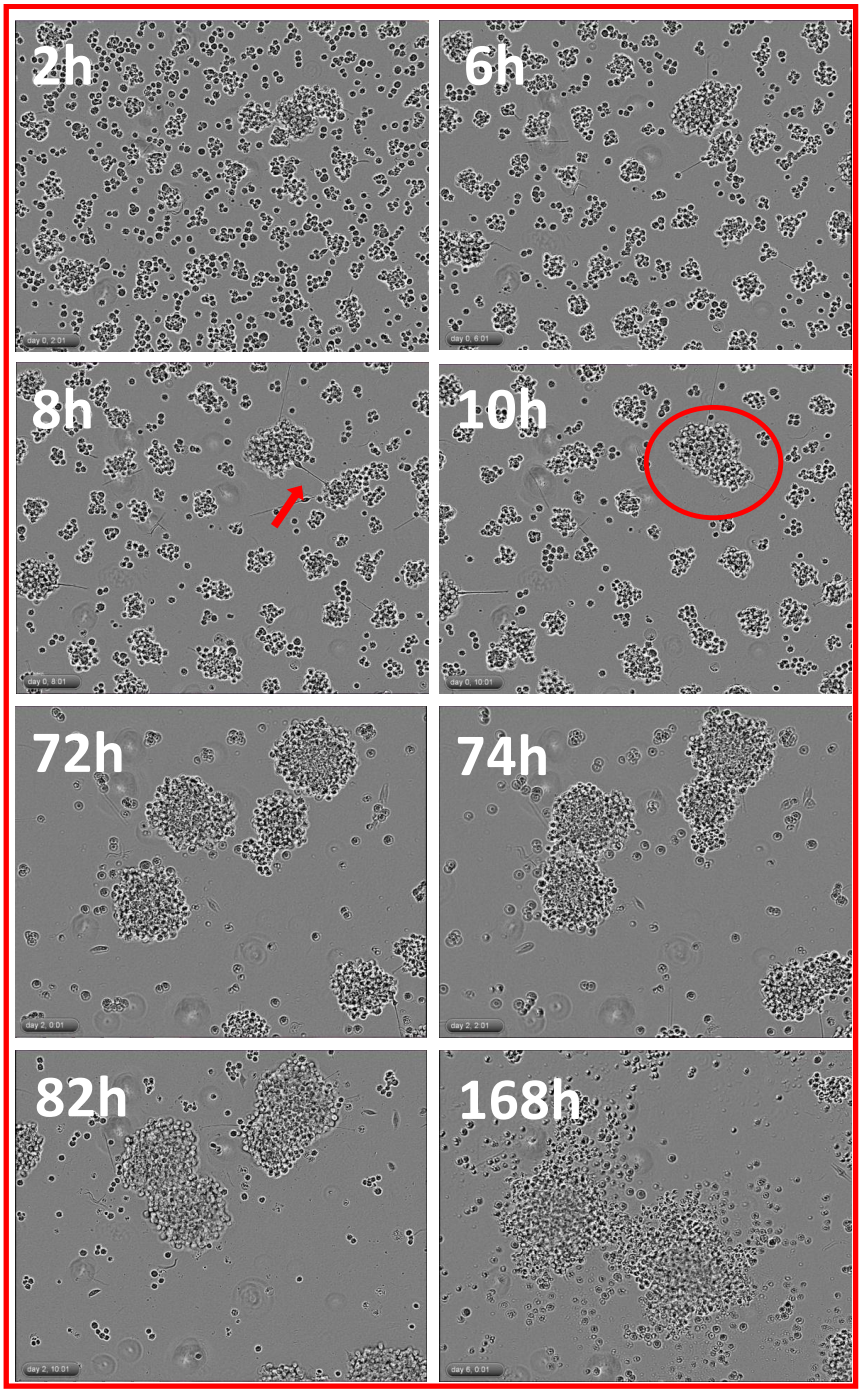


Figure 18 : Suivi photographique des cellules TG1 en culture.
Les cellules sont mises en culture à raison de 60000 cellules par puits pour des cellules TG1 à passage 26. Les cellules sont prises en photo toutes les deux heures, grâce à l'appareil IncuCyte™. Ici, les photos représentent l'évolution d'un champ photographique pour un puits. La même expérience a été réalisée pour 8 puits au total. L'indicateur d'échelle représente 100µm.

En parallèle au suivi photographique des cellules, l'IncuCyte™ analyse la densité cellulaire dans les puits, c'est-à-dire la surface occupée par les cellules dans le champ

observé par l'IncuCyte™, divisée par la surface totale du champ observé par l'IncuCyte™. Les résultats de l'étude de densité cellulaire montrent une rapide diminution de la densité dans les 12 heures qui suivent la mise en culture des cellules TG1 (figure 19). Après 90h de culture, on note que la densité des cellules augmente à nouveau pour se stabiliser à environ 70% après 140h de culture.

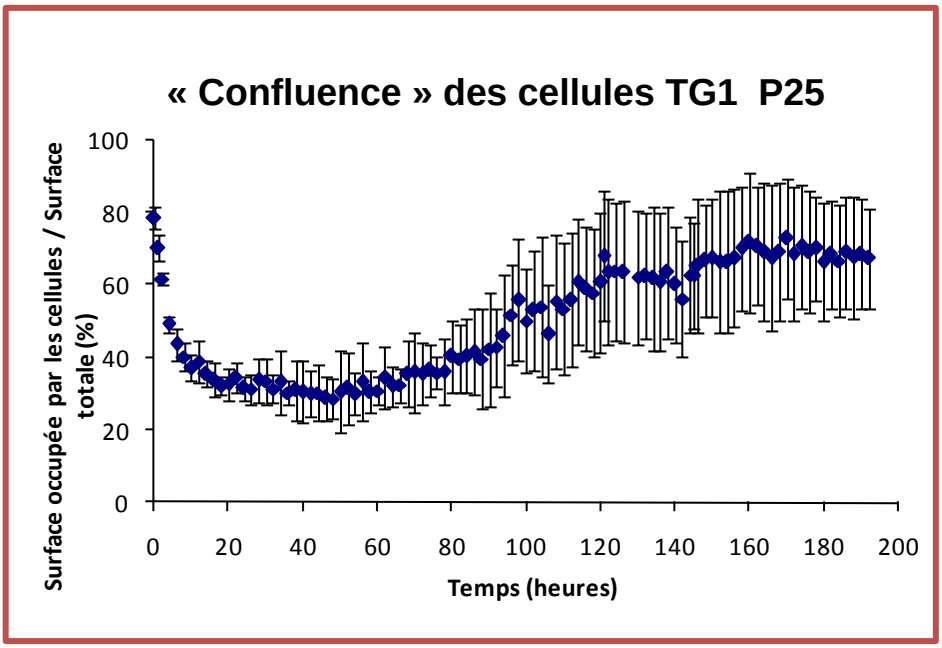


Figure 19 : « Confluence » des cellules TG1 en fonction du temps.
La confluence représente ici la surface occupée par les cellules par rapport à la surface totale du champ observé par l'appareil IncuCyte™. La confluence est calculée par le logiciel de l'IncuCyte™. Chaque point sur le graphique est la moyenne de la confluence calculée sur 8 puits contenant 60000 cellules/100µL/puits, les cellules TG1 sont au passage 26.

Une autre expérience de suivi photographique de la culture cellulaire de TG1 en fonction du nombre de cellules ensemencées au départ montre que la diminution de la densité cellulaire après la dissociation des cellules (T=0h) est plus importante lorsque les cellules sont plus nombreuses au départ (figure 20). A 100000 cellules par puits, la densité initiale est de près de 90% et chute à environ 30%, 12 heures après la mise en culture des cellules. Cependant, en dessous de 30000 cellules par puits à T=0h, la densité cellulaire ne varie plus dans les heures qui suivent la mise en culture et la dissociation des cellules et reste stable à environ 15% jusqu'à 95 heures après la mise en culture des cellules. Après 20h de mise en culture, la densité cellulaire est stabilisée entre 5 et 20% quelque soit le nombre initial de cellule dans un puits.

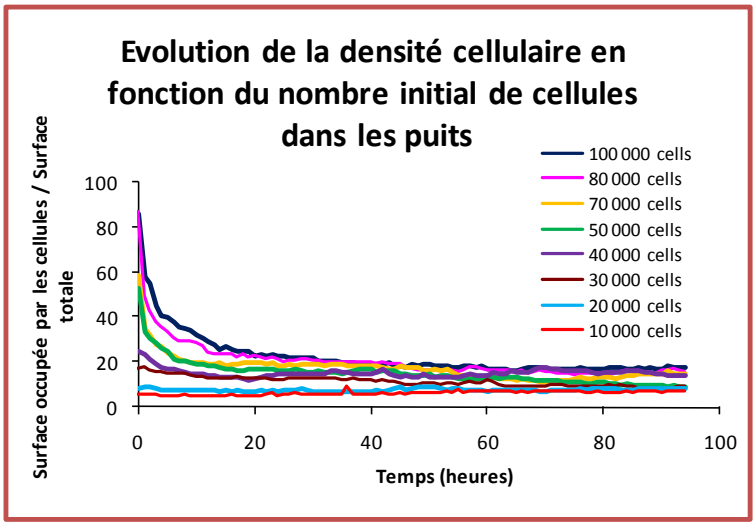


Figure 20 : « Confluence » des cellules TG1 en fonction du nombre initial de cellules par puits. *La confluence représente la surface occupée par les cellules par rapport à la surface totale du champ observé par l'IncuCyte™. Le graphique représente l'évolution de la « confluence » des cellules en fonction du temps pour chaque concentration initiale de cellules. Chaque courbe représente la moyenne de 3 puits contenant : 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 70000, 80000 ou 100000 cellules par puits.*

2.1.2. Caractérisation moléculaire des CSC, comparaison par rapport aux autres cellules en culture

En complément de la caractérisation morphologique, une caractérisation moléculaire des cellules souches cancéreuses de glioblastome est nécessaire. Bien qu'un caryotype ait été précédemment établi pour les cellules TG1, une analyse complémentaire permettant d'étudier les variations génomiques des CSC au cours de la culture cellulaire a été entreprise à l'aide de puces Affymetrix Genome Wide SNP_6. Une autre étude portant sur la transcription de gènes connus pour être exprimés dans les cellules souches ou dans différentes cellules engagées dans différents lignages cellulaires a été menée grâce à des cartes TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array Card d'Applied Biosystems.

2.1.2.1. Etude de la variation génomique au cours des passages cellulaires

L'étude du génome des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes TG1 entre dans le cadre de la grande étude des génomes de plusieurs lignées cellulaires. Le « Cancer Genome Project », initié par l' « International Cancer Genome Consortium » (ICGC), a pour but d'obtenir une description des variations génomiques, transcriptomiques et

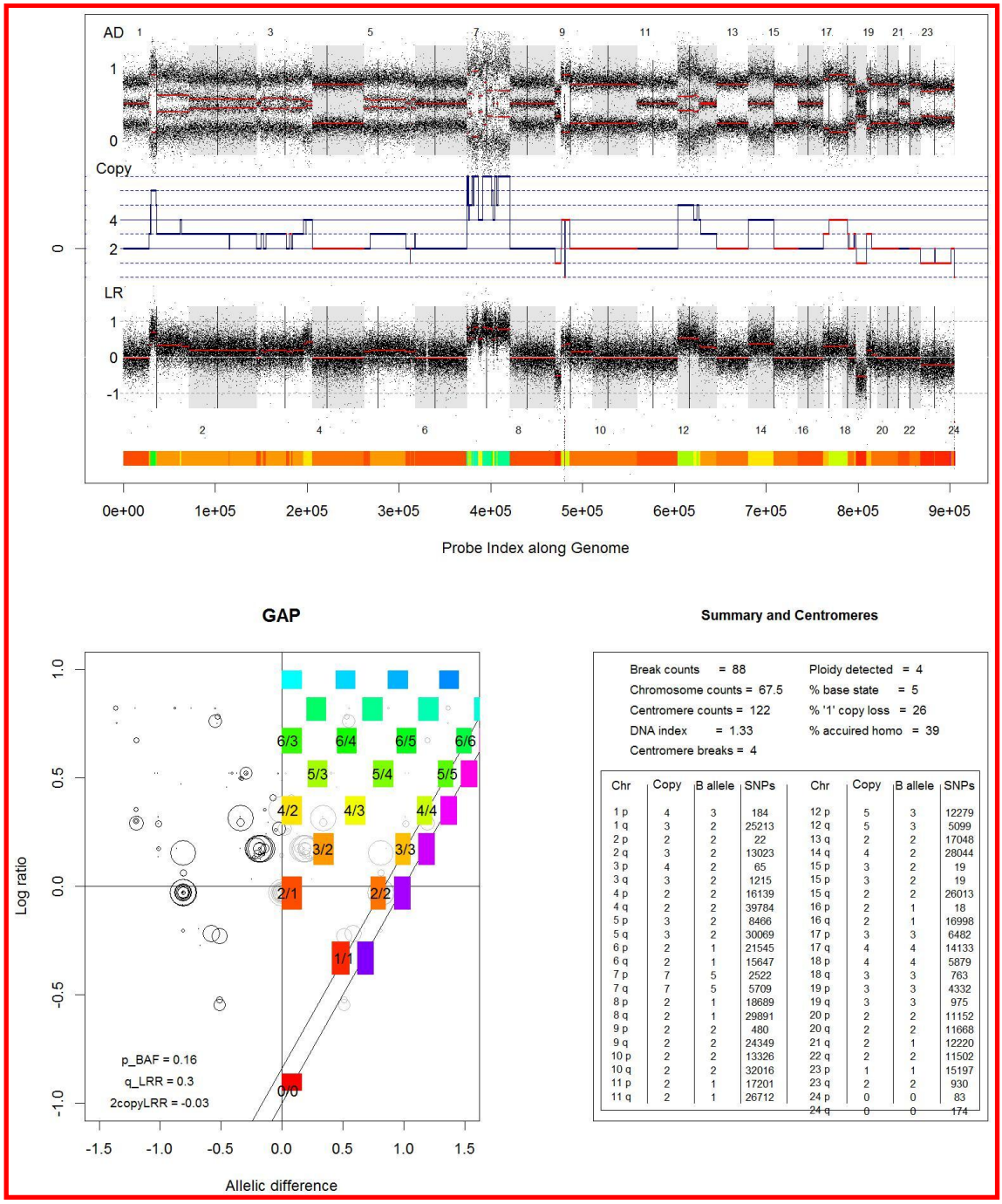
épigénétiques, dans plus de 50 différents types ou sous-types de tumeurs. Ces données sont alors disponibles pour la communauté scientifique à travers le monde et se révèlent d'une importance clinique et sociale, capitale. En particulier dans le cadre des gliomes où la classification du type tumoral et du grade de la tumeur s'avèrent délicats, une meilleure définition du génome de la tumeur pourrait aider à la classification. Chaque type de gliome ayant ses caractéristiques moléculaires propres, cette caractérisation génomique des gliomes pourrait à terme améliorer la prise en charge des patients en leur proposant les traitements les mieux adaptés à leurs besoins.

La caractérisation moléculaire des cellules souches cancéreuses de glioblastomes nous a également conduits à étudier leur stabilité génétique. En effet, notre hypothèse est que les cellules souches cancéreuses sont capables de s'adapter rapidement à de nouvelles conditions de culture de la même manière qu'elles sont capables de résister à des traitements anti-cancéreux de type radiothérapie ou chimiothérapie.

Une étude Multi-FISH (hybridation multi-fluorescente *in situ*) du caryotype des cellules TG1 ayant été réalisée précédemment (Patru et al., 2010), nous avons choisi de compléter l'étude du génome des cellules par puces Affymetrix Genome Wide SNP_6. Ces puces permettent d'étudier l'amplification ou la délétion de plus de 1,8 million de marqueurs génétiques, incluant 906600 SNP (single nucleotide polymorphism) et plus de 946000 sondes pour la détection de CNV (copy number variation). Les techniques de caryotype en multi-FISH et de puce Affymetrix Genome Wide SNP_6 sont complémentaires. En effet, la première technique citée permet de voir les translocations des chromosomes ainsi que les grandes amplifications ou délétions de gènes. La deuxième technique ne permet pas d'observer les translocations, mais les amplifications et délétions de gènes sont plus résolutives. De plus, cette technique de puce Affymetrix permet d'observer des pertes d'hétérozygotie (LOH), c'est-à-dire, dans le cas d'un chromosome présent en deux copies, s'il s'agit d'une disomie uniparentale ou non.

A l'exception de l'extraction d'ADN des cellules aux différents passages et de l'analyse des résultats, cette expérience a été effectuée sur la plate-forme Biopuce et Séquençage de l'IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire, Illkirch-Graffenstaden, France). Pour cette étude, l'ADN des cellules TG1 a été extrait à différents passages cellulaires (passages 8, 13, 22, 38 et 48, le passage 1 correspondant au premier passage effectué dans notre laboratoire, voir chapitre Matériel et Méthodes, paragraphe 6.1.1, page 196).

Les résultats (figure 21) montrent que pour le passage 8, les cellules possèdent environ 67 chromosomes. De nombreuses anomalies sont relevées, surtout au niveau du chromosome 7.



Chr	Copy	B allele	SNPs	Chr	Copy	B allele	SNPs
1 p	4	3	184	12 p	5	3	12279
1 q	3	2	25213	12 q	5	3	5099
2 p	2	2	22	13 q	2	2	17048
2 q	3	2	13023	14 q	4	2	28044
3 p	4	2	65	15 p	3	2	19
3 q	3	2	1215	15 p	3	2	19
4 p	2	2	16139	15 q	2	2	26013
4 q	2	2	39784	16 p	2	1	18
5 p	3	2	8466	16 q	2	1	16998
5 q	3	2	30069	17 p	3	3	6482
6 p	2	1	21545	17 q	4	4	14133
6 q	2	1	15647	18 p	4	4	5879
7 p	7	5	2522	18 q	3	3	763
7 q	7	5	5709	19 p	3	3	4332
8 p	2	1	18689	19 q	3	3	975
8 q	2	1	29891	20 p	2	2	11152
9 p	2	2	480	20 q	2	2	11668
9 q	2	2	24349	21 q	2	1	12220
10 p	2	2	13326	22 q	2	2	11502
10 q	2	2	32016	23 p	1	1	15197
11 p	2	1	17201	23 q	2	2	930
11 q	2	1	26712	24 p	0	0	83
				24 q	0	0	174

Figure 21 : Résultats de l'analyse des SNP des cellules TG1 au passage 8.
Sur le graphique du dessus, les chromosomes sont représentés les uns à la suite des autres. La première ligne représente la discrimination allélique (AD) pour chaque chromosome, avec 0 la valeur appliquée pour l'allèle 1, et 1 la valeur appliquée pour l'allèle 2. Dans ce cas, la valeur 0,5 représente la présence de chacun des deux allèles pour un SNP donné. La deuxième ligne du graphique représente le nombre de copies pour chaque chromosome. La troisième ligne représente l'intensité des signaux, c'est-à-dire le logarithme des ratios des signaux (LR). De cette intensité peut être déduite le nombre de copies pour chaque chromosome. Le graphique GAP (profil d'analyse génotypique), permet de calculer le nombre de copies et d'allèles présents pour chaque chromosome, selon l'intensité des signaux et la fréquence allélique. Le tableau en bas à droite résume les résultats obtenus.

Ces données nous aident à dresser un caryotype des cellules TG1 au passage 8, en tenant compte des différents allèles. Ainsi, la figure 22 récapitule pour chaque chromosome les amplifications, les délétions et les pertes d'hétérozygotie. Par exemple, les chromosomes 4, 10, 13, 15, 20 et 22 sont présents chacun en deux copies, mais il s'agit du même chromosome qui est dupliqué, c'est-à-dire que les deux copies proviennent soit du père, soit de la mère. Nous sommes donc en présence d'une perte d'hétérozygotie.

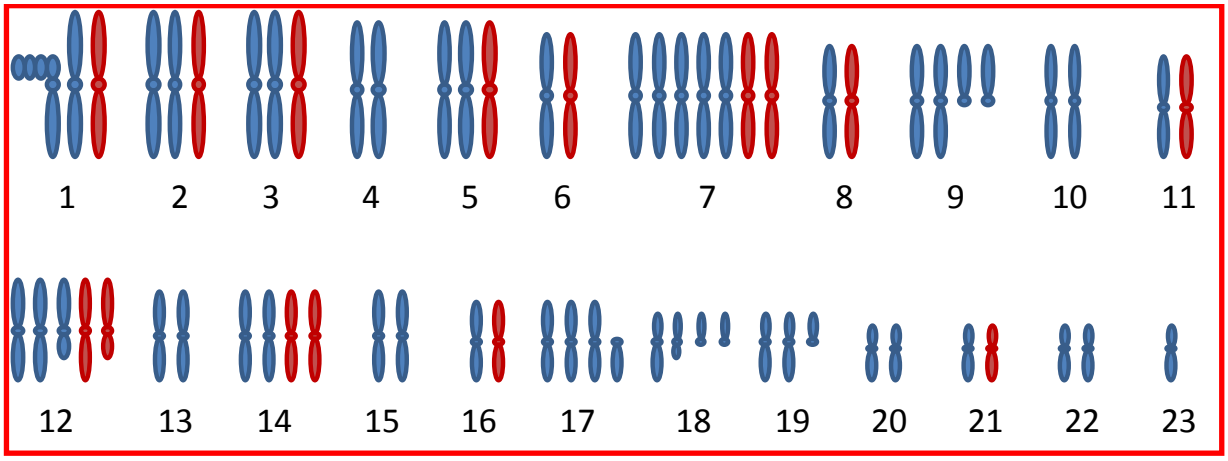


Figure 22 : Caryotype reconstitué d'après les données de la puce Affymetrix pour les cellules TG1 au passage 8.
Les couleurs représentent les différents allèles pour un chromosome donné.

Pour tous les passages la même analyse peut être effectuée et une amplification des chromosomes 1q, 7, 12,14, 17 et 18p et une délétion des chromosomes 9p et 18q sont observées (figure 23). En plus de ces amplifications et délétions de chromosomes, nous observons des variations du nombre de copies pour quelques chromosomes en fonction des passages. Ainsi, en augmentant le nombre de passage des cellules, nous observons une augmentation du nombre de copie des chromosomes 5, 9q et 19. Les chromosomes 2 et 3p et une partie du 3q étaient amplifiés et reviennent à un nombre normal lorsqu'on augmente le nombre de passage des cellules. Cette analyse permet également de révéler la réapparition, aux passages plus élevés, d'allèles qui ne semblaient pas présents aux passages inférieurs. Enfin, l'analyse révèle que ces cellules sont du genre féminin.

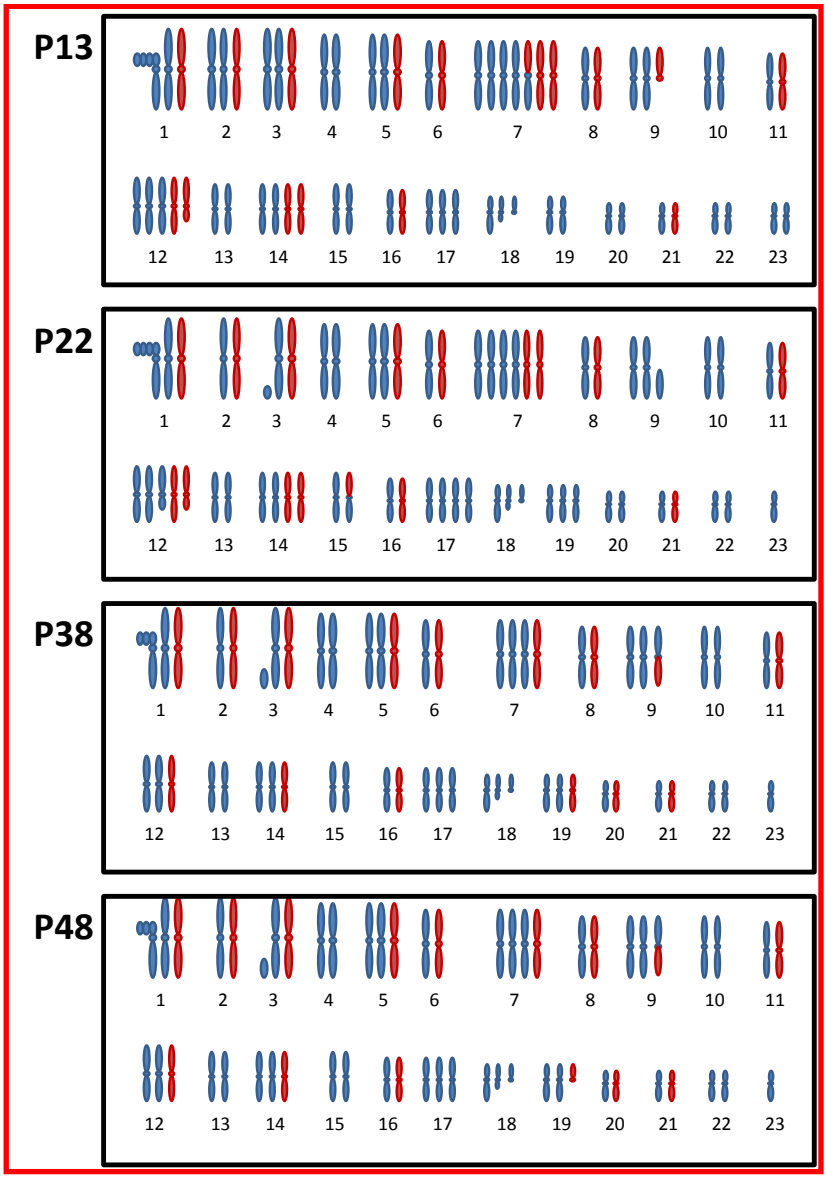


Figure 23 : Caryotype reconstitué d'après les données de la puce Affymetrix pour les cellules TG1 aux passages 13, 22, 38 et 48.
Les couleurs représentent les différents allèles pour un chromosome donné.

Parallèlement à l'étude de la variation génétique des cellules TG1 au cours de la culture cellulaire, nous avons étudié la variation génétique des cellules f-NSC dans le but de vérifier leur stabilité lors des passages cellulaires. Ces cellules ont été isolées et sont étudiées par l'équipe du Dr. M.-P. Junier à Paris. Les f-NSC sont parfaitement diploïdes et aucune anomalie du caryotype n'a été relevée lors de leur étude (Thirant et al., 2011). L'expérience a été réalisée à l'aide des mêmes puces Affymetrix (plate-forme Biopuce et Séquençage, IGBMC, Illkirch, France) sur des cellules aux passages 10, 20 et 30.

Notre étude de la variabilité génétique des f-NSC ne montre pas de grandes anomalies génétiques (figure 24). De plus, le génome de ces cellules de varie pas lors des

passages. Les f-NSC sont donc très stables comparées aux cellules TG1. L'analyse confirme aussi le genre féminin des cellules.

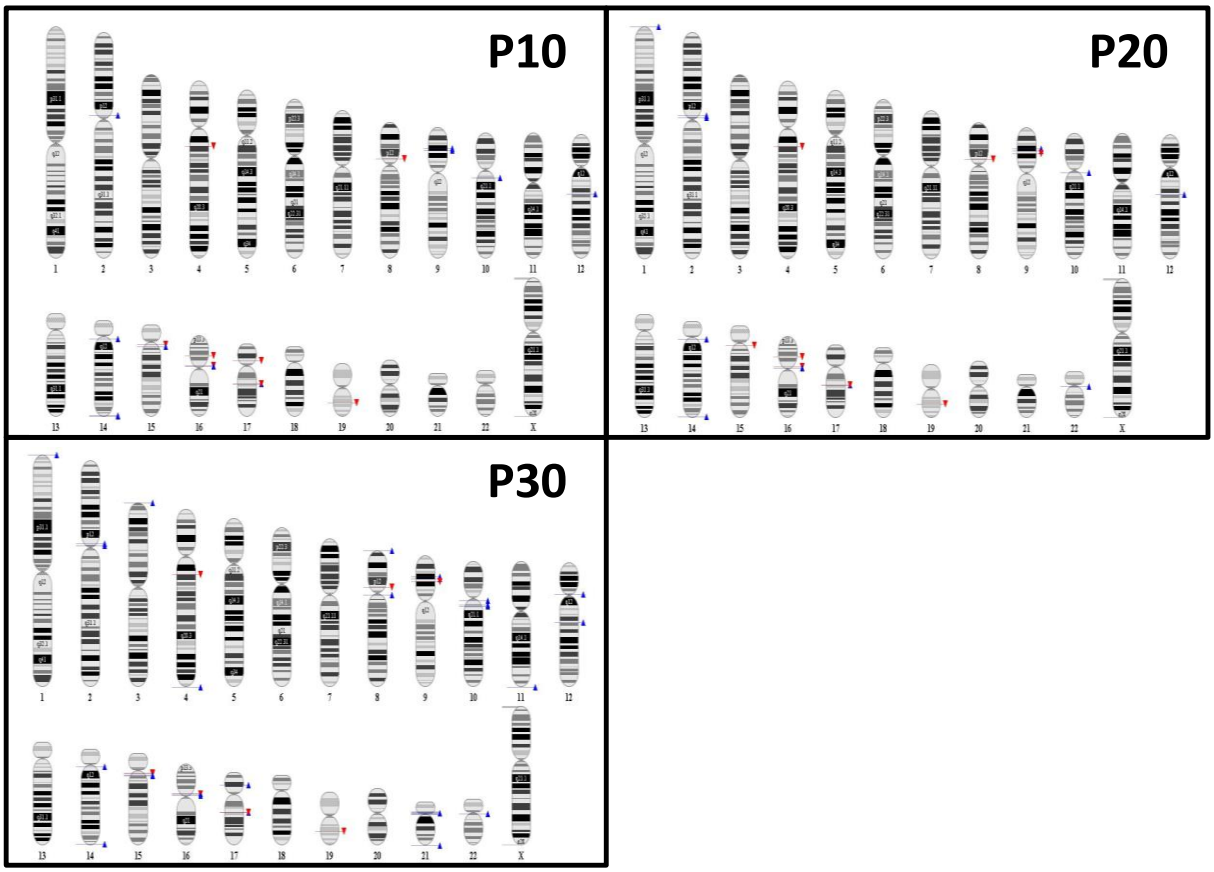


Figure 24 : Etude de la variation des SNP dans les cellules f-NSC en fonction du nombre de passage.
Les morceaux de chromosomes en bleu représentent les amplifications de fragments de chromosome et les morceaux en rouge, les délétions. Le suivi des modifications a été effectué pour les passages 10, 20 et 30 (respectivement notés P10, P20 et P30 sur la figure).

Suite à la caractérisation morphologique et génotypique des cellules souches cancéreuses et des cellules f-NSC et pour confirmer le caractère souche de ces cellules, ainsi que leur origine neurale, nous avons entrepris une étude de l'expression de marqueurs connus pour être impliqués dans le caractère souche des cellules et de marqueurs connus pour être exprimés dans les cellules de la lignée neurale.

2.1.2.2. Etude de la transcription de gènes impliqués dans le caractère souche des cellules ou dans la différenciation de la lignée neurale

Pour réaliser cette étude, les ARN totaux des cellules TG1, OB1, NSC, HA et U-87 MG ont été extraits. Une rétro-transcription des ARN en ADN complémentaires a permis de réaliser des PCR quantitatives avec la technologie TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array Card d'Applied Biosystems. Ces puces permettent l'analyse de la transcription de 7 gènes exprimés dans des cellules non différenciées, 33 gènes corrélés avec le caractère souches des cellules, 50 gènes impliqués dans différentes voies de différenciation des cellules, et 6 gènes de contrôle (voir liste en annexe I). Les gènes présents sur la carte ont été choisis par Applied Biosystem d'après le consortium ISCI (*International Stem Cell Initiative*) (Adewumi et al., 2007). L'étude de l'ISCI portait sur l'analyse de 59 lignées cellulaires dérivées de cellules souches embryonnaires humaines (cellules hES) pour l'expression de 17 antigènes de surface et de 93 gènes. Les gènes étudiés jouent donc principalement un rôle dans le développement embryonnaire et dans la différenciation des tissus de l'embryon.

Les cellules TG1, U-87 MG, OB1 et HA ont été testées chacune 4 fois, les cellules NSC ont été testées 8 fois. Une étude de corrélation de l'expression des gènes testés grâce aux TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array Card d'Applied Biosystems a été réalisée grâce au logiciel Excel pour chaque type cellulaire (tableau 4). Cette étude montre une très bonne corrélation entre les cellules TG1 et les cellules OB1. Ces deux types de CSC ont donc une expression quasiment similaire des gènes présents sur la carte. La corrélation est plutôt bonne en ce qui concerne les CSC et les f-NSC. Certains gènes ne sont donc pas exprimés de la même manière entre les cellules f-NSC et les CSC. Les cellules U-87 MG ont une corrélation moyenne avec les cellules à caractère souche (f-NSC et CSC) mais une bonne corrélation avec les cellules HA, le profil d'expression des gènes testés pour les cellules U-87 MG est donc plus proche de celui des cellules HA que de celui des CSC et f-NSC. Les cellules HA ont une mauvaise corrélation avec les CSC et les f-NSC, ce qui montre que le profil d'expression des gènes testés est très différent pour ces types de cellules.

HA	0,72	0,69	0,74	0,88	1,00
U-87 MG	0,78	0,82	0,86	1,00	0,88
TG1	0,84	0,96	1,00	0,86	0,74
OB1	0,80	1,00	0,96	0,82	0,69
f-NSC	1,00	0,80	0,84	0,78	0,72
	f-NSC	**OB1**	**TG1**	**U87-MG**	**HA**

Tableau 4 : Etude de la corrélation de l'expression des gènes marqueurs des cellules souches pour les différentes lignées testées.
L'étude de l'expression des gènes a été réalisée par RT-PCR en temps réel pour les cellules souches cancéreuses TG1 et OB1, les cellules souches neurales fœtales (f-NSC), la lignée cellulaire de glioblastome (U-87 MG) et les astrocytes humains (HA). L'étude de corrélation a été réalisée grâce au logiciel Excel. Les chiffres représentent la corrélation, 1 étant une corrélation parfaite. Les données en rouges sont les mieux corrélées, le dégradé allant jusqu'au blanc qui représente la moins bonne corrélation.

Une analyse plus détaillée des gènes spécifiquement exprimés dans les 5 types cellulaires (TG1, OB1, f-NSC, U-87 MG et les astrocytes humains) a été réalisée. L'analyse des résultats nécessite de connaitre le meilleur gène de ménage/gène rapporteur à utiliser parmi ceux présents sur la carte. Il est défini comme étant celui qui est le plus stable dans tous les types cellulaires testés. Une étude récente propose d'utiliser RPLP0 en combinaison avec H3F pour l'analyse de données d'expression de gènes dans les astrocytomes (Gresner et al., 2011), les auteurs de cette étude recommandent l'utilisation de la GAPDH si la normalisation est faite sur un seul gène. Dans tous les cas, cette étude préconise de faire sa propre analyse de stabilité afin de déterminer le meilleur gène rapporteur.

Nous avons donc étudié la variabilité de chacun des 6 gènes contrôles proposés sur les cartes par un graphique dit « boîte à moustache » (figure 25). Ce graphique montre la distribution des Ct (cycles seuils) pour les différentes études, tout type cellulaire confondu. Les boîtes à moustaches ont été réalisées avec l'ensemble des données et tiennent compte de la variation pour chaque type cellulaire testé. Le gène ayant la boîte à moustache la moins étendue est celui qui a les Ct qui varient le moins selon le type cellulaire étudie. Ainsi, nous remarquons que les gènes 18s (ARN ribosomique 18s) et ACTB (actine β) sont les gènes qui varient le moins selon le type cellulaire étudié. Cependant, seul le 18s, qui présente le plus petit écart-type a été utilisé comme gène rapporteur pour cette analyse.

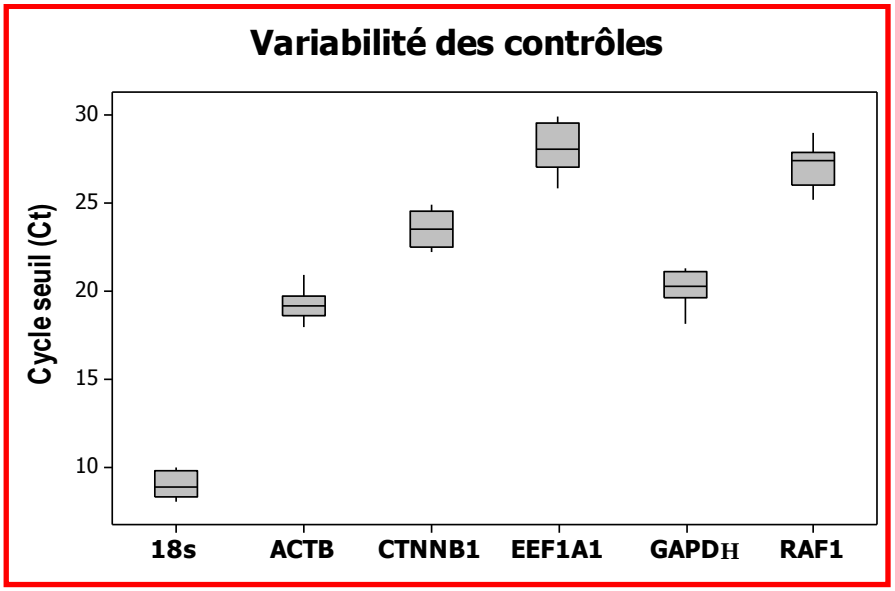


Figure 25 : Détermination du meilleur gène rapporteur pour l'analyse des la transcription de gènes marqueurs des cellules souches par un graphique de boîte à moustaches.
Ce graphique représente la variation des gènes rapporteurs présents sur les TaqMan® Array Card d'Applied Biosystems™. La série statistique pour chaque gène est donnée par la valeur des cycles seuils (Ct) pour les réplicas de chaque type cellulaire testé pour l'ensemble des données de transcriptome des gènes marqueurs de cellules souches réalisés pour cette étude. Chaque gène est représenté par une boîte à moustaches. Les limites supérieures et inférieures du rectangle correspondent aux premier (Q1) et troisième (Q3) quartiles, et la barre centrale à la médiane (deuxième quartile). La longueur des moustaches correspond, vers le bas à la valeur adjacente à la valeur frontière qui est égale à Q1 diminué de 1,5 fois la valeur interquartile (Q3-Q1), et vers le haut, à la valeur adjacente supérieure qui est égale à Q3 augmenté de 1,5 fois la valeur interquartile. Ici, les gènes dont l'expression est la moins variable sont 18s (ARN ribosomique 18s) et ACTB (actine β). Les données présentées correspondent à 24 échantillons dont 8 fois les f-NSC et 4 fois les TG1, OB1, HA et U-87MG. Abréviations : CTNNB1, caténine β1 (protéine associée à la cadhérine) ; EEF1A1, facteur d'élongation α1 de la traduction eucaryote ; GAPDH, glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase ; RAF1, homologue 1 de l'oncogène viral de la leucémie murine v-raf-1.

Les résultats, normalisés par rapport au contrôle 18s, sont exprimés relativement à la limite de détection fixée pour notre expérience qui est de 35 Ct (Ct : cycle seuil) pour cette analyse. Cette limite a été déterminée en fonction du bruit de fond constaté pour nos données. Au-delà de ce seuil (Ct>35), la fluctuation sur la mesure d'expression des gènes est plus importante et les résultats deviennent hasardeux. Cette limite de 35 Ct correspond à la limite généralement utilisée dans les analyses d'expression des gènes par RT-PCR.

L'expression des gènes est donc calculée selon la formule :

$$Expression\ Relative = 2^{(35-\Delta Ct)}$$

où ΔCt représente la normalisation des cycles seuils pour chaque RCPG, par rapport au contrôle RPLP0.
et 35 est la valeur de détection limite fixée dans le cadre de notre étude.

L'étude plus détaillée des gènes spécifiquement exprimés dans les cellules souches montre que les gènes NANOG, TERT (télomérase) et POU5F1 sont très peu exprimés dans les cellules étudiées (figure 26). NANOG est exprimé de 2 à 5 fois au dessus de la valeur seuil, dans toutes les cellules étudiées, y compris la lignée cellulaire de glioblastome U-87 MG et les astrocytes humains qui ne sont pas des cellules souches. TERT n'est pas exprimé dans les cellules f-NSC ni dans les astrocytes humains (expression relative inférieure à 1, c'est-à-dire que l'expression est inférieure à la limite fixée qui correspond à Ct=35), mais TERT a une expression relative de 2,4 à 7 dans les CSC TG1 et OB1, et dans la lignée cellulaire de glioblastome. POU5F1 a une expression relative de 14 à 26 dans les f-NSC, les CSC TG1 et OB1 et la lignée U-87 MG. L'expression relative de POU5F1 est sensiblement inférieure dans les astrocytes humains. SOX2 est très peu exprimé dans la lignée U-87 MG (expression relative de 1,1±0,1). Ce gène est plus exprimé dans les astrocytes humains (expression relative de 63±9) et encore plus dans les f-NSC (expression relative de 490±120) et dans les CSC TG1 et OB1 (expressions relatives respectives de 160±50 et 8400±800).

Trois autres gènes marquant spécifiquement le caractère souche des cellules semblent d'un intérêt particulier car ils semblent plus exprimés dans les CSC TG1 et OB1 par rapport aux autres cellules testées. Ainsi, GBX2 (protéine homéobox 2 spécifique de la gastrulation et du cerveau), SEMA3A (sémaphorine 3A) et PODXL (*podocalyxin-like*) présentent ces caractéristiques. GBX2 n'est pas exprimé dans les astrocytes humains ni dans la lignée cellulaire de glioblastomes U-87 MG (expressions relatives inférieures à 1).Il est peu exprimé dans les f-NSC (expression relative de 7±2) et il est au moins 2 fois plus exprimé dans les CSC TG1 et OB1 que dans les f-NSC (expressions relatives respectives de 14±2 et 18±3). SEMA3A a une expression relative de 40±10 dans les astrocytes humains, de 81±8 dans la lignée U-87 MG et de 330±20 dans les f-NSC. Il est au moins 5 fois plus exprimé dans les CSC TG1 et OB1 que dans les autres cellules avec des expressions relatives respectives de 1760±120 et 4300±200. Il en est de même pour PODXL qui a des expressions relatives respectives de 60±2 ; 102±8 et 58±6 pour les astrocytes humains, la

lignée U-87 MG et les f-NSC, et qui est plus de 100 fois plus importante pour les CSC TG1 et OB1 avec des expressions relatives respectives de 11500±500 et 18500±500.

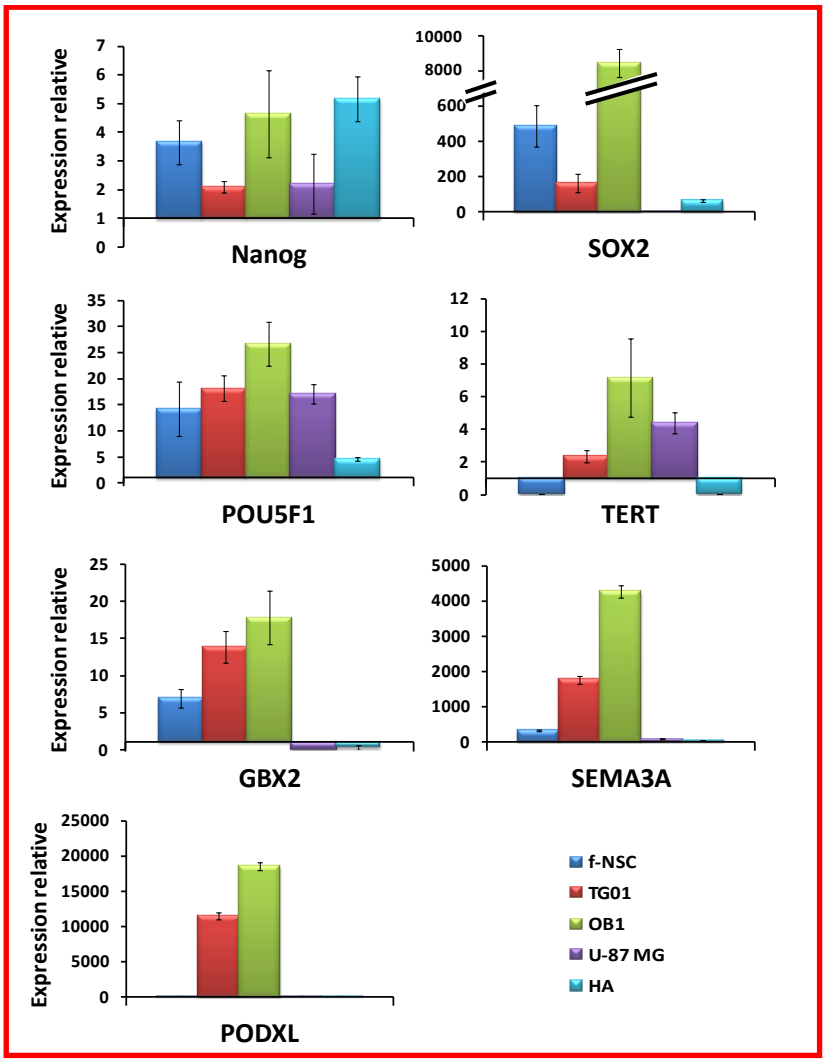


Figure 26 : Expression de gènes connus pour jouer un rôle dans le caractère souche des cellules.

L'expression des gènes a été évaluée par RT-PCR quantitative, grâce à des cartes TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array Card d'Applied Biosystems. Les données représentent les différences d'expression des gènes pour chaque type de cellules testées, normalisées par rapport au gène rapporteur 18s et par rapport au seuil de détection fixé (Ct=35) selon la formule : expression = $2^{(35-dCt)}$ où dCt représente le cycle seuil d'un gène donné normalisé par rapport au Ct du 18s. Abréviations : f-NSC, cellules souches neurales fœtales humaines ; TG1, cellules souches cancéreuses issues d'une tumeur glioneuronale maligne ; OB1, cellules souches cancéreuses issues d'une tumeur gigantocellulaire ; U-87 MG, lignée cellulaire issue d'un glioblastome humain ; HA, astrocytes humains ; SOX2, (sex determining region Y)-box 2 ; POU5F1, POU domain, class 5, transcription factor 1 ; TERT, télomérase ; GBX2, Gastrulation Brain Homeobox 2 ; SEMA3A, semaphorine 3A ; PODXL, Podocalyxin-like protein 1.

D'autres gènes présents sur les cartes sont plus spécifiques de cellules différenciées ou engagées dans un lignage cellulaire. Pour cette étude, nous nous sommes intéressés aux gènes spécifiquement exprimés dans les cellules de la lignée neurale et plus particulièrement à l'expression de NES (nestine), OLIG2 (facteur de transcription de type 2 des oligodendrocytes), GFAP (*glial fibrillary acid protein*) et PAX6 (*paired box gene 6*) (figure 27).

NES code une protéine des filaments intermédiaires exprimée majoritairement dans les cellules de la lignée neurale lors du développement des systèmes nerveux central et périphérique (Wiese et al., 2004). L'ARN messager de NES est mesuré dans les 5 types cellulaires testés. Son expression relative est de 117±2 et de 109±8 dans les astrocytes humains et la lignée cellulaire de glioblastome U-87 MG respectivement. Cependant, la nestine est de 40 à 80 fois plus exprimée dans les CSC TG1 et OB1 et dans les f-NSC par rapport aux deux types cellulaires précédents (expressions relatives respectives de 4550±120, 7900±300 et 7000±800).

GFAP qui code également une protéine des filaments intermédiaires est exprimé principalement dans les astrocytes (Eng et al., 1971; Rutka et al., 1997). Notre analyse révèle que GFAP est peu exprimé dans la lignée cellulaire de glioblastome U-87 MG et dans les cellules OB1 et f-NSC (expressions relatives respectives de 1,5±0,3 ; 9±2 et 6±2). Cette protéine est beaucoup plus exprimée dans les astrocytes humains et dans les CSC TG1 (expressions relatives respectives de 400±50 et de 394±8).

OLIG2 code le facteur de transcription de type 2 de la lignée des oligodendrocytes et est également exprimé dans certains types de gliomes (Lu et al., 2001). Notre étude montre qu'il est très exprimé dans les CSC TG1 et OB1 (expressions relatives respectives de 1810±60 et de 1300±60) ainsi que dans les f-NSC (expression relative de 880±110). Il a une expression relative de 53±9 dans la lignée U-87 MG et n'est pas exprimé dans les astrocytes humains (expression relative inférieure à 1).

PAX6 (*paired box gene 6*) joue un rôle important en association avec SOX2, dans la gliogenèse (Gomez-Lopez et al., 2011). Notre analyse révèle que ce gène est exprimé dans les f-NSC et dans les astrocytes humains (expressions relatives respectives de 1050±90 et de 480±20). Il l'est un peu moins dans la lignée cellulaire U-87 MG puisque son expression relative est de 114±6. Ce gène est encore moins exprimé dans les CSC TG1 et OB1 avec des expressions relatives respectives de 45±6 et inférieure à 1.

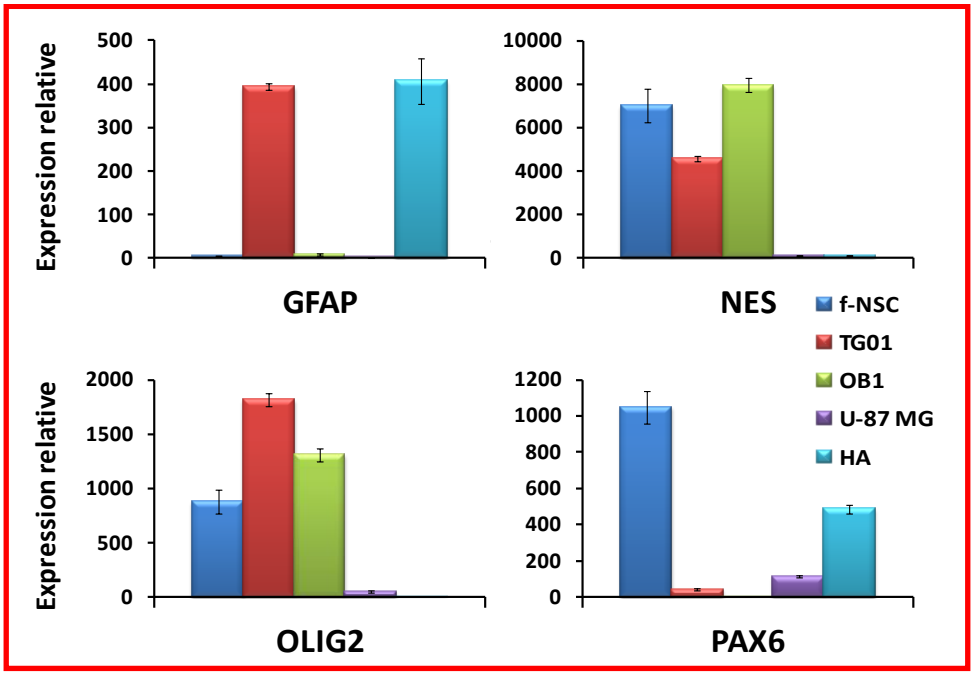


Figure 27 : Expression de gènes connus pour jouer un rôle dans la différenciation des cellules de la lignée neurale.
L'expression des gènes a été évaluée par RT-PCR quantitative grâce à des cartes TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array Card d'Applied Biosystems. Les données représentent les différences d'expression des gènes pour chaque type de cellules testées, normalisées par rapport au gène rapporteur 18s et par rapport au seuil de détection fixé (Ct=35) selon la formule : expression = $2^{(35-dCt)}$ où dCt représente le cycle seuil d'un gène donné normalisé par rapport au Ct du 18s. Abréviations : f-NSC, cellules souches neurales fœtales humaines ; TG1, cellules souches cancéreuses issues d'une tumeur glioneuronale maligne ; OB1, cellules souches cancéreuses issues d'une tumeur gigantocellulaire ; U-87 MG, lignée cellulaire issue d'un glioblastome ; HA, astrocytes humains ; GFAP, Glial fibrillary acid protein ; NES, nestine ; OLIG2, facteur de transcription de type 2 des oligodendrocytes ; PAX6, paired-box gene 6.

2.2. Discussion sur la caractérisation des CSC

Les cellules étudiées lors de ma thèse sont des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes. Ces cellules ont été isolées et caractérisées en partie par l'équipe du Dr Chneiweiss (UMR-S 894 INSERM, Université Paris Descartes). La caractérisation de ces cellules, d'un point de vue morphologique et moléculaire, est essentielle à la compréhension de leur physiopathologie, mais aussi pour la fiabilité et l'interprétation des résultats obtenus avec ces cellules. Cette étude vise donc à compléter la caractérisation existante des cellules souches cancéreuses TG1 et OB1 dans le but de mieux connaitre ces cellules et de travailler sur un modèle le plus précis possible.

2.2.1. Formation des neurosphères

Les cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes sont des cellules qui, en culture, forment des neurosphères en suspension. La clonogénicité des cellules TG1, notre principal modèle d'étude, a été démontrée par l'équipe du Dr Chneiweiss (Patru et al., 2010). Cette équipe a montré que les cellules TG1 ont des propriétés clonales, c'est-à-dire qu'une seule cellule est capable de proliférer pour former une neurosphère dite secondaire. L'étude réalisée montre également que la formation de neurosphères secondaires est améliorée lorsque le nombre de cellules initiales est de 200 cellules par puits (Patru et al., 2010). Nos résultats (figure 18) montrent que les cellules TG1 sont capables de former des neurosphères par un phénomène d'agrégation dans les quelques heures qui suivent la dissociation cellulaire. Six heures après la mise en culture des cellules, la plupart de ces cellules forment déjà de petites neurosphères. Ces petites neurosphères se rapprochent entre elles et forment des neurosphères de plus en plus grosses. L'observation d'un prolongement cytoplasmique pour la formation des neurosphères de plus en plus grosses montre que ce phénomène d'agrégation ou d'accrétion des neurosphères est un phénomène actif. Il est probable que le mouvement brownien des cellules joue aussi un rôle important dans la formation des neurosphères. Une étude réalisée sur des cellules souches neurales confirme la formation de neurosphères par agrégation et révèle aussi l'existence de cils motiles à la surface des cellules souches neurales leur permettant de se déplacer pour aller à la rencontre des autres cellules (Singec et al., 2006). Au niveau de la densité cellulaire, définie par la surface occupée par les cellules sur la surface totale dans un champ observé, la formation de neurosphères se traduit par une diminution de la confluence cellulaire dans les quelques heures suivant la dissociation et la mise en culture des cellules (figure 19). En effet, les neurosphères étant des structures tridimensionnelles, la surface bidimensionnelle globale occupée par les cellules diminue lors de la formation des neurosphères. Ce phénomène est accentué lorsque le nombre de cellules initiales est augmenté pour une même surface (figure 20). Ces résultats tendent à montrer que le rapprochement cellulaire est une étape clé dans le processus de formation des neurosphères par agrégation.

Une autre observation de ces résultats est la ré-augmentation de la densité cellulaire 90h après la mise en culture. Cette augmentation va de 30% de confluence pour se stabiliser à 70%, 140h après la mise en culture des cellules (figure 19). En comparant avec le suivi photographique (figure 18), on peut noter que l'augmentation de la densité cellulaire va de pair avec le fait que les neurosphères commencent à s'éparpiller et se désagréger (figure 18 photographie à 168h). L'hypothèse que les cellules se multiplient peut être formulée, mais il est plus probable qu'après 90h de mise en culture, les cellules, dont le milieu n'a pas été

renouvelé pendant toute la durée de l'expérience, commencent à manquer de nutriments et entrent en apoptose. En culture de routine, le milieu des cellules TG1 est renouvelé et les cellules sont divisées tous les 3 à 4 jours. Le taux de mortalité de ces cellules oscille autour de 10 à 15% à chaque passage et leur temps de génération (temps de doublement de la population cellulaire) est d'environ 3 jours (72 heures). Les cellules qui se sont multipliées pendant les 90h d'observation se trouvent donc probablement dans les neurosphères et ne font pas nettement augmenter la densité cellulaire mesurée par l'IncuCyte™. L'observation de la désagrégation des neurosphères et de l'augmentation de la densité cellulaire après 90h de mise en culture, serait donc plutôt le résultat de la formation de débris cellulaires dus à la mort des cellules.

Bien que ces observations n'aient été effectuées que sur les cellules souches cancéreuses TG1, nous pouvons présumer que les mêmes caractéristiques pourront être retrouvées pour les autres cellules souches cancéreuses en culture (OB1 et TG16) ainsi que pour les cellules souches neurales fœtales normales (f-NSC) lors des mêmes expériences.

2.2.2. Caractérisation moléculaire

Afin de définir au mieux les cellules souches cancéreuses, les caractéristiques des cellules souches cancéreuses ont été étudiées d'un point de vue moléculaire. Ainsi, une caractérisation du génome et une caractérisation du transcriptome des gènes impliqués dans le caractère souche des cellules ou dans la différenciation des cellules dans un certain lignage cellulaire, ont été entreprises.

2.2.2.1. Caractérisation génétique des cellules TG1

Préalablement à notre étude, l'équipe du Dr Chneiweiss avait caractérisé les cellules TG1 d'un point de vue génétique, en réalisant un caryotype de ces cellules (Patru et al., 2010). Les résultats de leur caryotype en Multi-FISH (*multiple fluorescence in situ hybridization*) montrent un gain des chromosomes 1q, 5, 7, 9q et 14 et des pertes des chromosomes 9p et 18q (figure 28).

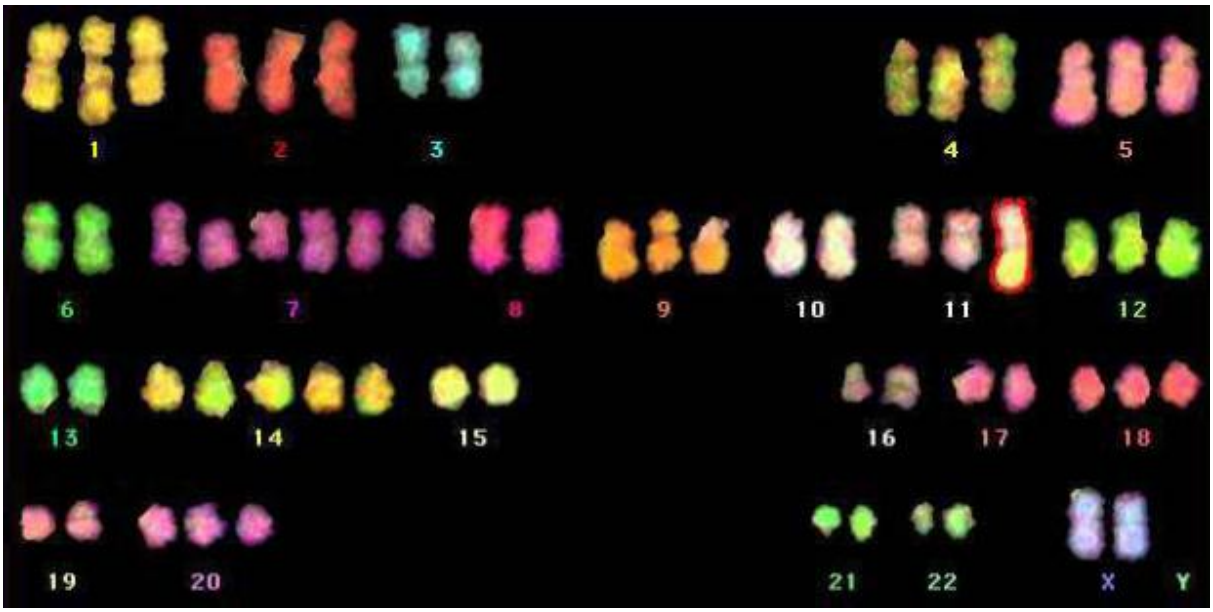


Figure 28 : Carytotype des cellules TG1 par Multi-FISH.
Le caryotype révèle une hypotriploïdie avec une sur-représentation des chromosomes 7 et 14. Patru et al.*, BMC Cancer,2010.*

Pour affiner ces résultats, nous avons réalisé une analyse des SNP (*single nucleotide polymorphism*) à l'aide d'une puce Affymetrix Genome Wide SNP_6. Cette technique permet d'étudier les amplifications et les délétions de portions de chromosomes de façon plus résolue et de déterminer les disomies uniparentales et donc les pertes d'hétérozygotie. L'analyse des résultats qui révèle une origine uniparentale des chromosomes 4, 9, 10, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 22 et 23 implique d'importantes modifications génétiques (figure 22). Ainsi, malgré l'origine uniparentale des chromosomes 4, 10, 13, 15, 20, 22 et 23, ceux-ci ne sont présents qu'en deux exemplaires. Ces chromosomes uniparentaux peuvent provenir d'une mitose abortive résultant en une cellule à 4n chromosomes, puis une perte progressive de chromosomes. Les cellules TG1 sont probablement hypo tétraploïdes.

Le suivi de l'évolution du génome des cellules TG1 au cours de leur culture a été réalisé sur une population cellulaire (extraction de l'ADN de plusieurs cellules) à différents passages. L'analyse des résultats des cellules TG1 au passage 8 montre des amplifications et des délétions chromosomiques précédemment décrites pour des cellules issues de gliomes. On retrouve ainsi une amplification du chromosome 2 (Kim et al., 2009), du chromosome 3 (Yamada et al., 1994), du chromosome 12 (Fischer et al., 1994; Kim et al., 2009), du chromosome 17 (van Dartel et al., 2003), du chromosome 18p (Weber et al., 1996), et du chromosome 19 (Kim et al., 2009) ainsi qu'une délétion du chromosome X (Yamada et al., 1994). Cependant, les anomalies les plus fréquemment décrites dans des cellules de glioblastomes sont l'amplification du chromosome 7 et la délétion du

chromosome 10q (Nobusawa et al., 2010). Le chromosome 7 est notamment connu pour porter le gène EGFR (récepteur du facteur de croissance de l'épiderme). Ce gène joue un rôle important dans la croissance des gliomes et il est fréquemment amplifié dans ces tumeurs cérébrales. Il fait l'objet de nombreuses études visant à empêcher son activation et inhiber ainsi la croissance tumorale. Des molécules inhibant son activité telles que l'erlotinib sont utilisées dans des essais cliniques actuels dans le but de traiter les gliomes (Raizer et al., 2011). Le chromosome 10q quant à lui est connu pour porter le gène PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), un gène suppresseur de tumeur. Il est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en apoptose en cas d'anomalie lors de la mitose (Chu and Tarnawski, 2004). L'amplification du chromosome 7 est retrouvée dans notre analyse. L'étude du caryotype des cellules TG1 par l'équipe du Dr Chneiweiss révèle que ce chromosome est présent au nombre de 6 dans ces cellules. Cependant, la délétion du chromosome 10q n'est pas retrouvée dans notre analyse quel que soit le passage des cellules TG1, et un test d'activité de la protéine Pten montre que les cellules TG1 possèdent une protéine Pten fonctionnelle (Galan-Moya et al., 2011).

L'analyse de la variation du génome au cours de la culture des cellules TG1 révèle d'importantes variations génétiques lors des différents passages (figure 23). Une augmentation du nombre de copies des chromosomes 5, 9q et 19 peut être observée, et les chromosomes 2 et 3p et une partie du 3q qui étaient initialement amplifiés, reviennent à un nombre normal (deux copies) au cours de la culture de ces cellules. Ces variations peuvent s'expliquer par le fait que la technique utilisée prend en compte une population de cellules. Il est probable que la culture de cellules souches cancéreuses TG1 soit représentée par différents clones cellulaires. Ces clones ne disposeraient pas tous des mêmes modifications génomiques et pourraient être différentiellement sélectionnés au cours des passages cellulaires, expliquant la « réappartion » d'un allèle qui ne semblait pas présent dans les cellules à plus faible passage. Par comparaison, la même étude réalisée sur 3 passages différents de cellules souches neurales normales fœtales (f-NSC) montre à la fois que les cellules f-NSC sont diploïdes et qu'elles ne présentent pas de modifications génétiques majeures (figure 24). D'autre part, l'étude indique une grande stabilité des cellules f-NSC sur les 3 passages testés.

Ces données sur l'instabilité génétique des cellules TG1 en culture nous indiquent d'être prudents lors de la réalisation de nos expériences. Afin d'éviter au maximum les biais des résultats dus aux bouleversements génétiques observés, les cellules utilisées pour les expériences doivent être le plus possible dans un passage similaire. Ainsi, nous nous sommes fixé de ne tester des cellules qu'entre les passages 20 et 30, espérant ainsi obtenir la meilleure reproductibilité possible pour nos tests. Cette étude qui montre la grande

plasticité génétique des cellules souches cancéreuses (liée à une apparente stabilité au niveau du protéome (Patru et al., 2010)) est fascinante et devrait être développée et poursuivie à l'avenir.

2.2.2.2. Expression de marqueurs de l'état souche et de la lignée neurale dans les cellules étudiées

L'expression des gènes a été testée à l'aide des cartes TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array Card d'Applied Biosystems qui permettent l'étude de l'expression de 7 gènes exprimés dans des cellules non différenciées, 33 gènes corrélés avec le caractère souches des cellules, 50 gènes impliqués dans différentes voies de différenciation des cellules, et 6 gènes de référence. L'étude de l'expression de ces gènes dans les CSC TG1 et OB1, les f-NSC, la lignée cellulaire de glioblastome U-87 MG et les astrocytes humains permettent de réaliser une étude de corrélation entre ces différents types cellulaires (tableau 4). L'étude de corrélation montre que les cellules TG1 et OB1, les deux types de cellules souches cancéreuses testées, ont une expression similaire des gènes présents sur la carte. Ensuite, les cellules de la lignée U-87 MG puis les f-NSC sont les cellules qui expriment les gènes testés de la manière la plus proche de celle des CSC. Les astrocytes humains expriment les gènes testés en étant plus proche des cellules de la lignée U-87 MG que des autres types cellulaires testés. Les cellules souches cancéreuses sont les cellules qui expriment à la fois des marqueurs de cellules souches et des marqueurs de cellules différenciées à cause de l'hétérogénéité des populations cellulaires de CSC. Les cellules de la lignée U-87MG, qui sont des cellules cancéreuses plus différenciées que les CSC et les astrocytes humains, des cellules complètement différenciées, expriment peu de gènes caractéristiques des cellules souches. Les cellules f-NSC expriment quant à elles peu de marqueurs de cellules différenciées, si ce n'est les gènes impliquant leur engagement dans la lignée neurale. Considérant ceci, il n'est pas surprenant de trouver les CSC à la charnière entre les f-NSC d'une part et les cellules de la lignée U-87 MG et les astrocytes humains d'autre part, au regard de l'expression des gènes des cartes TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array Card d'Applied Biosystems. Une regroupement similaire des types cellulaires a été retrouvé en réalisant un clustering hiérarchique basé sur l'expression des gènes codant les RCPG (voir chapitre 3 paragraphe 3.2.1)

En étudiant plus en détail l'expression des gènes clés pour les propriétés souches des cellules et notamment l'expression de Nanog, SOX2 et POU5F1, les trois gènes identifiés comme les gènes principaux intervenant dans le maintien de la pluripotence des cellules (Sharov et al., 2008), on note que Nanog est faiblement exprimé dans toutes les

cellules testées, y compris dans les astrocytes humains qui sont des cellules différenciées. POU5F1 est un peu plus exprimé que Nanog dans les cellules et semble moins exprimé dans les astrocytes humains que dans les autres cellules testées. Son expression apparait être liée au caractère souche et/ou cancéreux des cellules. Le gène SOX2 est, des trois gènes, le plus exprimé dans les cellules à caractère souche, f-NSC et CSC, bien que l'amplitude de son expression varie de manière importante entre les deux types de CSC. Il est détecté au niveau protéique dans les f-NSC grâce à une analyse d'immunocytochimie (Thirant et al., 2011) et dans les cellules TG1 et OB1 par une analyse d'immunofluorescence (Galan-Moya et al., 2011). Il est peu exprimé dans les cellules différenciées, astrocytes humains et cellules de la lignée U-87 MG.

D'autres gènes sont exprimés dans les cellules souches à différentes étapes du développement. Ainsi, TERT, qui code la télomérase, ne semble pas exprimé dans les cellules f-NSC, et n'est que faiblement exprimé dans les cellules souches cancéreuses TG1 OB1 et dans la lignée cellulaire de glioblastome U-87 MG. Cependant, l'expression semble suffisante pour retrouver une activité télomérasique dans les cultures cellulaires TG1 et OB1 (Silvestre et al., 2011). GBX2 (protéine homéobox 2 spécifique de la gastrulation et du cerveau) bien que faiblement exprimé, ne l'est que dans TG1, OB1 et NSC. Ce gène est connu pour jouer un rôle dans la position du rhombencéphale lors du développement cérébral. Il est exprimé par certaines cellules de la plaque neurale (des cellules souches neurales) durant l'embryogenèse (Sunmonu et al., 2011). SEMA3A est très exprimé dans TG1 et OB1 et un peu moins dans les NSC mais très peu dans les cellules non souches HA et U-87 MG. La sémaphorine classe 3A codée par SEMA3A intervient dans la migration cellulaire. Elle est fortement exprimée dans certains cancers dont les glioblastomes, mais elle n'est cependant pas exprimée dans la lignée cellulaire de glioblastomes U-87 MG. Cette surexpression est corrélée avec un mauvais pronostic dû à l'infiltration des cellules tumorales exprimant ce ligand et son récepteur (Bagci et al., 2009). Enfin, PODXL est le gène qui code la podocaxyline. Il est montré comme étant surexprimé dans les cellules souches hématopoïétiques (Doyonnas et al., 2005) ainsi que dans les cellules souches embryonnaires humaines et dans les corps embryonnaires (Brandenberger et al., 2004). La podocaxyline est également surexprimée dans des cellules souches de cancer du poumon à petites cellules (Koch et al., 2008). L'absence de PODXL dans les NSC et son fort niveau d'expression dans TG1 et OB1 suggère son rôle les cellules cancéreuses à caractère souche et pourrait également en faire un bon marqueur moléculaire pour différencier les CSC des NSC.

Ces gènes sont donc connus pour jouer un rôle dans le maintien de la pluripotence des cellules. Leur expression, plus importante dans les f-NSC et dans les CSC que dans les

cellules de la lignée U-87 MG et dans les astrocytes humains, confirme le caractère souche de ces cellules. Certains de ces gènes, tels que SEMA3A et PODXL, semblent plus spécifiquement exprimés dans les cellules souches cancéreuses. Ces gènes et leur produit pourraient faire l'objet d'études plus approfondies afin de déterminer leur rôle dans ces cellules.

L'analyse des gènes des cartes TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array Card d'Applied Biosystems montre également quatre gènes exprimés normalement dans des cellules différenciées ou dans des cellules engagées dans la voie des cellules neurales. Parmi ces 4 gènes se trouvent la GFAP (*glial fibrillary acid protein*) qui code une protéine des filaments intermédiaires, spécifique des astrocytes (Eng et al., 1971). Ce gène est exprimé de manière similaire dans les astrocytes humains que nous avons testés et dans les cellules souches cancéreuses TG1. Ceci peut indiquer soit une origine astrocytaire de la tumeur d'origine, soit une différenciation des cellules TG1 en cellules tumorales proches des astrocytes au sein des neurosphères de nature hétérogène. Le gène NES codant la nestine, protéine des filaments intermédiaires, spécifique des cellules neurales (Lendahl et al., 1990), est très fortement exprimé par les NSC et les CSC. La présence de la nestine indique que le caractère neural des cellules testées. Le gène OLIG2 (facteur de transcription de type 2 des oligodendrocytes) qui code un facteur de transcription intervenant dans la différenciation des cellules NSC en oligodendrocytes (Ono et al., 2009) est très exprimé dans les cellules NSC, TG1 et OB1. Ceci pourrait indiquer que les 3 types cellulaires mentionnés sont capables de se différencier en cellules de type oligodendrocytaire. Enfin, le gène PAX6 (*paired box gene 6*) qui code un facteur de transcription intervenant dans le système nerveux en développement notamment le développement des yeux (Grindley et al., 1995), est très exprimé dans les NSC et dans les astrocytes humains, mais peu dans les cellules cancéreuses (CSC et lignée U-87 MG). Des tests sur d'autres types de cellules neurales cancéreuses et non cancéreuses pourraient être réalisés pour confirmer la non expression de PAX6 dans les cellules de type cancéreux.

L'ensemble des résultats de l'expression des gènes des cartes TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array Card d'Applied Biosystems tend à montrer à la fois le caractère souche des cellules TG1, OB1 et NSC, et l'origine neurale de tous les types de cellules testés par cette méthode. Nos résultats montrent cependant des différences d'expression de certains gènes comme Nanog et TERT entre les cellules TG1 testées à Paris et celles que nous avons testées. Cette différence peut être expliquée par la différence de passage entre les cellules, le numéro de passage donné à nos cellules correspondant au nombre de passages réalisés dans notre laboratoire. Elles sont donc en réalité « plus vieilles » que les

cellules TG1 de Paris et il est possible comme évoqué précédemment qu'une population cellulaire exprimant moins ces gènes, ait été sélectionnée au cours de la culture.

2.3. Conclusions

Les cellules TG1 sont des cellules issues de glioblastomes dont la croissance s'effectue en neurosphère en suspension. Ces neurosphères sont issues de la clonalité des cellules (Patru et al., 2010), mais aussi de la capacité des cellules à former des neurosphères en s'agrégeant les unes aux autres. Les cellules TG1 sont vraisemblablement une population hétérogène de cellules dont les différents clones pourraient être amplifiés préférentiellement, expliquant ainsi les grandes variations génomiques observées sur une longue durée. Cependant, le protéome de ces cellules semble relativement stable pour une longue période de culture (Patru et al., 2010), suggérant ainsi des mécanismes de régulation de la transcription des gènes pour les différents clones considérés et montrant une stabilité phénotypique contrastant avec l'instabilité génétique. Enfin, les cellules TG1 expriment des marqueurs spécifiques à la fois des cellules souches et des cellules neurales à la fois au niveau des ARNm et des protéines.

L'ensemble des données préexistantes et de nos résultats conduit à dresser une « carte d'identité » des cellules TG1 présentée dans le tableau 5.

Données	Patru et al., 2010	Galan-Moya et al., 2011	Silvestre et al, 2011	Nos résultats
Sexe	F		F	F
Âge			55	
Tumeur	TGNM		TGNM	
Morphologie / Culture	Neurosphères en suspension Milieu DMEM/F12 supplémenté en B27, N2 et G5 2 doublements par semaine Différenciation : Adhérence changement morphologique (fusiforme) en absence d'EGF, b-FGF			Neurosphères en suspension Milieu DMEM/F12 supplémenté en B27, N2 et G5 2 doublements par semaine, Formation des neurosphères par aggrégation des cellules
Clonogénicité	Oui			
Xénogreffe	Oui Souris Nude 200-1000 cellules/greffe 12-24 semaines, infiltration		Oui, Souris immuno-déficientes sévère NSG infiltration	
Génotype	Gain : 1q, 5, 7, 9q, 12, 14 Pertes : 9p, 18q		TP53 WT	Gain : 1q, 7, 12, 14, 17 et 18p ; Perte 9p et 18q
Marqueurs	**Protéique :** Nestine +, GFAP +, Olig2 +, NCAM +, CXCR4 +, CD90 +, VLA2 +, CD15, CD34 + CD31 -, VE-cdh -, CD45 -, CD3 -, CD11b -, CD14 -, CD19 -, CD33 -, CD36 -, CD38 -, c-kit -, Flt3 -, CD44 -, CD93 – CD133 +↘ **ARNm :** POU5F1, Nanog +++ TERT ++ CD133 +	**Protéique :** Sox2, Nestin, PTEN	**Protéique :** Telomérase +	**ARNm :** GBX2, Nanog, TERT + PAX6, SOX2, GFAP + SEMA3A + NES, OLIG2 +++ PODXL ++++
Variations	Protéome stable entre les passages 40 et 160			Génome instable entre les passages 8 et 48.
Résistance	Témolozomide		Radiation	

Tableau 5 : Récapitulatif des caractéristiques des cellules TG1
Ce tableau est établi d'après les publications de l'équipe d'H. Chneiweiss et nos résultats. Abréviations : F, Féminin ; TGNM, Tumeur glioneuronale maligne ; DMEM/F12, Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 ; EGF, facteur de croissance de l'épiderme ; b-FGF, facteur de croissance b des fibroblastes ; souris NSG : souris NOD/Sid Gamma ; WT, wild-type ; GFAP, glial fibrillary acid protein ; Olig2, facteur de transcription de type 2 des oligodendrocytes ; NCAM, molécule d'adhésion des cellules neurales ; CXCR4, récepteur à motif C-X-C de type 4 ; CDxx, « cluster » de différenciation xx ; VLA2, very late activation 2 ; VE-cdh, cadhérine de l'endothélium vasculaire ; Flt3, tyrosine kinase 3 semblable à FMS ; TERT, télomérase ; Sox2, (sex determining region Y)-box 2 ; PTEN, phosphase-tensine homologue ; GBX2, protéine homéobox 2 spécifique de la gastrulation et du cerveau ; PAX6, paired box gene 6 ; SEMA3A, sémaphorine classe3A ; NES, nestine ; PODXL, podocaxyline-like.

ETUDE DU TRANSCRIPTOME

DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G

DANS LES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES

3. Etude du transcriptome RCPG des Cellules Souches Cancéreuses

3.1. Les RCPG

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires connectés par des boucles intracellulaires et extracellulaires (figure 29). Les RCPG sont retrouvés dans toutes les cellules eucaryotes (levures, animaux, plantes). Ils répondent à des stimuli extracellulaires en activant un signal de transduction amenant une réponse cellulaire. Les stimuli auxquels répondent les récepteurs sont de nature très variée, et comprennent le photon, des molécules odorantes, des nucléosides/nucléotides, des lipides, des peptides ou des ions. Il est fait une distinction entre les récepteurs répondant aux ligands produits par l'organisme (ligands endogènes) qui sont parfois appelés endoRCPG, et les récepteurs qui répondent à des ligands externes à l'organisme du type photon, phéromone ou encore molécule odorante qui sont appelés RCPG chimiosensitifs (ou csRCPG) (Vassilatis et al., 2003).

Dans notre étude du transcriptome RCPG des cellules souches cancéreuses, nous nous sommes principalement intéressés aux endoRCPG. Ces RCPG présentent donc la particularité d'être activés par des ligands endogènes. Ils sont impliqués dans des mécanismes physiologiques aussi variés que le développement, la reproduction, le métabolisme ou le comportement de l'individu. Les endoRCPG sont également impliqués dans des pathologies telles que les maladies cardio-vasculaires (Kobilka, 2011; Savoia et al., 2011), la maladie d'Alzheimer (Thathiah and De Strooper, 2011) et les cancers où ils sont notamment impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses, dans l'angiogenèse et dans la formation des métastases (Lappano and Maggiolini, 2011). Certains endoRCPG possèdent également la capacité d'interagir et d'activer les voies de signalisation des récepteurs tels que les facteurs de croissances (EGFR, récepteur du facteur de croissance de l'épiderme, largement impliqué dans la prolifération de nombreux cancers ; et IGFR, récepteur du facteur de croissance ressemblant à l'insuline, qui intervient dans le développement de certaines tumeurs). Leurs implications dans des pathologies diverses font qu'ils sont la cible de nombreuses molécules-médicament présentes sur le marché.

3.1.1. Voies de signalisation des RCPG

Les RCPG sont des structures tridimensionnelles flexibles et dynamiques qui oscillent entre une conformation active et une conformation non active. Chaque conformation correspond à un état énergétique. L'état basal correspond au RCPG non lié à un ligand. Cet état présente une activité de base plus ou moins importante selon le récepteur, liée à l'oscillation naturelle du RCPG entre la conformation active et la conformation non active. Un ligand agoniste, c'est-à-dire un ligand qui peut activer complètement un récepteur va changer la conformation du récepteur en se liant soit directement aux acides-aminés impliqués dans la stabilisation de l'état inactif du récepteur, soit en stabilisant de nouvelles interactions intramoléculaires favorisant la conformation active du récepteur (Kobilka and Deupi, 2007). A l'inverse, un ligand agoniste inverse va bloquer le récepteur dans sa conformation non active, diminuant ou annulant de la sorte, toute activité basale de sa part. Un troisième type de ligand, les antagonistes, peuvent se fixer sur des RCPG, empêchant ainsi l'action de l'agoniste ou de l'agoniste partiel, mais ne modifiant pas l'activité basale du récepteur (Kobilka and Deupi, 2007). La conformation du récepteur, la formation d'homo- ou d'hétérodimères de RCPG, son interaction avec d'autres classes de récepteurs et la signalisation induite par la liaison d'un ligand peuvent en outre être modulées par des effecteurs allostériques permettant une très grande plasticité fonctionnelle de ces récepteurs (Flordellis, 2012; Unal and Karnik, 2012).

Le RCPG lié à un agoniste, active, dans la plupart des cas, la protéine G à laquelle il est couplé. Les protéines G sont des protéines trimériques composées d'une sous-unité α et du dimère βγ. Il existe 16 isoformes de la sous-unité α, 5 isoformes de la sous-unité β et 12 isoformes de la sous-unité γ. Cette diversité implique de nombreuses combinaisons de protéines G pouvant être formées dans différents types cellulaires et impliquant de multiples voies d'activation. Les RCPG peuvent donc activer des voies de signalisation ayant des rôles physiologiques différents, en fonction des types cellulaires et tissulaires dans lesquels ils s'expriment (Robishaw and Berlot, 2004).

A l'état inactif, la protéine G est trimérique et la sous-unité α est liée au GDP (guanosine diphosphate). Lorsque la protéine G est activée, le GDP est remplacé par le GTP (guanosine triphosphate) et la sous-unité α se dissocie du dimère βγ. Chaque type de RCPG peut être lié à une combinaison limitée d'isoformes des sous-unités α, β et γ de la protéine G. C'est principalement la sous-unité α, en fonction de sa nature, qui détermine la cascade de signalisation qui sera activée. Ainsi, la sous-unité α_i peut inhiber l'adénylate cyclase et activer des phosphodiestérases et des phospholipases en plus d'agir sur des canaux ioniques. La sous-unité α_s peut activer l'adénylate cyclase et la sous-unité α_q peut activer la

phospholipase C et agir sur des canaux ioniques. La sous-unité α_{12} interagit avec les effecteurs Rho et des cadhérines. Les effecteurs vont ensuite activer ou inhiber la production de messagers secondaires AMPc (adénosine monophosphate cyclique), GMPc (guanosine monophosphate cyclique), diacylglycérol, acide arachidonique, acide phosphatidique, inositol (1,4,5)-triphosphate, phosphatidyl inositol (3,4,5)-triphosphate, concentration calcique intracellulaire… Le dimère βγ est également capable d'interagir avec des molécules effectrices telles que l'adénylate cyclase, la phospholipase C, des canaux ioniques et la phosphatidylinositol 3 kinase (figure 29) (Marinissen and Gutkind, 2001).

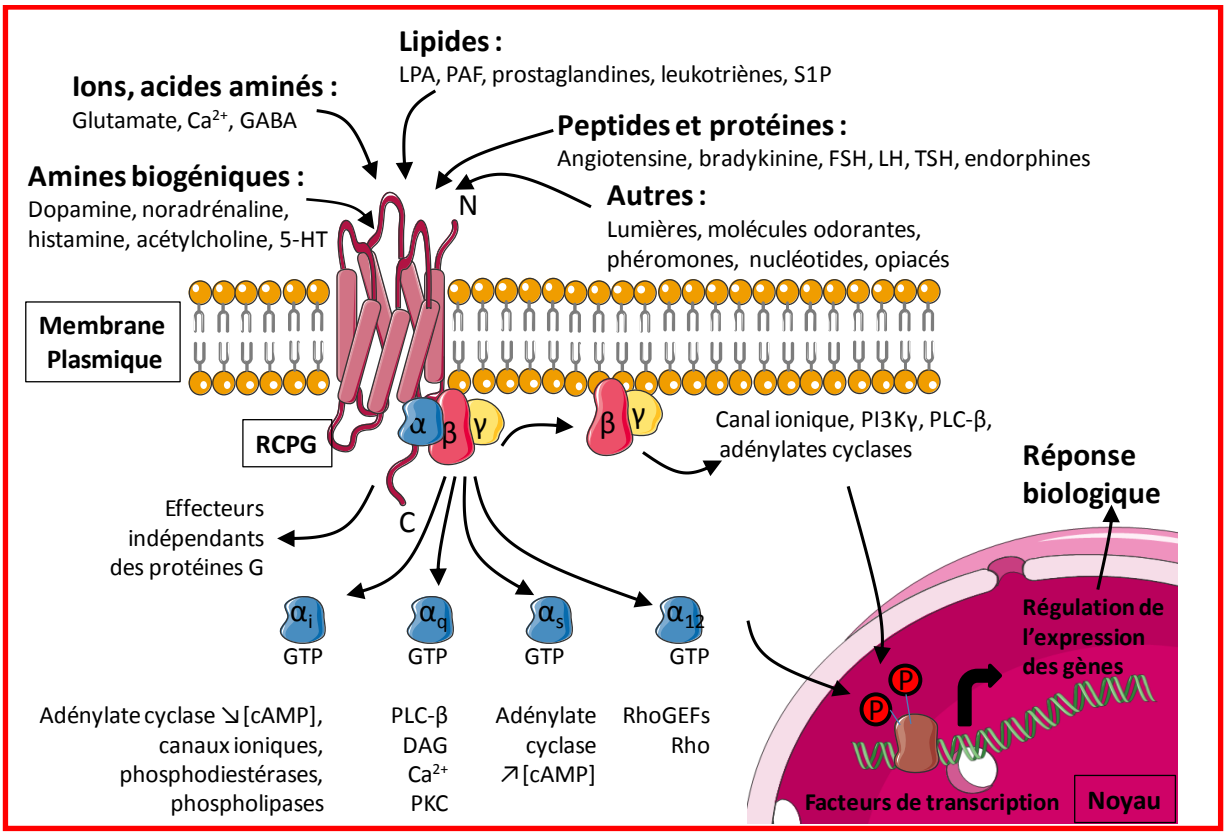


Figure 29 : Diversité de la voie d'activation des récepteurs couplés aux protéines G.
Les RCPG peuvent être activés par une variété de ligands. Le signal induit par la liaison du ligand peut être dépendant ou indépendant des protéines G. La sous-unité α de la protéine G peut être de nature différente, activant ou inhibant des effecteurs variés. L'activation des RCPG mène finalement à des réponses cellulaires clés telles que la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire…
Abréviations : Ca^{2+}, calcium ; GABA, acide γ-aminobutyrique ; 5-HT, sérotonine ; LPA, acide lysophosphatidique ; PAF, facteur activant les plaquettes ; S1P, sphingosine-1-phosphate ; FSH, hormone stimulant les follicules ; LH, hormone lutéinisante ; TSH, hormone stimulant la thyroïde ; GTP, guanosine triphosphate ; cAMP, adénosine 3',5'-monophosphate cyclique ; PI3Kγ, phosphatidylinositol 3-kinase γ ; PLC-β, phospholipase C β ; DAG, diacylglycérol ; PKC, protéine kinase C ; Rho-GEF, homologue Ras facteur d'échange de guanine. Cette figure a été réalisée grâce à Servier Medical Art. Adaptée de Marinissen and Gutkind, 2001.

La voie d'activation des RCPG peut mener à des réponses biologiques très variées comme la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire, le développement embryonnaire, l'hypertrophie, l'angiogenèse et le cancer. Après l'activation, la sous-unité α hydrolyse le GTP en GDP et se réassocie avec le dimère βγ. Parfois, le processus d'activation peut être régulé par un phénomène de désensibilisation résultant de la phosphorylation des RCPG. Ceux-ci s'associent alors avec des arrestines et seront internalisés pour être dégradés ou recyclés (Premont and Gainetdinov, 2007).

Cependant, les RCPG modulent également la signalisation cellulaire indépendamment des protéines G ou en initiant l'interaction avec de nombreuses autres protéines permettant la mise en place d'une véritable architecture intracellulaire (Magalhaes et al., 2012).

3.1.2. Les RCPG : des cibles thérapeutiques

La diversité des RCPG, de leurs effecteurs, de leurs messagers secondaires et de leurs effets biologiques font de ces récepteurs des cibles privilégiées pour le traitement de pathologies aussi variées que l'hypertension artérielle, les altérations du rythme cardiaque, les allergies, les désordres psychologiques sévères, le mal des transports, les cancers… En fait, environ 40 à 50% des médicaments actuellement sur le marché ciblent des RCPG, mais seulement 20% des endoRCPG sont ciblés. Il reste encore environ 140 RCPG orphelins (Tang et al., 2012), c'est-à-dire des récepteurs dont le ligand est inconnu, et les connaissances quant à la fonction de certains RCPG et leur interactions avec d'autres protéines, laissent une marge de progression pour la découverte de nouveaux médicaments agissant sur ces récepteurs.

3.1.2.1. RCPG et cancers

Comme mentionné précédemment, certains RCPG ont été reliés au développement tumoral (Wu et al., 2012). Ils jouent un rôle dans la prolifération et la migration des cellules tumorales. Bien souvent, une surexpression de ces RCPG et leur activation par des agonistes secrétés par la tumeur elle-même ou par les cellules stromales qui l'entourent, est à l'origine de la progression tumorale. Cependant, les cellules cancéreuses développent également d'autres stratégies impliquant des RCPG visant à accélérer la cancérogenèse, notamment *via* des échanges avec les récepteurs des facteurs de croissance, tels que l'EGFR (récepteur du facteur de croissance épidermal) bien connu pour sa participation dans

la cancérogénèse et dans la progression des gliomes (Dorsam and Gutkind, 2007). En effet, une surexpression de l'EGFR ou une suractivation de sa voie de signalisation, est associée avec l'augmentation de l'agressivité de plusieurs cancers métastatiques dont les cancers du sein (Hatakeyama, 2007), les gliomes (Hatanpaa et al., 2010) et les cancers de la tête et du cou (Bhola et al., 2012). Un exemple de la transactivation de l'EGFR par les RCPG peut être cité dans des cellules de cancer du sein. Kp-10 (résidu peptidique de 10 aminoacides de la kisspeptine) active son récepteur GPR54 qui forme alors un complexe avec l'EGFR. En réponse à la cascade de transduction de l'EGFR ainsi induite, les cellules cancéreuses de sein survivent, prolifèrent, secrètent des signaux induisant l'angiogenèse et forment des métastases (Zajac et al., 2011).

Outre leur implication dans la prolifération des cellules cancéreuses, les RCPG participent à l'angiogenèse et à la migration des cellules tumorales contribuant ainsi à la progression tumorale. En effet, des voies de signalisation, autres que la voie la plus connue VEGF-VEGFR (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire – récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), peuvent intervenir pour induire l'angiogenèse. Par exemple, dans les cancers du poumon, CXCL8 (ligand 8 à motif C-X-C aussi appelé Interleukine-8 IL-8), produit par les cellules tumorales (Zhang et al., 2012), se lie sur le CXCR2 (récepteur 2 à motif C-X-C) exprimé à la surface des cellules de l'endothélium microvasculaire. La signalisation induite par IL-8 sur son récepteur CXCR2 induit alors l'angiogenèse (Addison et al., 2000). Par ailleurs, l'IL-8 peut également se fixer à l'un ou l'autre de ses récepteurs couplés aux protéines G, CXCR1 ou CXCR2 qui activent les MAPK (protéine kinase activée par des mitogènes) résultant en la prolifération des cellules cancéreuses (Waugh and Wilson, 2008).

CXCR4 (récepteur 4 à motif C-X-C) et son ligand CXCL12 (ligand 12 à motif C-X-C, également appelé SDF1-α, facteur dérivant des cellules stromales) sont également impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses et dans l'induction de l'angiogenèse dans les gliomes de haut grade (Salmaggi et al., 2004). Cependant, ce récepteur et son ligand sont plus connus pour être impliqués dans la migration des cellules saines et cancéreuses et, dans le cadre des cancers, dans la formation de métastases dans des types d'organes spécifiques tels que les os, les poumons et le foie pour les cancers du sein, de l'ovaire et de la prostate par exemple. La chimiokine CXCL12 est sécrétée par les cellules de la moelle osseuse et le récepteur CXCR4 est exprimé à la surface des cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses sont capables de migrer et sont attirées jusqu'au site de métastase en suivant le gradient de chimiokine. (Furusato et al., 2010).

3.1.2.2. RCPG et cellules souches

Dans un autre registre, beaucoup de voies de signalisation en aval des RCPG régulent directement ou sont en synergie avec des voies de signalisation connues pour réguler la pluripotence ou la différenciation des cellules souches. Ainsi, l'augmentation de l'AMPc intracellulaire active la GTPase Rap (*Ras related protein,* une protéine utilisant de la guanosine tri-phosphate) qui régule la signalisation *via* les protéines SMAD (*mothers against decapentaplegic*), qui interviennent dans le maintien de la pluripotence et dans la différenciation des cellules progénitrices en fonction de l'isoforme de Smad (Blank et al., 2008). Les arrestines activent la GTPase Ral (*ras-like GTPase*) qui régule également la signalisation de SMAD. Les sous-unités α_s et α_q activent la signalisation de Stat3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) qui régule lui-même Sox2 (*SRY (sex determining region Y)-box 2),* un gène bien connu pour son implication dans le maintien de la pluripotence cellulaire, notamment des cellules souches embryonnaires. Le dimère βγ active la voie de signalisation PI3K/Akt qui est reliée à la voie de signalisation GSK-3/β-caténine impliquée dans la pluripotence des cellules souches. Enfin, de multiples voies de signalisation des protéines G mènent à l'activation de la voie des MAP Kinases (protéines activées par les mitogènes) qui activent cJun, cFos, et Elk également impliquées dans la pluripotence des cellules (figure 30) (Callihan et al., 2011).

Parmi les RCPG, la famille des récepteurs Frizzled (FZD), activés par la famille des glycoprotéines WNT (*Wingless Integration site*, site d'intégration sans ailes) maintiennent l'état indifférencié des cellules souches (Callihan et al., 2011). Leur voie de signalisation est détaillée au chapitre 1 paragraphe 1.4.2.2.3, page 42. De même, le récepteur smoothened (SMO) est indirectement activé par la présence de Shh (Sonic Hedgehog) (voir détails de la voie de signalisation au chapitre 1, paragraphe 1.4.2.2.2, page 41). SMO intervient dans le maintien des propriétés souches des cellules (Burglin, 2008).

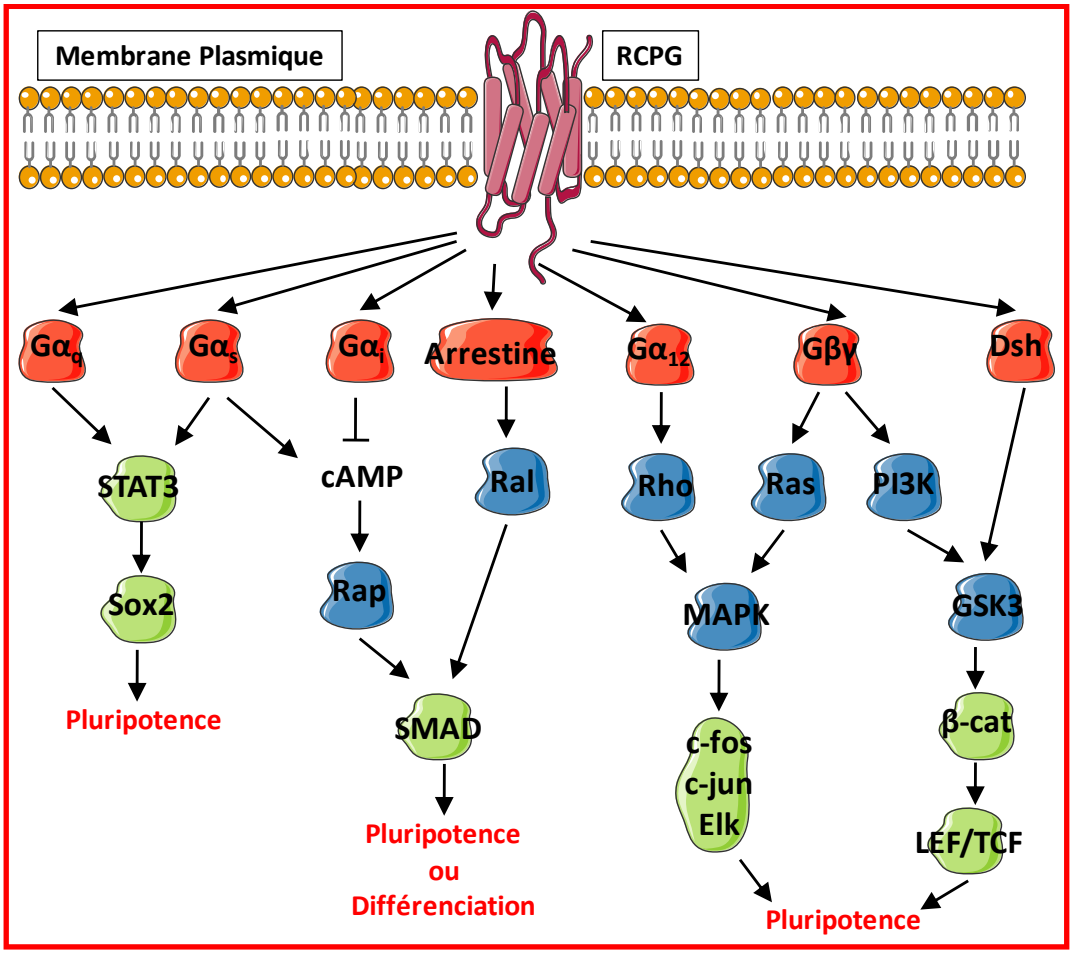


Figure 30 : Mécanismes potentiels pour les voies de régulation de la pluripotence par les récepteurs couplés aux protéines G.
Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) peuvent par certaines voies de signalisation, promouvoir la pluripotence ou la différenciation des cellules souches. Légende : En rouge, protéines qui interagissent avec un RCPG ; en bleu, kinases ; en vert, facteurs de transcription.
Abréviations : Gα$_q$, Gα$_s$ Gα$_i$ Gα$_{12}$, correspondent aux différentes sous-unités α de la protéine G ; Dsh, dishevelled ; STAT3, transducteur de signal et activateur de la transcription 3 ; cAMP, adénosine 3'5'-monophosphate cyclique ; Rho, homologue de Ras ; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase ; Ras, sarcome de rat ; Ral, protéine liée à Ras ; GSK3, kinase 3 de la glycogène synthase ; Sox2, (sex determining region y)-box 2 ; MAPK, protéine kinase activée par des mitogènes ; SMAD, homologue cellulaire du gène de la drosophile « mothers against dpp » ; β-Cat, β-caténine ; c-fos, homologue cellulaire de l'oncogène du rétrovirus FBJ (Finkel-Biskis-Jinkis) de l'ostéosarcome murin ; c-jun, homologue cellulaire de la protéine v-jun du virus du sarcome aviaire ; Elk, oncogène de la famille des Ets ; LEF/TCF, facteur enhancer lymphoide et facteur des lymphocytes T. Cette figure a été réalisée à l'aide de Servier Medical Art. Adaptée de Callihan et al., 2011.

Certains RCPG peuvent donc être impliqués à la fois dans la pluripotence des cellules et dans l'initiation, la progression et la formation des métastases des tumeurs. Les RCPG peuvent également être de bons candidats biomarqueurs des tumeurs comme c'est le

cas pour le PSGR (récepteur couplé aux protéines G spécifique de la prostate), un RCPG qui sert de biomarqueur pour les cancers de la prostate (Xu et al., 2000). Un autre exemple de RCPG servant de biomarqueur est EMR2 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 2). Son expression est corrélée positivement avec la survie des patients atteint de cancer du sein métastatique (Davies et al., 2011).

Afin d'approfondir notre connaissance de l'implication des RCPG dans la physiopathologie des cellules souches cancéreuses de glioblastome et de trouver des RCPG pouvant servir de biomarqueurs, nous avons entrepris l'étude du profil d'expression de 356 RCPG appartenant principalement aux endoRCPG avec deux objectifs :

- Comparer le répertoire des RCPG exprimés dans différents types de cellules cancéreuses et non cancéreuses, et notamment dans les cellules souches cancéreuses de glioblastomes TG1 et OB1, la lignée U-87 MG de glioblastomes, des cellules souches neurales fœtales humaines (f-NSC) et des astrocytes humains (HA).

- Mettre en évidence des RCPG différentiellement exprimés en fonction de l'état de quiescence des cellules souches cancéreuses TG1 (TG1 proliférantes *vs.* TG1 quiescentes) par suivi de la mise en quiescence des cellules

3.2. Etude du transcriptome RCPG dans les CSC

Afin de réaliser les objectifs précédemment définis, les ARN totaux des cellules souches cancéreuses de glioblastomes TG1 et OB1, de la lignée de cellules de glioblastomes (U-87 MG), des cellules souches neurales fœtales humaines (f-NSC) et des astrocytes humains (HA) ont été extraits puis rétrotranscrits en ADN complémentaire. Les PCR quantitatives ont été réalisées sur l'appareil ABI Prism® 7900HT d'Applied Biosystems™ à l'aide des cartes TaqMan® human GPCR Array Card d'Applied Biosystems™. Ces cartes permettent l'étude de l'expression de 356 gènes codant des RCPG, principalement des endoRCPG, 2 gènes de la famille LANCL (LANCL1 et LANCL2) que nous ne considérons pas comme des RCPG, 15 gènes de contrôle (gènes de ménage) et 8 autres gènes non reliés aux RCPG. La liste des gènes est disponible en annexe II. Chaque échantillon a été testé en duplicata et des PCR quantitatives ont été refaites pour confirmer certains résultats obtenus avec les cartes. L'analyse des résultats nécessite de connaitre le meilleur contrôle (gène de référence) à utiliser parmi ceux présents sur la carte.

Ce contrôle est défini comme étant celui qui est le plus stable dans tous les types cellulaires testés, selon les recommandations exposées au paragraphe 2.1.2.2 (Gresner et al., 2011).

Nous avons étudié la variabilité de 15 des gènes de contrôles proposés sur les cartes par un graphique dit « boîte à moustache ». Ce graphique montre la dispersion des données de séries statistiques, chaque série étant représentée par une boîte. Le graphique (figure 31) montre, pour chaque gène contrôle proposé la distribution des Ct (cycle seuil) pour les différentes études, tout type cellulaire confondu. Les boîtes à moustaches ont été réalisées avec l'ensemble des données et tiennent compte de la variation pour chaque type cellulaire testé. Le gène ayant la boîte à moustache la moins étendue est celui qui a les Ct qui varient le moins selon le type cellulaire étudié. Ainsi, on remarque que l'ARN ribosomique 18s, classiquement utilisé comme contrôle dans l'analyse des qPCR, est le moins stable en fonction du type cellulaire pour cette étude. Son utilisation est donc exclue pour cette analyse, bien qu'il ait pu être utilisé comme référence pour l'analyse de la transcription des gènes marqueurs du caractère souche des cellules (voir paragraphe 2.1.2.2). Il avait, pour cette analyse, la transcription la plus stable en fonction du type cellulaire étudié, parmi les gènes contrôles proposés sur la carte TaqMan® Human GPCR Array Card d'Applied Biosystems™. Les gènes *RPLP0* (protéine P0 de la grande sous-unité 60s du ribosome) et *TBP* (protéine de liaison à la boîte TATA) sont les gènes dont la transcription présente le moins de variation dans les différents types cellulaires utilisés pour nos études. Cependant, seul RPLP0, dont le cycle seuil (Ct) est de 21,1, a été choisi comme contrôle pour nos analyses. RPLP0 est exprimé environ 6000 fois moins que l'ARN ribosomique 18s.

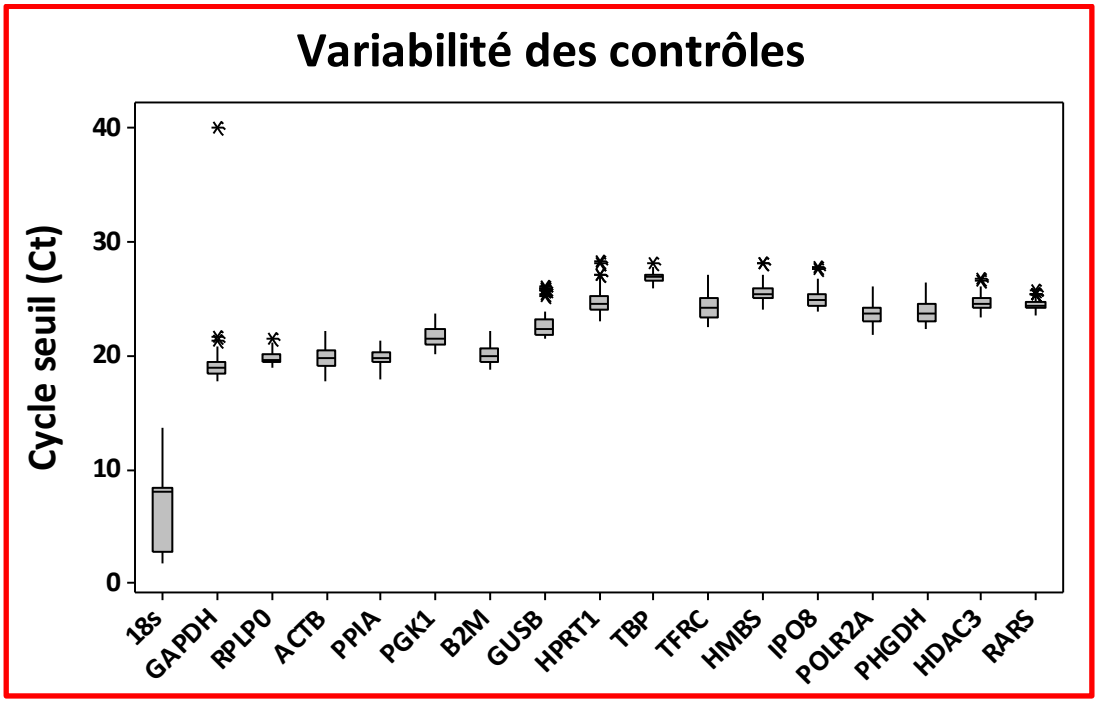


Figure 31 : Détermination du meilleur gène rapporteur pour l'analyse de la transcription des RCPG par un graphique de boîte à moustaches.
Ce graphique représente la variation des gènes contrôles présents sur les TaqMan® GPCR Array Card d'Applied Biosystems™. La série statistique pour chaque gène est donnée par la valeur des cycles seuils (Ct) pour les duplicatas de chaque type cellulaire testé pour l'ensemble des études de transcriptome RCPG réalisées au laboratoire dans le cadre de cette étude. Chaque gène est représenté par une boîte à moustaches (voir légende de la figure 25). Ici, les gènes présentant le moins de variabilité codent RPLP0 *(protéine P0 de la grande sous-unité ribosomique) et* TBP *(protéine de liaison à la boîte TATA).*
Abréviations : 18s, ARN ribosomique 18s ; GAPDH, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; ACTB, actine β ; PPIA, peptidylpropyl isomérase A ; PGK1, phophoglycérate kinase 1 ; B2M, β2-microglobuline ; GUSB, glucuronidase β ; HPRT1, hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1 ; TFRC, récepteur de la transférine ; HMBS, hydroxyméthylbilane synthase ; IPO8, importine 8 ; POLR2A, grande sous-unité de l'ARN polymérase II ADN dépendante ; PHGDH, phosphoglycérate déshydrogénase ; HDAC3, histone déacétylase 3 ; RARS, aminoacyl ARNt synthétase.

3.2.1. Répertoire des RCPG exprimés dans deux lignées de cellules souches cancéreuses de glioblastomes. Comparaison à l'expression dans d'autres lignées de cellules cancéreuses et non cancéreuses.

Une première étude de transcriptome visait à caractériser les RCPG exprimés dans les cellules souches cancéreuses de glioblatomes en comparaison de ceux exprimés dans la lignée de glioblastome U-87 MG et dans des cellules non cancéreuses. Compte tenu de l'importance des RCPG dans la signalisation cellulaire, cette étude pourrait conduire à l'identification de voies dérégulées dans ces cellules et éventuellement de biomarqueurs. A

l'aide des cartes RCPG TaqMan® Array Card d'Applied Biosystem™, nous avons réalisé une étude de l'expression des gènes RCPG dans les cellules TG1 et OB1, deux des quatre types de cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes que nous avons au laboratoire, et nous les avons comparé à l'expression des mêmes gènes dans les cellules U-87 MG de glioblastomes, les cellules f-NSC et des astrocytes humains (HA). Chaque type cellulaire a été testé en duplicata sauf les f-NSC qui ont été testées en triplicata. Les cellules TG1 testées, sont des cellules en prolifération, se trouvant aux 8ème et 23ème passages en culture. Les cellules OB1 sont au passage 20, les cellules HA sont au passage 5, les cellules U-87 MG sont au passage 10 et les cellules souches neurales fœtales (f-NSC) ont été testées deux fois au passage 15 et une fois au passage 20.

Les résultats d'expression des RCPG, normalisés par rapport au contrôle RPLP0, sont présentés en valeurs relatives par rapport à la limite de détection fixée pour notre expérience qui est de 31,5 Ct (Ct : cycle seuil). Cette limite a été déterminée en fonction du bruit de fond constaté pour nos données. Au-delà de ce seuil (Ct > 31,5), la fluctuation sur la mesure d'expression des gènes est très importante et il est hasardeux de se prononcer sur les variations d'expression de ces gènes, compte tenu du nombre de réplicas utilisés pour les expériences. L'expression des gènes est donc calculée selon la formule :

$$Expression\ Relative = 2^{(31{,}5-\Delta \mathrm{Ct})}$$

où ∆Ct représente la normalisation des cycles seuils pour chaque RCPG, par rapport au contrôle RPLP0.
et 31,5 est la valeur de détection limite fixée dans le cadre de notre étude.

Nous avons retenu pour notre étude, les RCPG qui présentent une expression relative supérieure ou égale à 1, dans au moins un des cinq types cellulaires testés (soit une valeur de Ct inférieure ou égale à 31,5 dans au moins un des types cellulaires). L'analyse montre que 138 RCPG répondent à ce critère. Les autres RCPG de la carte TaqMan® GPCR Array Card ne sont pas exprimés ou sont exprimés à un taux inférieur au seuil que nous nous sommes fixés dans cette analyse. La plupart des RCPG exprimés dans ces cellules le sont dans une gamme allant de moyennement exprimé (expression relative comprise entre 10 et 100) à peu exprimés dans les cellules testées (expression relative comprise entre 1 et 10), comparé au niveau d'expression des gènes de ménage (expression relative généralement supérieure à 200). Parmi les 138 gènes exprimés, 83 gènes sont exprimés dans les cellules TG1, 90 dans les cellules OB1, 77 dans les cellules f-NSC, 61 dans les cellules HA et 57 le sont dans les cellules U-87 MG (voir expression des RCPG

dans les différents types cellulaires en annexe). Les RCPG les plus exprimés dans les différents types cellulaires sont LPHN2 (latrophiline 2) et GPR56 (récepteur 56 couplé aux protéines G) dans les cellules TG1 ; RGR (récepteur rétinal couplé aux protéines G), F2R (récepteur de la thrombine), GPR56, FZD7 (Frizzled 7) et LPHN2 dans les cellules OB1 ; GPR56, FZD3 (Frizzled 3) et GPRC5B (récepteur couplé aux protéines G famille C, groupe 5, membre B) dans les cellules f-NSC ; BDKRB2 (récepteur B2 de la bradykinine) et GPR56 dans les cellules U-87 MG et FZD1 (Frizzled 1) et FZD7 dans les astrocytes humains (tableau 6). GPR56 est donc très exprimé dans tous les types cellulaires cancéreux testés (TG1, OB1 et U-87 MG), mais aussi dans les cellules f-NSC, les cellules souches non tumorales (figure 32). GPR56 est exprimé très faiblement, proche de la limite de détection fixée, dans les astrocytes humains (expression relative inférieure à 2).

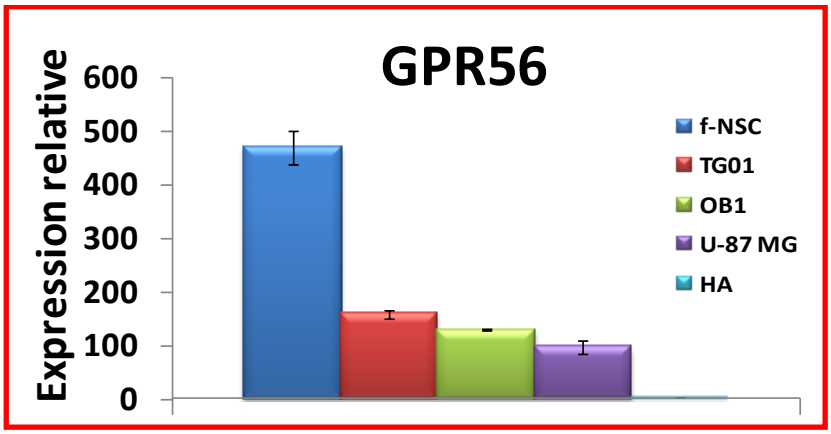


Figure 32 : Expression de GPR56 dans les différents types cellulaires
GPR56 est le RCPG le plus exprimé dans les cellules testées à l'exception des astrocytes humains (HA) dans lesquelles il est exprimé très faiblement au dessus de la limite de détection fixée. L'expression du RCPG est indiquée en valeur relative par rapport au cycle seuil de 31,5 Ct, selon la formule : Expression relative = $2^{(31.5-\Delta Ct)}$ *où* ΔCt *représente la valeur du cycle seuil du RCPG normalisée par rapport au* Ct_{RPLP0} *et 31.5 est la limite de détection fixée.*
Abréviations : TG1 et OB1, cellules souches cancéreuses issues de tumeurs glio-neuronales malignes ; f-NSC, cellules souches neurales fœtales ; U-87 MG, lignée cellulaire de glioblastome ; HA, astrocytes humains.

Type Cellulaire	RCPG les plus exprimés	Expression Relative
TG1	LPHN2	130 ± 20
	GPR56	159 ± 7
OB1	RGR	1650 ± 240
	F2R	145,9 ± 0,6
	GPR56	130 ± 2
	FZD7	120,3 ± 0,4
	LPHN2	115 ±4
f-NSC	GPR56	470 ± 30
	FZD3	107 ± 15
	GPRC5B	102 ± 13
U-87 MG	BDKRB2	130 ± 3
	GPR56	98 ± 2
HA	FZD1	92 ± 9
	FZD7	94 ± 8

Tableau 6 : RCPG les plus exprimés dans chaque type cellulaire testé
L'expression du RCPG est exprimée relativement à la limite de détection fixée selon la formule : Expression relative = $2^{(31.5-\Delta Ct)}$ *où* ΔCt *représente la valeur du cycle seuil du RCPG normalisée par rapport au* Ct_{RPLP0} *et 31.5 est la limite de détection fixée (c'est-à-dire qu'un Ct de 31,5 donne une expression relative de 1). Pour chaque type cellulaire, les tests ont été effectués 2 fois, excepté pour les cellules f-NSC qui ont été testées 3 fois.*
Abréviations : RCPG, récepteur couplé aux protéines G ; TG1 et OB1, cellules souches cancéreuses issues de tumeurs glio-neuronales malignes ; f-NSC, cellules souches neurales fœtales ; U-87 MG, lignée cellulaire de glioblastome ; HA, astrocytes humains ; LPHN2, latrophiline 2 ; GPRxx, récepteur couplé aux protéines G numéro xx ; RGR, récepteur rétinal couplé aux protéines G ; F2R, récepteur du facteur de coagulation II ; FZDx, frizzled ; BDKRB2, récepteur B2 de la bradykinine.

Afin de mettre en évidence les groupes de gènes les plus exprimés dans les différents types cellulaires testés et les groupes de gènes communs à deux types cellulaires ou plus, un « clustering » hiérarchique a été réalisé au moyen du logiciel *d-Chip*. Seuls les 138 RCPG exprimés significativement dans au moins un type cellulaire, ont été utilisés pour cette analyse. Les résultats (figure 33) montrent trois principaux « clusters ». Les cellules TG1 et OB1 sont regroupées dans un premier « cluster ». Les cellules U-87 MG forment un deuxième « cluster » avec les astrocytes humains. Le troisième cluster est formé par les cellules f-NSC qui occupent un statut particulier car elles semblent plus proches du cluster TG1/OB1 que du cluster U-87 MG/HA. La méthode utilisée pour réaliser le dendrogramme ne permet pas d'en définir la racine.

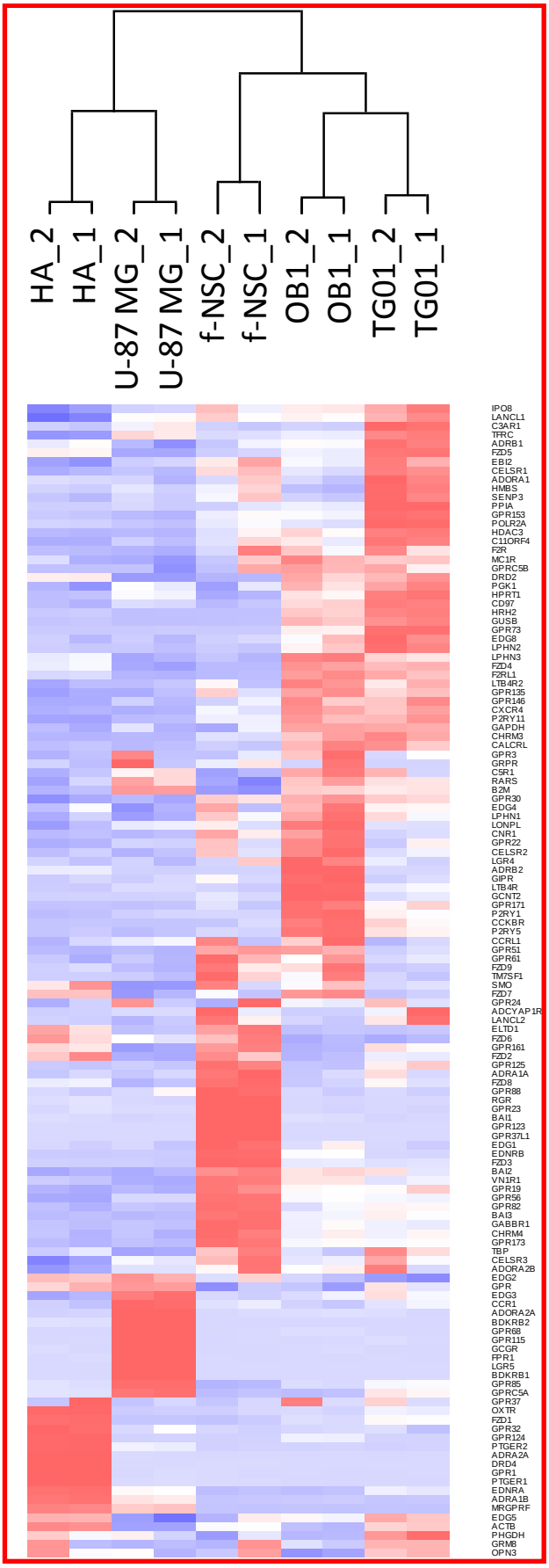


Figure 33 : Clustering hiérarchique de l'expression des RCPG dans les différents types cellulaires testés.
Le clustering a été réalisé sur les 138 gènes exprimés avec un Ct inférieur à 31,5 dans au moins un des 5 types cellulaires testés (HA, U-87 MG, f-NSC, OB1 et TG1). Les résultats pour les cellules f-NSC de même passage ont été moyennés. Le résultat du clustering reste identique si les données pour f-NSC de même passage ne sont pas moyennées.
Légende : Chaque ligne du dendrogramme correspond à un gène. Les couleurs sont indiquées par rapport à l'expression moyenne d'un gène donné dans les 5 types cellulaires testés. En bleu, les gènes sous-exprimés ; en rouge, les gènes sur-exprimés ;en blanc, l'expression du gène correspond à la moyenne. Abréviations : HA, astrocytes humain ; U-87 MG, lignée de glioblastome humain ; f-NSC, cellules souches neurales fœtales humaines ; TG1 et OB1, cellules souches cancéreuses issues d'une tumeur glio-neuronale maligne de deux patients différents.

Ce clustering met en évidence les gènes spécifiquement exprimés ou surexprimés dans un type cellulaire ou communs à deux types cellulaires ou plus. Le profil d'expression des RCPG constitue ainsi une signature spécifique d'un type cellulaire donné et permet de grouper les cellules en fonction de leur statut physiologique ou pathologique.

3.2.1.1. Gènes exprimés dans les cinq types cellulaires testés

Une analyse plus détaillée des données du transcriptome RCPG permet de distinguer des gènes communs aux 5 types cellulaires testés, TG1, OB1, f-NSC, U-87 MG et HA.

Sur l'ensemble de l'analyse, 26 RCPG semblent exprimés dans toutes les cellules testées. Les RCPG représentés sous forme graphique ci-dessous (figure 34), semblent exprimés de 2 à 470 fois plus que le seuil fixé (Ct = 31,5 qui correspond à une expression relative de 1), dans les 5 types cellulaires testés. Dans ce groupe, les RCPG impliqués dans l'adhésion des cellules sont les plus représentés (7/26) dont BAI2 (inhibiteur 2 spécifique de l'angiogenèse cérébrale), CD97 (« cluster » de différenciation 97), CELSR1 (*cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1*), GPR125, LPHN1, LPHN2 (latrophiline 1 et 2) et GPR56. Viennent ensuite les récepteurs de la famille Frizzled (5/26) comprenant FZD1, FZD2, FZD5, FZD7 et FZD8.

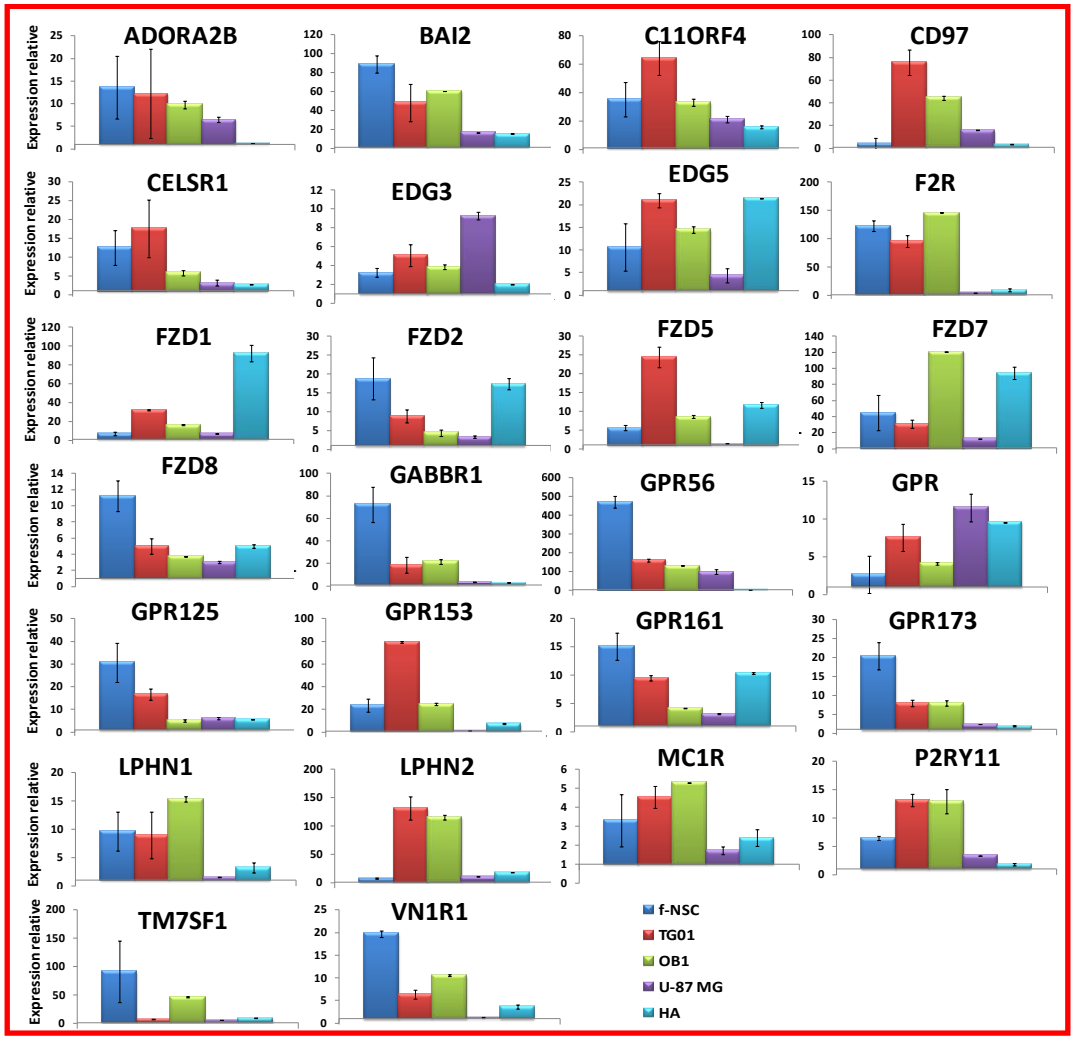


Figure 34 : Récepteurs couplés aux protéines G exprimés dans les cinq types cellulaires testés.

Ces graphiques représentent la variation de l'expression relative des gènes exprimés dans les cinq types cellulaires testés. L'expression du RCPG est exprimée relativement à la limite de détection fixée selon la formule : Expression relative = $2^{(31.5-\Delta Ct)}$ où ΔCt représente la valeur du cycle seuil du RCPG normalisée par rapport au Ct_{RPLP0} et 31.5 est la limite de détection fixée (c'est-à-dire qu'un Ct de 31.5 donne une expression relative de 1). Certains gènes ont été retestés individuellement, leur profil d'expression dans les différents types cellulaires reste le même. Abréviations : f-NSC, cellules souches neurales fœtales humaines ; TG1 et OB1, cellules souches cancéreuses issues d'une tumeur glioneuronale maligne ; U-87 MG, lignée cellulaire issue d'un glioblastome ; HA, astrocytes humains ; ADORA2B, récepteur de l'adénosine A2b ; BAI2, inhibiteur 2 de l'angiogenèse spécifique du cerveau ; C11ORF4, chromosome 11 hypothetical protein ORF4 ; CD97, « cluster » de différenciation 97 ; CELSR1, cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 ; EDGx, edge x (récepteur couplé aux protéines G de différenciation de l'endothélium ou récepteurs à la sphingosine-1-phosphate) ; F2R, récepteur de la thrombine ; FZDx, frizzled x ; GABBR1, récepteur B1 de l'acide gamma-aminobutyrique ; GPRxx, récepteur couplé aux protéines G numéro xx ; LPHNx, latrophiline x ; MC1R, récepteur 1 à la mélanocortine ; P2RY11, récepteur purinergique 11 ; TM7SF1, récepteur transmembranaire 7 de la superfamille 1 ; VN1R1, récepteur voméronasal 1.

Le RCPG le plus exprimé est GPR56, présenté précédemment (figure 32). GPR56 est connu pour son expression dans les cellules cancéreuses (Yang et al., 2011a; Yang and Xu, 2012). Ce RCPG est exprimé dans les cellules souches f-NSC et dans les cellules cancéreuses TG1, OB1 et U-87 MG (expressions relatives respectives de 470±30 ; 159±7 ; 130±2 ; 98±2). D'autres RCPG sont remarquables par leur différence d'expression dans les différents types cellulaires testés. F2R (récepteur à la thrombine), BAI2, GPR135 et GABBR1 (récepteur de l'acide gamma aminobutyrique) sont significativement plus exprimés dans les cellules à caractère souche (f-NSC, TG1 et OB1) comparés aux cellules U-87 MG et HA. CD97 est significativement plus exprimé dans les cellules cancéreuses (TG1, OB1 et U-87 MG) par rapport aux cellules normales (f-NSC et HA). Enfin, dans ce groupe, seul LPHN2 semble surexprimé dans les CSC (TG1 et OB1) comparé aux autres cellules (U-87 MG, f-NSC et HA).

3.2.1.2. Gènes exprimés préférentiellement dans les cellules à caractère souche

Dans la suite de l'analyse, nous avons recherché les RCPG qui étaient exprimés dans les cellules souches normales et cancéreuses (f-NSC, TG1 et OB1), mais non dans les cellules U-87 MG et les astrocytes (HA). Ainsi, 13 RCPG spécifiques des cellules à propriétés souches, ont été mis en évidence. La plupart de ces gènes sont moyennement exprimés par rapport au seuil fixé (expression relative des gènes inférieure à 15) et sont présentés figure 35.

Parmi les 13 gènes présentés, le plus spécifique et le plus exprimé est CXCR4. CXCR4 est un RCPG exprimé dans différents tissus dont le tissu hématopoïétique et le cerveau (Barbieri et al., 2007). Des ARNm de CXCR4 sont retrouvés dans les cellules f-NCS, TG1 et OB1 qui ont toutes des propriétés souches avec une expression similaire dans les cellules f-NSC et dans les cellules TG1 et une expression relative 3 fois plus élevée dans les cellules OB1 (expressions relatives respectives de 34±6 ; 43,1±0,1 et 90,0±0,6) alors qu'ils ne sont pas significativement retrouvés dans les cellules U-87 MG et dans les astrocytes humains (expressions relatives inférieures à 1, c'est-à-dire que leur expression est inférieure au seuil fixé (Ct=31,5)).

BAI3 (inhibiteur spécifique de l'angiogenèse cérébrale 3), CHRM4 (récepteur cholinergique muscarinique 4), EDNRB (récepteur B à l'endothéline) et dans une moindre mesure GPR19 sont exprimés dans les trois types de cellules à caractère souche, mais ont une plus forte expression dans les cellules f-NSC. Au contraire, CHRM3 (récepteur

cholinergique muscarinique 3), GPR171, LTB4R2 (récepteur 2 du leukotriène B4) et P2RY5 (récepteur purinergique P2Y) ont une plus forte expression dans les cellules TG1 et OB1.

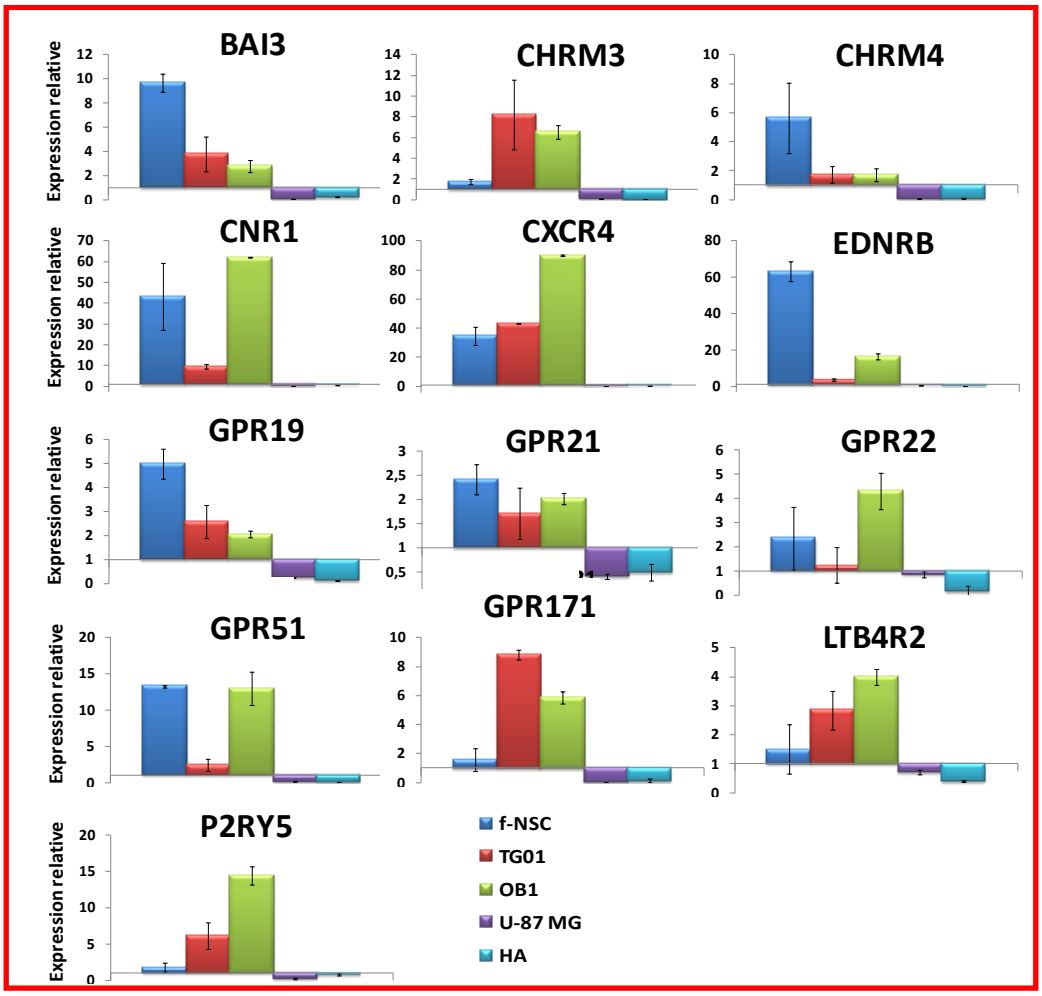


Figure 35 : Récepteurs couplés aux protéines G spécifiquement exprimés dans les cellules à caractère souche.

Ces graphiques représentent la variation de l'expression relative des gènes surexprimés dans les cellules souches cancéreuses TG1 et OB1 ainsi que les cellules f-NSC. L'expression des gènes est évaluée par une expérience de RT-PCR quantitative. L'expression du RCPG est exprimée relativement à la limite de détection fixée selon la formule : Expression relative = $2^{(31.5-\Delta Ct)}$ *ou ΔCt représente la valeur du cycle seuil du RCPG normalisée par rapport au* Ct_{RPLP0} *et 31.5 est la limite de détection fixée (c'est-à-dire qu'un Ct de 31.5 donne une expression relative de 1). Certains gènes ont été retestés individuellement, leur profil d'expression dans les différents types cellulaires reste le même.*

Abréviations : f-NSC, cellules souches neurales fœtales humaines ; TG1 et OB1, cellules souches cancéreuses issues de tumeurs glio-neuronales malignes ; U-87 MG, lignée cellulaire issue d'un glioblastome ; HA, astrocytes humains ; BAI3, inhibiteur spécifique de l'angiogenèse cérébrale 3 ; CHRMx, récepteur x cholinergique muscarinique ; CNR1, récepteur cannabinoïde 1 ; CXCR4, récepteur 4 aux chimiokine à motif C-X-C ; EDNRB, récepteur à l'endothéline de type B ; GPRxx, récepteur couplé aux protéines G numéro xx ; LTB4R2, récepteur 2 du leukotriène B4 ; P2RY5, récepteur purinergique 5.

D'autres RCPG, qui sont exprimés au dessus du seuil fixé dans 4 ou 5 des types cellulaires testés, peuvent entrer dans cette catégorie s'ils présentent une expression significativement plus élevée dans les cellules à caractère souche que dans les cellules HA ou U-87 MG. Huit RCPG, dont la plupart ont été présentés au paragraphe 3.2.1.1 page 98, sont concernés et présentés figure 36. F2R, le récepteur de la thrombine et GPRC5B (récepteur couplé aux protéines G, famille C groupe 5 membre B, sont particulièrement remarquables car ils sont très exprimés et à un niveau similaire dans les cellules à caractère souche (expressions relatives d'environ 120 pour F2R dans les cellules TG1, OB1 et f-NSC et 90 pour GPRC5B dans les cellules TG1, OB1 et f-NSC).

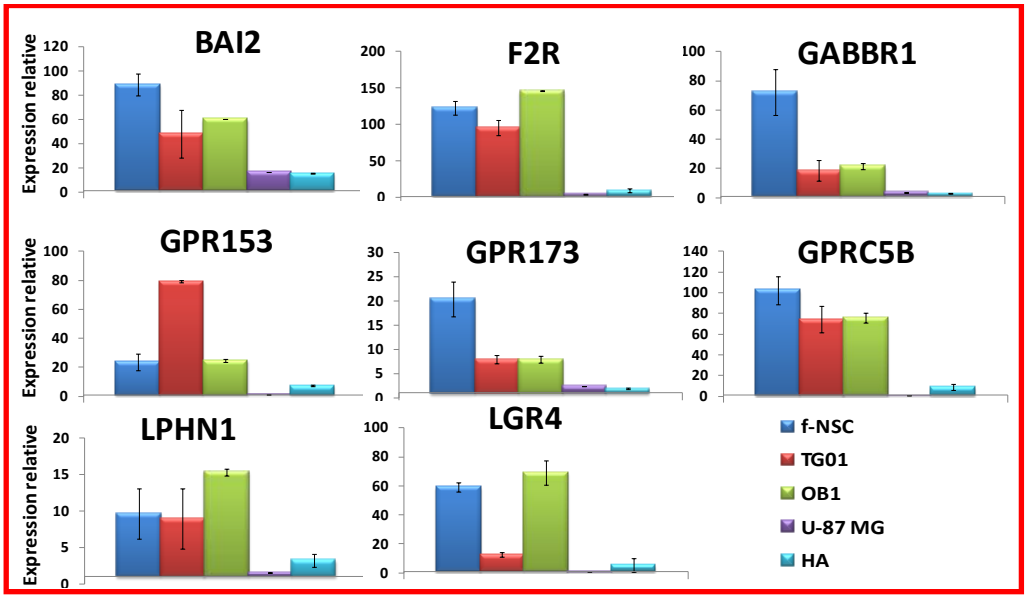


Figure 36 : Récepteurs couplés aux protéines G préférentiellement exprimés dans les cellules à caractère souche.

Ces graphiques représentent la variation de l'expression relative des gènes surexprimés dans les cellules souches cancéreuses TG1 et OB1 ainsi que les cellules f-NSC. L'expression des gènes est évaluée par une expérience de RT-PCR quantitative. L'expression du RCPG est exprimée relativement à la limite de détection fixée selon la formule : Expression relative = $2^{(31.5-\Delta Ct)}$ *où* ΔCt *représente la valeur du cycle seuil du RCPG normalisée par rapport au* Ct_{RPLP0} *et 31.5 est la limite de détection fixée (c'est-à-dire qu'un Ct de 31.5 donne une expression relative de 1). Certains gènes ont été retestés individuellement, leur profil d'expression dans les différents types cellulaires reste le même.*

Abréviations : f-NSC, cellules souches neurales fœtales humaines ; TG1 et OB1, cellules souches cancéreuses issues de tumeurs glio-neuronales malignes ; U-87 MG, lignée cellulaire issue d'un glioblastome ; HA, astrocytes humains ; BAI2, inhibiteur spécifique de l'angiogenèse cérébrale 2 ; F2R, récepteur de la thrombine ; GPRxx, récepteur couplé aux protéines G numéro xx ; LPHN1, latrophiline 1 ; LGR4, récepteur couplé aux protéines G riche en leucine.

3.2.1.3. Gènes exprimés dans les cellules souches cancéreuses

Un groupe de gènes exprimés préférentiellement dans les cellules souches cancéreuses TG1 et OB1 a pu être mis en évidence grâce à l'analyse du transcriptome RCPG. Les 8 RCPG qui répondent à ce critère sont représentés figure 37.

LPHN2, déjà présenté au paragraphe 3.2.1.1 pour son expression dans tous les types cellulaires, a des variants dont certains sont normalement exprimés dans le cerveau (White et al., 2000). Des transcrits de LPHN2 sont détectables au dessus du seuil fixé (Ct<31,5) dans les cellules f-NSC (expression relative de 7,4±0,6), ainsi que dans les cellules U-87 MG et dans les astrocytes humains (expressions relatives respectives de 10,6±0,1 et de 18,0±0,2), mais LPHN2 est exprimé 6 à 18 fois plus dans les cellules souches cancéreuses TG1 et OB1 (expressions relatives respectives de 130±20 et de 114±4). GPR37 et HRH2 (récepteur histaminique H2) sont exprimés en dessous de la limite fixée dans les cellules f-NSC, U-87 MG et HA. Ces gènes sont donc spécifiquement exprimés dans les cellules souches cancéreuses TG1 et OB1.

CALCRL (calcitonin receptor like) est exprimé dans les cellules f-NSC et les cellules HA mais à un niveau proche du seuil de détection fixé. Il n'est pas exprimé dans les cellules U-87 MG. EDG8, GPR103 et GPR128 semblent exprimés spécifiquement dans les cellules TG1 et OB1, mais à des valeurs proches du seuil de détection fixé.

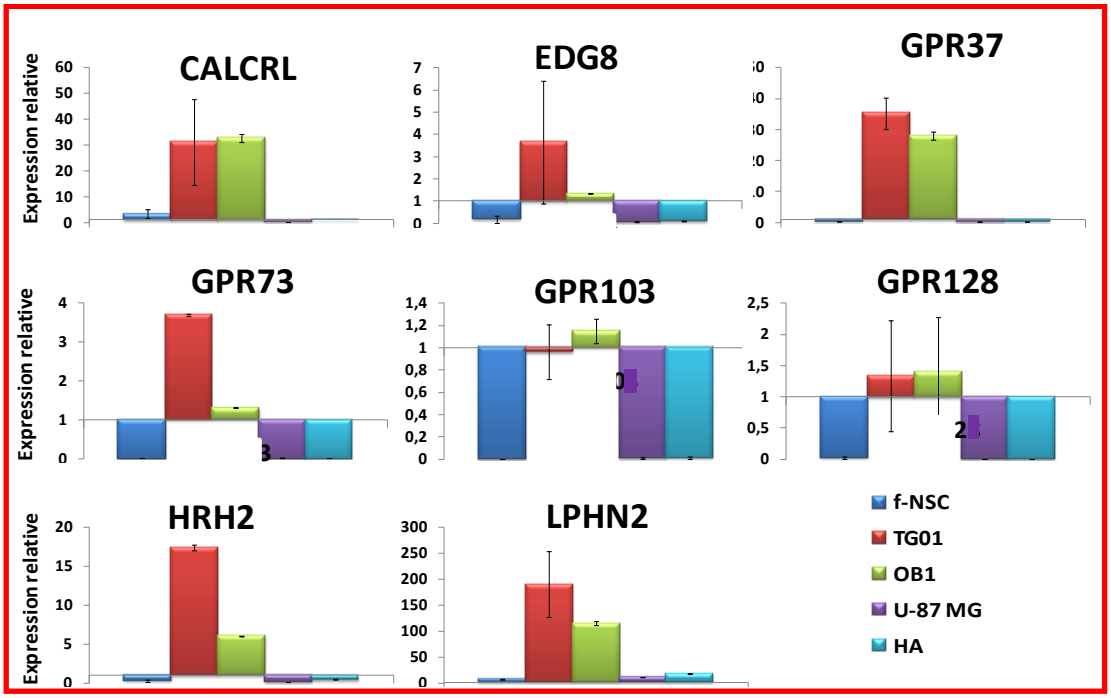


Figure 37 : Récepteurs couplés aux protéines G préférentiellement exprimés dans les cellules souches cancéreuses.

Ces graphiques représentent la variation de l'expression relative des gènes surexprimés dans les cellules souches cancéreuses TG1 et OB1. L'expression des gènes est évaluée par une expérience de RT-PCR quantitative. L'expression du RCPG est exprimée relativement à la limite de détection fixée selon la formule : Expression relative = $2^{(31.5-\Delta Ct)}$ où ΔCt représente la valeur du cycle seuil du RCPG normalisée par rapport au Ct_{RPLP0} et 31.5 est la limite de détection fixée (c'est-à-dire qu'un Ct de 31.5 donne une expression relative de 1). Certains gènes ont été retestés individuellement, leur profil d'expression dans les différents types cellulaires reste le même.

Abréviations : f-NSC, cellules souches neurales fœtales humaines ; TG1 et OB1, cellules souches cancéreuses issues de tumeurs glio-neuronales malignes ; U-87 MG, lignée cellulaire issue d'un glioblastome ; HA, astrocytes humains ; CALCRL, récepteur à la calcitonine like ; EDG8, edge 8 (récepteur à la sphingosine-1-phosphate) ; GPRxx, récepteur couplé aux protéines G numéro xx ; HRH2, récepteur histaminique H2 ; LPHN2, latrophiline 2.

Parmi les 138 RCPG exprimés dans au moins un des types cellulaires testés, il est à noter la particularité de FZD6 (Frizzled 6). En effet, ce RCPG semble spécifiquement sous-exprimé dans les cellules souches cancéreuses TG1 et OB1 par rapport à son expression dans les trois autres types cellulaires testés (figure 38).

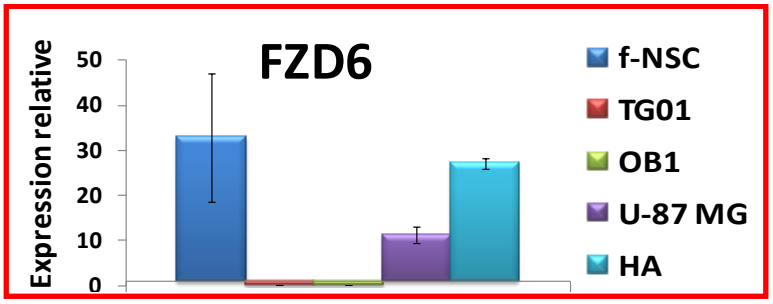


Figure 38 : Expression de FZD6 dans les différents types cellulaires testés.
Ce graphique représente la variation de l'expression relative de FZD6 (Frizzled 6), spécifiquement sous-exprimé dans les cellules souches cancéreuses TG1 et OB1. L'expression de FZD6 est évaluée par une expérience de RT-PCR quantitative. L'expression du RCPG est exprimée relativement à la limite de détection fixée selon la formule : Expression relative = $2^{(31.5-\Delta Ct)}$ *où ΔCt représente la valeur du cycle seuil du RCPG normalisée par rapport au* Ct_{RPLP0} *et 31.5 est la limite de détection fixée (c'est-à-dire qu'un Ct de 31.5 donne une expression relative de 1).*
Abréviations : f-NSC, cellules souches neurales fœtales humaines ; TG1 et OB1, cellules souches cancéreuses issues de tumeurs glio-neuronales malignes ; U-87 MG, lignée cellulaire issue d'un glioblastome ; HA, astrocytes humains.

3.2.2. Evolution du répertoire RCPG au cours de la mise en quiescence des cellules souches cancéreuses TG1. Recherche de biomarqueurs de l'état de quiescence.

Les cellules souches cancéreuses sont très sensibles à leur microenvironnement, qui peut induire des changements dans leur métabolisme, dans leur état de différenciation et/ou dans leur fonction. Certaines conditions comme l'acidification du milieu et la privation de nutriments ont été montrées comme favorisant la quiescence des cellules souches cancéreuses. D'une manière générale, l'état de quiescence est caractérisé par des modifications d'expression d'un certain nombre de gènes (Narbonne and Roy, 2008). Compte tenu de l'importance des RCPG dans la communication inter- et intracellulaire, nous avons posé la question du changement d'expression de ces récepteurs lors de l'entrée en quiescence des cellules souches cancéreuses isolées de glioblastomes. Certains RCPG pourraient-ils permettre l'établissement d'une signature caractérisant l'état de dormance ?

Pour réaliser cette étude, nous avons mis des cellules en quiescence au jour J_0. Comme mentionné dans l'introduction (paragraphe 1.3.3.3, page 32), la quiescence des cellules peut être induite de différentes manières. Nous avons choisi de les faire entrer en quiescence en les privant progressivement de facteurs de croissance et de nutriments. Ainsi, les cellules sont mises en culture au jour J_0 dans un milieu de culture complet, mais celui-ci n'est pas renouvelé le temps de l'expérience. Deux séries d'analyses ont été effectuées, l'une sur des cellules TG1 au passage 8 (série A) et l'autre sur les cellules TG1 au passage

23 (série B). Afin de suivre l'évolution de l'expression des RCPG et des gènes de ménage (*housekeeping genes*), des cellules sont prélevées à différents temps après la mise en quiescence (aux jours 2, 6, 7, 10, 11, 14, 15, 18, 19 et 23). L'expression des RCPG est analysée par RT-PCR quantitative et analysée selon la méthode précédemment décrite (paragraphe 3.2.1 page 93).

Sur les 356 RCPG présents sur les cartes RCPG TaqMan® Array Card d'Applied Biosystems™ présentées précédemment, 253 gènes ne sont pas exprimés au dessus du seuil fixé, dans la série A, et 223 gènes dans la série B. Cette différence d'expression est due au fait que la série B est légèrement plus bruitée que la série A et par conséquent, certains gènes non exprimés dans les cellules de la série A, semblent faiblement exprimés dans les cellules de la série B, à certains jours de prélèvements. Les résultats montrés ci-dessous sont une moyenne des résultats sur les séries A et B. Parmi les gènes exprimés dans les cellules TG pour les deux séries, la plupart des gènes sont relativement stables en fonction du nombre de jours de mise en quiescence. L'analyse met en évidence 14 gènes dont l'expression varie au cours de la mise en quiescence. De manière surprenante au premier abord, sur les 14 gènes dont l'expression varie de manière significative, 5 gènes sont des gènes de ménage (figure 39). Il s'agit de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), l'actine-β (ACTB), la grande sous-unité de l'ARN polymérase II ADN dépendante (POLR2A), la phophoglycérate kinase 1 (PGK1) et le récepteur de la transferrine (TFRC). Les 9 autres gènes sont des RCPG (figure 40). Il s'agit du récepteur B de la cholecystokinine (CCKBR), du récepteur thrombine-like (F2RL2), de frizzled 7 (FZD7), du récepteur histaminique H2 (HRH2), de la latrophiline 2 (LPHN2) et les récepteurs couplés aux protéines G : GPR, GPR30, GPR173 et GPRC5A.

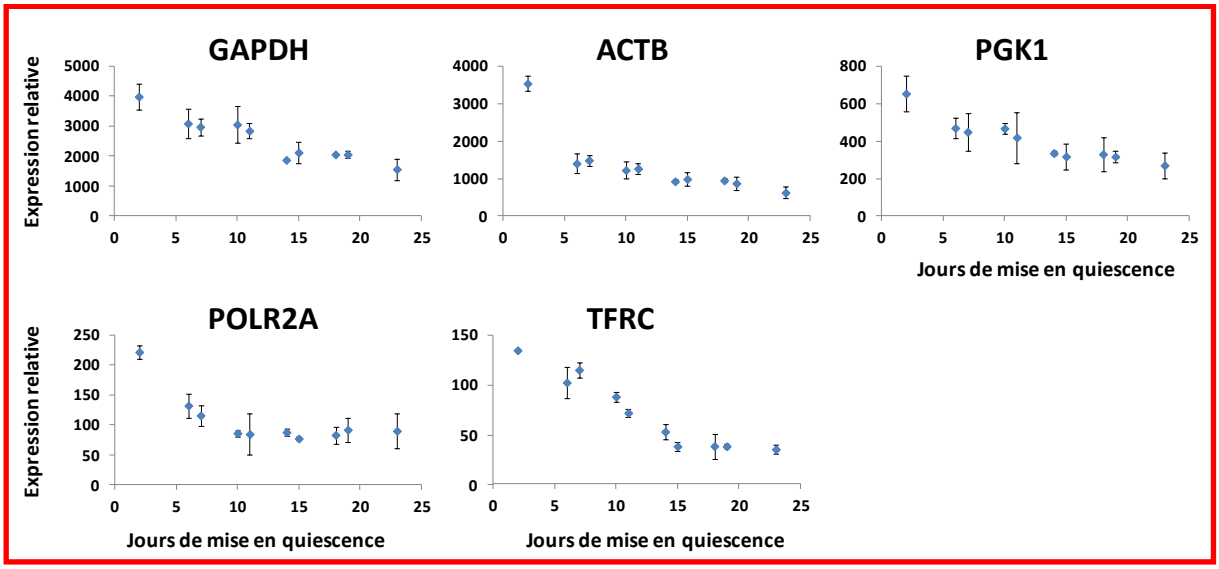


Figure 39 : Variation de l'expression des gènes de ménage en fonction du nombre de jours de mise en quiescence des cellules TG1.
Ces graphiques représentent la variation de l'expression relative de certains gènes de ménage dans les cellules TG1 en fonction du nombre de jours de mise en quiescence. L'expression des gènes est évaluée par RT-PCR quantitative. Les tests ont été effectués avec des cellules TG1 à passage 8 (série A) et à passage 23 (série B). L'expression du RCPG est exprimée relativement à la limite de détection fixée selon la formule : Expression relative = $2^{(31.5-\Delta Ct)}$ *où ΔCt représente la valeur du cycle seuil du RCPG normalisée par rapport au* Ct_{RPLP0} *et 31.5 est la limite de détection fixée (c'est-à-dire qu'un Ct de 31.5 donne une expression relative de 1).*
Abréviations : GAPDH, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; PGK1, phosphoglycérate kinase 1 ; POLR2A, grande sous-unité de l'ARN polymérase II ; TFRC, récepteur de la transferrine.

L'expression des 5 gènes de ménage diminue au cours de la mise en quiescence. La GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) est la plus exprimée 2 jours après la mise en quiescence (expression relative de 4000±100). Le niveau d'expression de la GAPDH diminue progressivement pour atteindre un niveau 2,5 fois plus bas en 15 jours de mise en quiescence (ou après 15 jours de non renouvellement du milieu de culture) (expression relative de 1600±400). La *GAPDH*, a souvent été considérée comme un simple gène de ménage impliqué dans la glycolyse. Or, en fonction de ses modifications post-transcriptionnelles, de son oligomérisation et des compartiments cellulaires où elle se trouve, la GAPDH a de multiples rôles aussi bien dans la réparation de l'ADN et l'export des ARN de transfert, la dynamique du cytosquelette et la mort cellulaire (Tristan et al., 2011).

La β-actine est aussi très exprimée au niveau des ARNm (expression relative de 3500±200 au 2ème jour de mise en quiescence) mais semble varier différemment. En effet, la β-actine voit son expression diminuer très rapidement pour atteindre un niveau presque 2

fois plus bas seulement 5 jours après la mise en quiescence des cellules TG1 (expression relative de 1450±200). L'expression de la β-actine continue encore sa diminution pour atteindre au 23ème jour de quiescence un niveau d'expression presque 6 fois inférieur à celui observé au 2ème jour après la mise en quiescence des cellules TG1 (expression relative de 600±150). La β-actine est un élément essentiel du cytosquelette, mais elle a aussi des implications dans l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription de l'ARN polymérase II (Zheng et al., 2009).

La PGK1 (phosphoglycérate kinase 1) intervient dans le métabolisme du glucose en pyruvate et en lactate. L'analyse de nos résultats montre que l'expression de la PGK1 diminue de presque 2,5 fois du 2ème au 23ème jour de mise en quiescence des cellules TG1 (l'expression relative passe de 650±100 à 270±70).

Le gène *POLR2A* code la grande sous-unité de l'ARN polymérase II. Son expression de base dans les cellules TG1 est moyenne comparée à l'expression de la GAPDH (expression relative de 220±10). L'expression de la POLR2A diminue d'abord brusquement au 5ème jour et se stabilise à environ 90 à partir du 10ème jour, où les cellules atteignent un niveau d'expression presque 2,5 fois plus faible que celui de départ.

Le gène *TFRC* code le récepteur de la transferrine. Il joue un rôle majeur dans l'homéostasie ferrique intracellulaire (Aisen, 2004). L'expression de base de TFRC est moyenne comparée à l'expression de la GAPDH dans les cellules TG1 (expression relative de 135±1), mais elle diminue de façon spectaculaire jusqu'à 3,75 fois par rapport à son niveau de départ en 23 jours après la mise en quiescence des cellules (expression relative de 36±5).

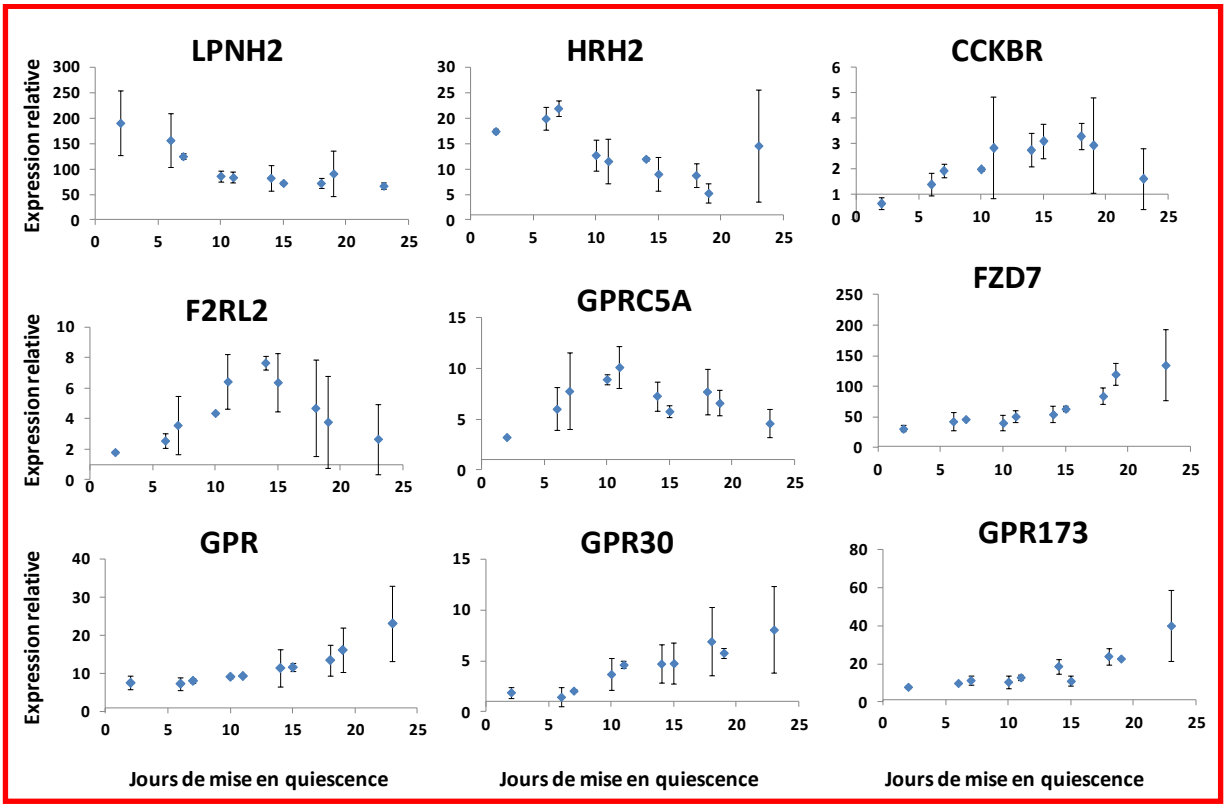


Figure 40 : Variation de l'expression des RCPG en fonction du nombre de jours de mise en quiescence des cellules TG1.

Ces graphiques représentent la variation de l'expression relative de certains gènes de récepteurs couplés aux protéines G, dans les cellules TG1, en fonction du nombre de jours de mise en quiescence. L'expression des gènes est évaluée par RT-PCR quantitative. Les tests ont été effectués avec des cellules TG1 à passage 8 (série A) et à passage 23 (série B). L'expression du RCPG est exprimée relativement à la limite de détection fixée selon la formule : Expression relative = $2^{(31.5-\Delta Ct)}$ *où* ΔCt *représente la valeur du cycle seuil du RCPG normalisée par rapport au* Ct_{RPLP0} *et 31.5 est la limite de détection fixée (c'est-à-dire qu'un Ct de 31.5 donne une expression relative de 1).*

Abréviations : CCKBR, récepteur à la cholecystokinine B ; F2RL2, récepteur thrombine-like ; FZD7, frizzled 7 ; GPRxx, récepteur xx couplé aux protéines G ; HRH2, récepteur histaminique H2 ; LPHN2, latrophiline 2.

Parmi les 9 RCPG dont l'expression varie au cours de la mise en quiescence des cellules TG1, certains ont, comme les gènes de ménage précédemment étudiés, une expression qui diminue au cours de la mise en quiescence (LPHN2 et HRH2). D'autres voient leur expression augmenter (GPR, GPR30 et GPR173), quand, dans le même temps, un troisième groupe de RCPG voit son expression augmenter puis diminuer au cours de la mise en quiescence (CCKBR, F2FRL et GPRC5A).

LPHN2 (latrophiline 2) est un RCPG ubiquitaire de la famille des latrophilines. LPHN2 jouerait un rôle dans les transitions épithélio-mésenchymateuses nécessaires pour le développement cardiaque durant l'embryogenèse (TEM de type 1) (Doyle et al., 2006).

LPHN2 est l'un des RCPG les plus exprimés dans les cellules TG1 (voir paragraphe 3.2.1.1). Son expression relative dans les cellules TG1 en prolifération est de 190±20. Elle diminue de moitié dans les cellules mises en quiescence pendant 20 jours (expression relative de 67±7). L'autre RCPG dont l'expression diminue au cours de la mise en quiescence est HRH2, le récepteur histaminique H2 dont l'expression relative passe de 20±1 dans les cellules à deux jours de prolifération, à 5±2 après 23 jours de mise en quiescence. Notons que ces deux RCPG ont été mis en évidence précédemment pour leur surexpression spécifique des cellules souches cancéreuses TG1 et OB1 (voir paragraphe 3.2.1.3 page 103).

Les trois RPCG dont l'expression augmente dans un premier temps puis diminue, n'ont pas été mis en évidence précédemment. Il s'agit de CCKBR, le récepteur de la cholecystokinine B qui a été décrit pour augmenter la croissance cellulaire de différentes lignées tumorales par une action autocrine et qui est exprimé dans le cerveau (Paillasse et al., 2009). Ce récepteur est exprimé en dessous de la limite de détection fixée après 2 jours de culture cellulaire (expression relative = 0,6±0,2). Il a une expression relative de 3,1±0,6 après 15 jours de mise en quiescence et son expression relative diminue jusqu'à 1,5±1 après 23 jours de mise en quiescence. Le deuxième RCPG qui se comporte de cette façon est F2RL2, le récepteur thrombine like. Peu de données de la littérature sont disponibles sur ce RCPG qui ne semble pas avoir d'implication dans la cancérisation ni dans la quiescence des cellules. Son expression relative est de 1,8±0,1 à 2 jours de mise en quiescence, augmente jusqu'à 7,7±0,4 au 14ème jour et diminue à 3,7±2 au 23ème jour de mise en quiescence. Enfin, le dernier RCPG concerné par ce comportement est GPRC5A, le récepteur couplé aux protéines G Famille C Classe 5 Membre A. Ce RCPG est un gène suppresseur de tumeur fréquemment délété dans les cancers du poumon (Chen et al., 2012). Il a une expression relative initiale de 3,2±0,1 qui augmente à 10,1±0,5 après 11 jour de mise en quiescence et qui diminue jusqu'à 4±1 au 23ème jour de mise en quiescence.

Les 4 autres RCPG qui varient de façon remarquable lors de la mise en quiescence des cellules sont FZD7, GPR, GPR30 et GPR173. Contrairement aux autres gènes décrits ci-dessus, ces 4 gènes augmentent leur expression lors du passage des cellules TG1 à l'état de dormance. FZD7 (frizzled7) est un RCPG de la famille des Frizzled qui interviennent dans la voie de signalisation de Wnt (site d'intégration « sans ailes »). La liaison de Wnt à Fzd mène à l'activation de Dsh (*dishevelled*). Cette activation conduit à l'expression de gènes typiquement impliqués dans le développement embryonnaire (Kemp et al., 2007). D'autre part, Fzd7 est connu pour avoir de fortes implications dans la progression tumorale notamment dans les tumeurs triple négatives du cancer du sein (Yang et al., 2011b), dans les carcinomes hépatocellulaires (Nambotin et al., 2011) et dans les cancers colorectaux (Ueno et al., 2009). Dans notre étude nous avons montré que l'expression de Fzd7

augmente jusqu'à 4 fois par rapport à son niveau basal après de 23 jours de mise en quiescence (l'expression relative passe de 31±5 à 130±60 du 2ème au 23ème jour de mise en quiescence).

GPR (aussi appelé GPR176) est peu connu dans la littérature et ne semble pas impliqué ni dans les cancers ni dans la quiescence des cellules. Son expression passe de 8±2 à 23±10 à la fin de la mise en quiescence.

GPR30 a récemment été identifié comme étant un récepteur des oestrogènes, impliqué dans les cancers du sein (Ruan et al., 2012). Son expression passe de 1,9±0,5 à 8±4 à la fin de la mise en quiescence.

Enfin, GPR173, aussi appelé SREB3 (récepteur 3 exprimé dans le cerveau et super conservé), est un RCPG orphelin mais c'est le plus conservé des membres de la famille des RCPG chez les vertébrés puisqu'il existe une homologie de 99% entre le GPR173 humain et le GPR173 des rongeurs. Des transcrits de GPR173 sont retrouvés dans le cerveau de rats et plus particulièrement au niveau du gyrus denté et du noyau supraoptique. De plus, GPR173 serait beaucoup plus exprimé dans le cerveau fœtal que dans le cerveau adulte (Matsumoto et al., 2005). Il est donc probable que GPR173 joue un rôle très important dans la fonction neurale des vertébrés. Nos observations montrent que GPR173, dont l'expression relative initiale est de 7,9±0,8, a une expression 5 fois plus importante après 23 jours de mise en quiescence des cellules (expression relative de 40±19).

3.3. Discussion de l'étude du transcriptome RCPG

Les RCPG sont des récepteurs-clés dans le fonctionnement des cellules, qu'elles soient dans leur état normal ou pathologique. Ce sont également des cibles de choix dans le traitement de diverses pathologies car ils traduisent un signal extracellulaire en signal intracellulaire. Dans le cadre de la théorie des cellules souches cancéreuses dans les glioblastomes, il semble donc important de mettre en évidence les RCPG qui peuvent être impliqués dans les différents états des cellules (état souche *vs*. différencié, état normal *vs*. cancéreux, état proliférant *vs*. quiescent). Pour cela, les transcriptomes des cellules souches cancéreuses de glioblastomes (TG1 et OB1) ont été comparés avec des cellules souches neurales normales fœtales (f-NSC), la lignée de glioblastome U-87 MG et des astrocytes humains (HA).

3.3.1. Identification de gènes spécifiques des différents types cellulaires

Le but de cette étude était d'identifier des RCPG spécifiquement exprimés dans certains types cellulaires, dont les CSC issues de glioblatomes (TG1 et OB1), les cellules souches neurales fœtales (f-NSC), la lignée cellulaire de glioblastomes (U-87 MG) et les astrocytes humains (HA). Nous avons pu identifier 21 gènes de RCPG surexprimés dans les cellules à caractère souche (TG1, OB1 et f-NSC) par rapport aux deux autres types cellulaires testés, 8 gènes RCPG surexprimés dans les cellules souches cancéreuses (TG1 et OB1) par rapport aux trois autres types cellulaires testés et un autre RCPG spécifiquement sous-exprimé dans les cellules TG1 et OB1 par rapport aux 3 autres types cellulaires testés. Les RCPG ressortant de notre analyse sont reliés à des fonctions métaboliques, des activités pro-angiogéniques, la prolifération cellulaire, la résistance à l'hypoxie, l'interaction avec le microenvironnement. Ces propriétés permettent justement à ces cellules souches cancéreuses de se développer dans un microenvironnement spécifique, créé par la tumeur et qui peut induire la mort des cellules neurales normales.

Le clustering hiérarchique montre que chaque type cellulaire semble avoir son propre sous-ensemble de gènes RCPG surexprimés par rapport aux autres types cellulaires testés. Ce clustering (figure 33) nous permet en plus, d'observer les degrés de proximité des différents types cellulaires. Ainsi, TG1 et OB1 sont très proches en termes d'expression des RCPG. De même pour HA et U-87 MG qui semblent exprimer un certain nombre de RCPG à des niveaux similaires. Les cellules f-NSC sont légèrement à part.

Cependant, ce clustering ne permet pas de bien mettre en avant les groupes de gènes surexprimés préférentiellement dans les cellules à caractère souche *vs.* les cellules différenciées, les cellules cancéreuses *vs.* les cellules saines et les cellules souches cancéreuses *vs.* les autres cellules. Pour cela, une analyse complémentaire plus détaillée a été réalisée.

Le premier RCPG qui ressort clairement de cette analyse est GPR56 car il fait partie des RCPG les plus exprimés dans les cellules TG1, OB1, U-87 MG et f-NSC (tableau 6) et n'est que très faiblement exprimé dans les astrocytes humains (expression relative de 1,2±0,1). GPR56 est une protéine membranaire de la famille des RCPG d'adhésion qui joue un rôle dans le développement cérébral, notamment dans la migration des progéniteurs neuraux où il est fortement exprimé (Luo et al., 2011). Nos observations, qui montrent que GPR56 est plus exprimé dans les f-NSC par rapport aux 4 autres types cellulaires testés, vont dans le sens de cette publication et laissent suggérer que GPR56 pourrait être un

biomarqueur des cellules souches neurales. GPR56 est également surexprimé dans les tumeurs et notamment les gliomes, comparé au tissu sain (Shashidhar et al., 2005). Dans les cellules de mélanome, GPR56 semble capable d'inhiber la production de VEGF, réduisant ainsi l'angiogenèse induite par les mélanomes (Yang et al., 2011a). D'autre part, la surexpression de GPR56 dans des cellules de mélanome est inversement proportionnelle au potentiel métastatique des cellules. En effet, les ARN messagers de GPR56 sont sous-exprimés dans des cellules de mélanomes hautement métastatiques par comparaison à des cellules de mélanome faiblement métastatiques et des expériences d'inhibition de GPR56 par siRNA provoque un accroissement de la tumeur et des métastases pour un modèle *in vivo* de mélanomes (Xu et al., 2006). Notre analyse montre que les cellules TG1 OB1 et U-87 MG (trois types de cellules tumorales) présentent des taux similaires d'ARNm de GPR56. Ces trois types cellulaires pourraient donc avoir un même potentiel métastatique.

GPR56 pourrait donc être un biomarqueur de l'état souche des cellules dans le cas de cellules saines. Il pourrait également être un biomarqueur du potentiel métastatique des cellules tumorales. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer le rôle de ce récepteur dans la physiopathologie des cellules cancéreuses qu'elles aient des propriétés souches ou non.

Des 21 RCPG surexprimés dans les cellules à caractère souche comparé aux autres types cellulaires, CXCR4 (récepteur 4 à motif C-X-C) semble le plus intéressant car il est déjà identifié comme une cible thérapeutique potentielle contre les glioblastomes. En effet, son implication dans le phénomène angiogénique en fait une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des cancers (Tseng et al., 2011). De plus, il a été montré qu'un antagoniste de CXCR4 (AMD 3100) inhibe la croissance des xénogreffes de glioblastomes *in vivo*, et la migration de cellules souches cancéreuses issues de glioblastome *in vitro* (Schulte et al., 2011). D'autre part, le même antagoniste a montré des actions inhibitrice sur la sécrétion de VEGF par les cellules souches cancéreuses de glioblastomes et a des actions inhibitrices de l'angiogenèse et de la croissance des xénogreffes des mêmes cellules (Ping et al., 2011). CXCR4 est également impliqué durant la régénération des tissus lésés. Il est exprimé à la surface des cellules souches et progéniteurs neuraux pour les guider jusqu'au site inflammatoire de la lésion qui génère un gradient de CXCL12, son ligand (Imitola et al., 2004). L'expression de CXCR4 ayant été démontrée dans les cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes, il n'est pas surprenant de trouver CXCR4 surexprimé dans les cellules TG1 et OB1.

Nos données montrent que CXCR4 est 2 à 3 fois plus exprimé dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome que dans les cellules souches neurales fœtales

normales et n'est pas exprimé dans les U-87 MG et dans les HA. CXCR4 est donc une cible thérapeutique intéressante dans le cadre des glioblastomes. La confirmation de l'absence d'expression de CXCR4 dans d'autres lignées cellulaires de glioblastomes et de l'expression de CXCR4 dans d'autres types de CSC pourrait faire de ce RCPG un bon biomarqueur du degré de différenciation des tumeurs, permettant ainsi de prédire l'agressivité de la tumeur.

Parmi les gènes surexprimés dans les CSC de glioblastome TG1 et OB1, *LPHN2*, *GPR37* et *HRH2* sont 3 RCPG qui ressortent de l'analyse détaillée.

LPHN2 (latrophiline 2, parfois appelé LPHH1 pour homologue 1 de la latrophiline) est un RCPG exprimé de manière ubiquitaire (Matsushita et al., 1999). Dans notre étude, LPHN2 est exprimé dans les 5 types cellulaires, mais ce RCPG est largement surexprimé dans les CSC TG1 et OB1. Cette surexpression spécifique de LPHN2 dans les CSC pourrait être liée avec le rôle de ce RCPG dans les transitions épithélio-mésenchymateuses (TEM). En effet, la perte du signal induit par LPHN2 pendant le processus de TEM inhibe la TEM dans un modèle *ex vivo* de tissu cardiaque de poulet (Doyle et al., 2006). Bien que LPHN2 ne soit pas exprimé exclusivement dans des cellules qui subissent une TEM, sa présence et sa voie de signalisation semblent requises dans le processus de transition épithélio-mésenchymateuse. Comme décrit dans le paragraphe 1.3.2 (introduction), des cellules cancéreuses de sein qui subissent une TEM de type 3 (TEM qui intervient dans les cellules cancéreuses) acquièrent des propriétés d'auto-renouvellement. Les TEM de type 3 peuvent donc ainsi induire un enrichissement d'une population de cellules cancéreuses en cellules souches cancéreuses (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). Bien que l'implication de LPHN2 dans les TEM ait été démontrée pour des TEM de type 1 (TEM ayant lieu durant le développement embryonnaire), les mécanismes sous-jacents aux TEM de type 1 et de type 3, sont susceptibles de faire appel aux mêmes voies de signalisation. Ainsi, la surexpression de LPHN2 dans les cellules souches cancéreuses pourrait être une caractéristique des cellules souches cancéreuses. La confirmation de la surexpression de LPHN2 dans d'autres cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes et d'autres cancers pourrait renforcer l'hypothèse de l'importance de LPHN2 pour les cellules souches cancéreuses. LPHN2 pourrait être un biomarqueur des cellules souches cancéreuses.

Les deux autres RCPG mis en évidence dans notre analyse sont GPR37 et HRH2. Ils sont exprimés à un niveau environ 10 fois inférieur à celui de LPHN2 dans les cellules TG1 et OB1. Le récepteur GPR37 est exprimé dans les oligodendrocytes et au niveau des neurones de l'hippocampe et des neurones dopaminergiques. Il est impliqué dans la maladie de Parkinson, où il est retrouvé dans les agrégats protéiques insolubles. Lorsqu'il est surexprimé dans les cellules, il semble être impliqué dans un processus autophagique

(Marazziti et al., 2009). La voie de signalisation de ce récepteur n'a jusqu'à présent jamais été impliquée dans un processus de cancérogenèse.

HRH2 est connu pour être impliqué dans les cancers notamment dans la prolifération des cellules cancéreuses (Wang et al., 2000) et dans l'activation du processus angiogénique (Ghosh et al., 2001). Ces propriétés d'action de HRH2 dans les cancers pourraient faire de ce récepteur une bonne cible thérapeutique. Cependant, plusieurs agonistes (amthamine, dimaprit, et 4-méthylhistamine) et antagonistes (cimétidine, zolantidine, ranitidine, burimamide, thiotidine et famotidine) spécifiques du récepteur histaminique H2 ont été testés sur la viabilité des cellules TG1 à 10µM et à 50µM. Aucun de ces composés ne semble capable de réduire ou d'augmenter la viabilité des cellules TG1 de manière significative (figure 41). Ces données semblent indiquer que le récepteur HRH2 n'est pas un bon candidat en tant que cible thérapeutique. Une absence d'effet antitumoral des antagonistes des récepteurs histaminiques H2 avait été observée sur des tumeurs murines (Bossa et al., 1983). Des investigations supplémentaires concernant l'expression de HRH2 dans d'autres types de CSC de glioblastomes et d'autres lignées cellulaires, mais aussi des études de signalisation impliquant ce récepteur sont indispensables à la compréhension du rôle de ce récepteur dans la pathologie cancéreuse.

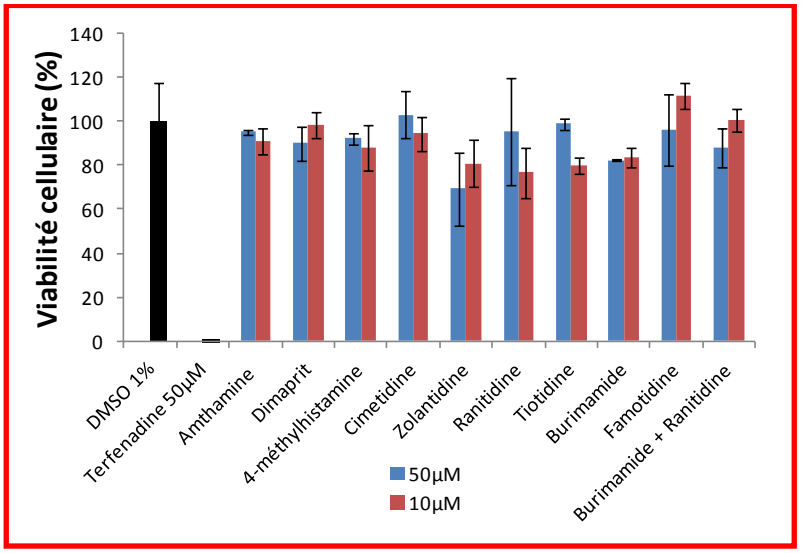


Figure 41 : Criblage de molécules agonistes et antagonistes du récepteur histaminique H2 sur les cellules TG1 proliférantes.
Cet histogramme représente l'effet des molécules agonistes (amthamine, dimaprit, 4-méthylhistamine) et antagonistes (cimétidine, zolantidine, ranitidine, thiotidine, burimamide et famotidine) spécifiques du récepteur HRH2 sur la viabilité des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes TG1 qui surexpriment ce récepteur. Chaque composé a été testé en triplicata à 10µM (en rouge) et à 50µM (en bleu). L'expérience a été réalisée une foisen triplicata, à l'aide du test Cell Titer Glo® (Promega). Les résultats sont normalisés en pourcentage par rapport au contrôle négatif (1% DMSO). La terfénadine à 50µM est utilisée comme contrôle positif.

Ces trois gènes surexprimés dans les cellules OB1 et TG1 sont des gènes qui sont situés sur des chromosomes présents en plusieurs copies dans les cellules TG1 (tableau 7). Cependant, d'autres gènes surexprimés dans ces cellules souches cancéreuses et notamment dans TG1 ne sont pas situés sur des chromosomes présents en plusieurs copies dans les cellules (exemple : EDG8 sur le chromosome 19 et GPR138 sur le chromosome 3). Des mécanismes de régulation de la transcription tels que la méthylation des promoteurs des gènes, pourraient empêcher certains gènes présents sur les chromosomes amplifiés, d'être exprimés. Inversement, des gènes présents sur des chromosomes non amplifiés pourraient être surexprimés.

Gène	Chromosome	Nombre de copie dans les cellules TG1
CALCRL	2q32.1	3
EDG8	19p13.2	2
GPR37	7q31	6
GPR73	2p14	3
GPR103	4q27	3
GPR128	3q12.2	2
HRH2	5q35.2	3
		↗ avec les passages (nos données SNP)
LPHN2	1p31.1	3

Tableau 7 : Position des gènes RCPG surexprimés dans les cellules souches cancéreuses TG1 et OB1 sur les chromosomes.
Les gènes des récepteurs couplés aux protéines G surexprimés dans les cellules TG1 et OB1. Le nombre de copie des chromosomes portant ces gènes est donné d'après la publication Patru et al., 2010.
Abréviations : CALCRL, récepteur à la calcitonine like ; EDG8, edge 8 (récepteur à la sphingosine-1-phosphate) ; GPRxx, récepteur couplé aux protéines G numéro xx ; HRH2, récepteur histaminique H2 ; LPHN2, latrophiline 2.

Cette analyse du transcriptome montre que plusieurs gènes sont surexprimés dans les cellules souches cancéreuses, les cellules à caractère souche, les cellules cancéreuses ou les cellules normales. Ainsi, il peut être envisagé qu'un type cellulaire ayant un profil d'expression similaire à ces cellules soit caractérisé comme étant des CSC ou des cellules à caractères souches ou encore des cellules cancéreuses. D'autre part, certains RCPG ont été décrits comme jouant un rôle dans des mécanismes intervenant lors de la tumorigenèse. Par exemple, HRH2 (Medina and Rivera, 2010) et EDG8 (Novgorodov et al., 2007), surexprimés dans les CSC (TG1 et OB1) ont été décrits pour intervenir dans la prolifération cellulaire.

HRH2 a également été décrit comme ayant une activité pro-angiogénique (Ghosh et al., 2001) tout comme CXCR4 (Terasaki et al., 2011), surexprimé dans les cellules à caractère souche (f-NSC, TG1 et OB1). EDNRB, surexprimé dans les cellules présentant des propriétés souches (f-NSC, TG1 et OB1), augmente l'apoptose et diminue la survie cellulaire (Egidy et al., 2000) alors que CNR1, surexprimé dans les cellules souches f-NSC, TG1 et OB1, induit une résistance des cellules à l'apoptose et augmente leur survie (Carracedo et al., 2006). CALCRL, surexprimé dans les CSC (TG1 et OB1), induit une résistance à l'apoptose et à l'hypoxie tumorale (Oehler et al., 2001). Enfin, HRH2 (Wang et al., 2010b), GPR103 (exprimé seulement dans les CSC TG1 et OB1) (Takayasu et al., 2006) et CNR1 (Zhuang et al., 2012) sont trois exemples de RCPG qui interviennent dans le métabolisme énergétique des cellules.

La co-expression de ces RCPG crée une combinaison de conditions favorables à la tumorigenèse. D'autres récepteurs membranaires tels que les récepteurs à tyrosine-kinase et des protéines cytoplasmiques prennent aussi part aux mécanismes de tumorigénisation et leur différence d'expression dans les 5 types cellulaires testés pourrait faire l'objet d'une étude.

3.3.2. Variation du transcriptome RCPG lors de la mise en quiescence des cellules TG1

Pour identifier des RCPG dont l'expression varie au cours de la mise en quiescence des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes (TG1), les cellules sont laissées en culture sans changer leur milieu. L'analyse effectuée n'a permis de mettre en évidence que peu de gènes dont l'expression varie lorsque les cellules sont privées de nutriments. En effet, sur les 381 gènes testés (356 RCPG et 25 autres gènes dont des gènes de ménage), 14 seulement sont affectés par la mise en quiescence des cellules. Sur ces 14 gènes, seuls 9 correspondent à des RCPG, les 5 autres sont considérés comme des gènes de ménage et sont souvent utilisés pour la normalisation dans les expériences de PCR quantitative.

GAPDH, *β-actine*, *PGK1*, *POLR2A* et *TFRC* sont les 5 gènes de ménage dont l'expression diminue au cours de la mise en quiescence des cellules. GAPDH et PGK1 sont connus pour leur implication dans le métabolisme énergétique. Ces deux gènes codent des enzymes clés, impliquées dans des étapes de production énergétique ($NADPH/H^+$ pour GAPDH et ATP pour PGK1 (figure 42)). La décroissance de l'ARN messager codant ces deux gènes semble être linéaire en fonction des jours de mise en quiescence. PGK1 est une enzyme dont l'expression est induite par différents facteurs et notamment pat l'hypoxie et le facteur HIF1α (Luo et al., 2006; Marin-Hernandez et al., 2009). Une augmentation de

l'expression de cette enzyme a été rapporté dans plusieurs types de cellules cancéreuses (Hwang et al., 2006; Wang et al., 2010a). Le niveau d'expression de PGK1 semble être relié à la capacité proliférative des cellules (Wang et al., 2010a). Dans notre étude, PGK1 est fortement exprimé quel que soit le type cellulaire étudié. Cependant l'expression de PGK1 dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome TG1 et OB1 en prolifération est trois fois plus élevée que son expression dans les cellules souches f-NSC et les astrocytes et deux fois plus élevés que dans les cellules de glioblastome U-87 MG. L'entrée en quiescence des cellules TG1 ramène le niveau d'expression de PGK1 à un niveau proche de celui trouvé dans les cellules non cancéreuses. Le gène codant PGK1 se trouve sur le chromosome X en Xq13.3. La protéine a aussi été décrite comme co-facteur de l'ADN polymérase α eucaryote (http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PGK1), mais cette propriété de PGK1 n'est pas décrite dans la littérature.

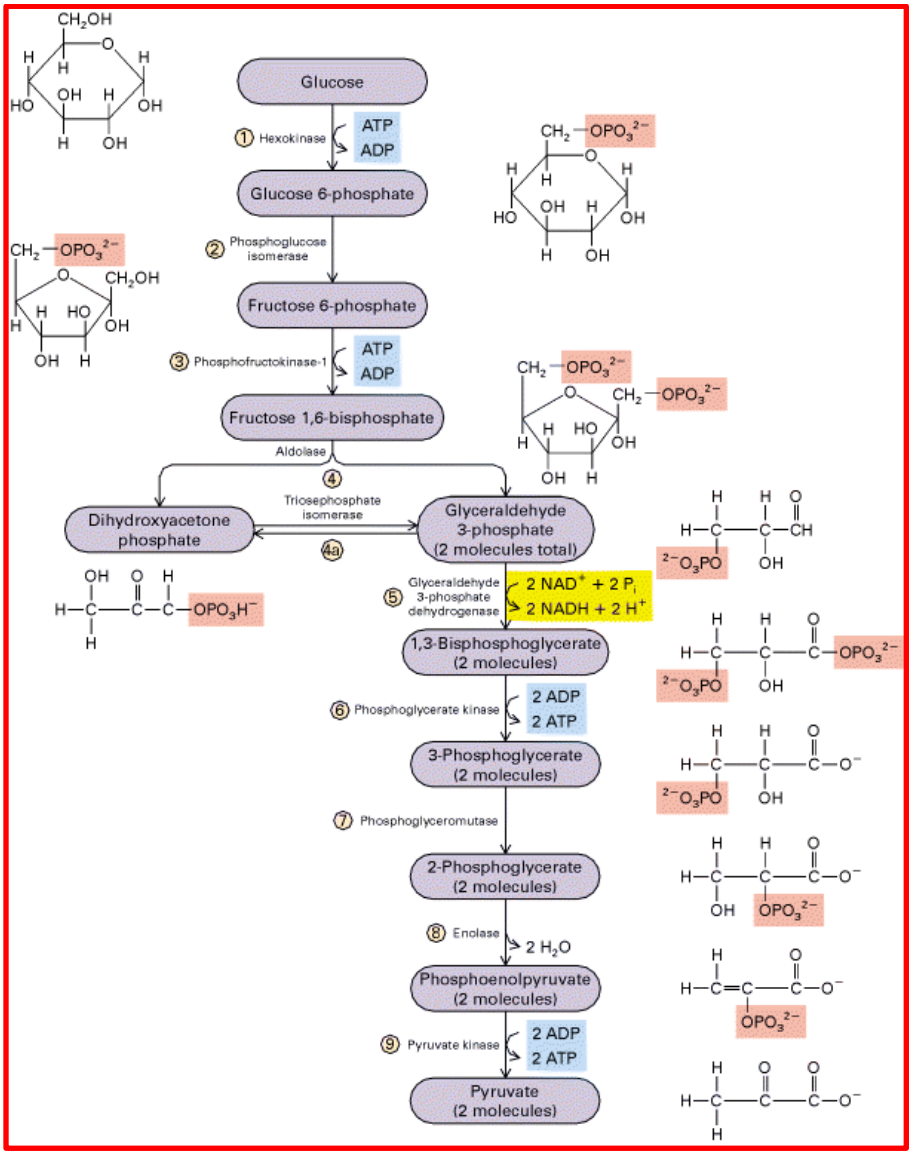


Figure 42 : Schéma de la glycolyse.

La glycolyse, ou fermentation, est un processus de destruction du glucose qui a lieu dans le cytoplasme aussi bien en l'absence d'oxygène (anaérobie) qu'en sa présence (aérobie). La glycolyse est une série de réactions au cours desquelles une molécule de glucose est décomposée en deux molécules de pyruvate. Au point de vue énergétique, la glycolyse consomme deux molécules d'ATP par molécule de glucose, mais en fournit quatre. Dans cette cascade réactionnelle, GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, enzyme n°5 sur le schéma) et PGK1 (phosphoglycérate kinase 1, enzyme n°6 sur le schéma) interviennent pour produire respectivement 2 molécules de NADPH à partir de glycéraldéhyde-3-phosphate, et 2 molécules d'ATP à partir de 1,3-bisphosphoglycérate.

GAPDH, dont le gène est situé en 12p13, est une enzyme glycolytique se situant dans la cascade de dégradation du glucose juste en amont de PGK1 (figure 42). Cependant GAPDH est une protéine multifonctionnelle présentant des fonctions différentes de celles pour laquelle elle est connue. Ainsi elle participe au métabolisme du fer, puisqu'elle est capable de jouer le même rôle que le récepteur de la transferrine et d'interagir avec la

transferrine (Kumar et al., 2012), au trafic membranaire, la biosynthèse d'histones, la maintenance de l'intégrité de l'ADN et la signalisation cellulaire *via* des récepteurs. Sa localisation cellulaire est multiple et peut être réorganisée en fonction des stimuli cellulaires (Sirover, 2012). Dans la levure, la protéine interagit avec Rpb7, une des sous-unités de l'ARN polymérase II et de ce fait participe à la transcription (Mitsuzawa et al., 2005). Dans des cellules HCT116, une lignée cellulaire de carcinome du colon humain, une surexpression de GAPDH induit une augmentation du nombre de mitoses et une accélération du cycle cellulaire (Carujo et al., 2006). Le niveau d'expression de GAPDH est élevé dans tous les types cellulaires testés dans notre étude et similaire à celui de PGK1. Comme pour PGK1, il est plus élevé dans les cellules souches cancéreuses que dans les cellules f-NSC, les astrocytes humains et les cellules U-87 MG (de 2 à 4 fois). L'entrée en quiescence des cellules TG1 se traduit par une diminution progressive de son taux d'ARN messager.

La diminution du taux d'ARN messager de PGK1 et GAPDH se fait de manière quasi-linéaire en fonction du nombre de jour de mise en quiescence. L'analyse de la figure 39, montre deux autres gènes de ménage dont le taux d'ARN messager diminue avec une cinétique comparable. Il s'agit de la β-actine de la sous-unité A de l'ARN polymérase II. Ici, la diminution du taux d'ARN messager est rapide dès les premiers jours de mise en quiescence, puis elle décroit plus lentement.

Dans une cellule, l'actine dont le gène se trouve sur le chromosome 7 (7p22) peut exister sous forme polymérisée (F-actine) ou sous forme monomère (G-actine). La β-actine joue un rôle important dans l'organisation du cytosquelette des cellules non-musculaires. Elle se trouve dans le cytoplasme et le noyau cellulaire. Il est connu depuis plusieurs décennies, que le niveau d'expression de la β-actine augmente, lorsque des cellules en état de dormance (par privation de sérum), entrent en prolifération (Ide et al., 1986; Riddle et al., 1979). Cette augmentation semble être transitoire et elle est marquée lors du passage de la phase G0 à la phase S. La synthèse d'actine précède la synthèse d'ADN (Riddle and Pardee, 1980). Plus récemment (Spencer et al., 2011) il a été montré un rôle régulateur important de la β-actine nucléaire dans le contrôle entre prolifération et quiescence. Dans des cellules murines scP2 d'épithélium mammaire, la privation de nutriments et de sérum induit une entrée en quiescence des cellules (mesurée par l'incorporation de BrdU). La concentration globale d'actine cellulaire diminue dans les 4 heures suivant la déplétion en sérum et en facteur de croissance. Un phénomène similaire est observé lorsque la quiescence est induite par l'addition de laminine III (LN1), un composant de la matrice

extracellulaire. L'actine nucléaire semble jouer un rôle fondamental dans le contrôle de la transcription et dans les cellules scP2, elle colocalise avec les foci de transcription. L'actine nucléaire interagit avec les ARN polymérases de cellules de mammifères et elle est nécessaire à l'interaction de l'ARN polymérase II avec le complexe de remodelage de la chromatine et d'une manière générale est importante dans la transcription des gènes ARN polymérase II dépendante (Kukalev et al., 2005).

L'actine est une protéine dont la ½ vie de l'ARNm est relativement courte (de l'ordre de 5-6h (Leclerc et al., 2002)). On peut donc penser que la diminution du taux d'actine rapportée dans la littérature lors de l'entrée en quiescence des cellules est reliée à une diminution de sa transcription. Dans notre étude, nous observons une diminution du taux de mARN codant la b-actine. Cette diminution est marquée entre le 2ème et le 6ème jour de mise en quiescence des cellules (nous n'avons pas réalisé les mesures à J0 et J1), puis la décroissance continue entre le 6ème et le 25ème jour avec une amplitude plus faible. Une décroissance similaire est observée pour l'ARN messager codant la sous-unité A de l'ARN polymérase II (figure 39). La figure 43 présente les variations du taux de β-actine et de la sous-unité A de l'ARN polymérase II en relation avec la cinétique d'entrée en quiescence. Les mesures ont été effectuées à des intervalles de temps qui ne nous permettent pas de suivre la chronologie des évènements avec précision. Néanmoins elle montre que l'entrée en quiescence des cellules induites par le non-renouvellement du milieu de culture, se traduit par une diminution du taux d'ARNm de protéines impliquées dans la transcription. Il est à noter que la sous-unité A de l'ARN polymérase renferme la partie CTD terminale de l'ARN polymérase II qui est le siège de multiples régulations de la machinerie transcriptionnelle eucaryote. L'ARN messager codant la β-actine est exprimé à un niveau équivalent dans tous les types cellulaires en prolifération testés, que ce soient des cellules cancéreuses ou non, qu'elles soient souches ou non. Sa décroissance semble ainsi être liée de manière assez spécifique à la quiescence cellulaire. L'ARNm codant la sous-unité A de l'ARN polymérase II est par contre sensible à d'autres facteurs que la quiescence, puisque son niveau varie en fonction du type cellulaire (TG1 > f-NSC > astrocytes > U87-MG).

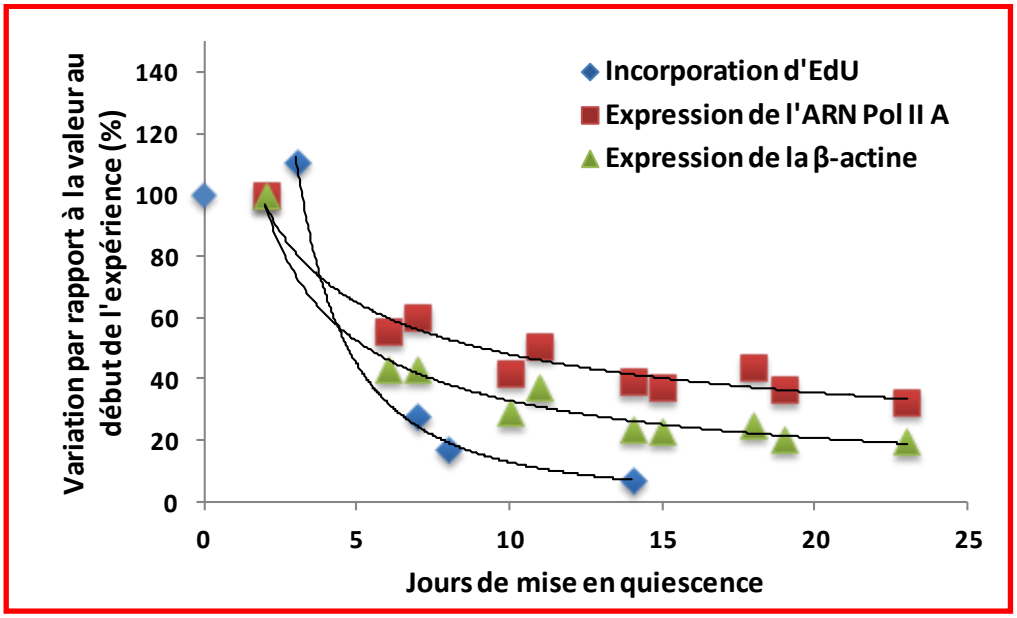


Figure 43 : Variations du taux de β-actine et de la sous-unité A de l'ARN polymérase II en relation avec la cinétique d'entrée en quiescence des cellules TG1.
Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport à la valeur mesurée au début de l'expérience.
Abréviations : EdU, 5-éthynyl-2-déoxyuridine ; ARN Pol II A, sous-unité A de l'ARN polymérase II.

Le 5ème gène de ménage qui voit son taux diminuer en fonction de la mise en quiescence des cellules TG1 est le récepteur 1 de la transferrine (TRFC). Ce récepteur membranaire permet la capture du fer transportée par la transferrine. Le fer est important dans la prolifération cellulaire. Il intervient dans de nombreux systèmes rédox, mais notamment dans la réduction des ribonucléotides en désoxyribonucléotides par la ribonucléotide réductase. Le niveau d'expression de ce récepteur semble légèrement plus élevé dans les cellules souches et les cellules cancéreuses par rapport aux astrocytes. L'expression du gène TRFC est sous contrôle du facteur HIF-1α et peut être induit par l'hypoxie. Cependant nous avons vu précédemment que la capture du fer peut-être réalisée par un mécanisme impliquant la GAPDH. Il est intéressant de noter que les taux de deux ARNm codant des protéines impliquées dans la capture du fer sont diminués par l'entrée en quiescence des cellules TG1.

Ainsi, la réduction de l'activité métabolique d'une cellule en quiescence se traduit non seulement par une diminution de son taux d'ATP (nous avons noté une diminution de 25% environ), mais aussi par la réduction de l'ARN messager de certains gènes de ménage. Il serait intéressant d'étudier la mise en place de ces mécanismes régulateurs et déterminer si ces différents gènes sont co-régulés par un régulateur commun ou s'il existe un phénomène d'épistasie où la modification de l'expression d'un gène influe sur l'expression d'un ou

plusieurs autres gènes. L'ARNm codant la β-actine semble le plus spécifiquement affecté par l'entrée en quiescence des cellules.

En parallèle, nous avons identifié 9 RCPG dont la variation de l'expression pourrait être corrélée avec l'état de quiescence des cellules souches cancéreuses. HRH2 et LPHN2 sont les RCPG dont l'expression diminue au cours de la mise en quiescence des cellules. HRH2 est le récepteur histaminique H2 (discuté page 112) et LPHN2, la latrophiline 2, est un RCPG de la classe des molécules d'adhésion, discuté précédemment (voir page 111). Ce RCPG est l'un des plus exprimé dans les cellules étudiées, mais avec le taux d'expression le plus élevé dans les cellules TG1 et OB1. Lors de l'entrée des cellules en quiescence, le taux d'expression de HRH2 et LPHN2 diminue pour atteindre un niveau respectivement 4 et 3 fois plus bas au 16ème jour de mise en quiescence.

L'expression de CCKBR, F2RL2 et GPRC5A augmente au début de la mise en quiescence, jusqu'au 14ème jour environ et diminue ensuite. Peu de données sont disponibles pour F2RL2 qui ne semble pas impliqué dans la cancérogenèse ni dans la quiescence des cellules. Cependant, CCKBR qui a pour effet d'augmenter la croissance tumorale *via* un mécanisme autocrine (Paillasse et al., 2009), et GPRC5A qui est un gène suppresseur de tumeur dans les cancers du poumon (Chen et al., 2012) ont un comportement similaire lors de la mise en quiescence des cellules TG1. Ces trois gènes peuvent s'avérer nécessaires pour enclencher le mécanisme de quiescence des cellules.

L'expression des 4 autres RCPG, GPR, GPR30, GPR173 et FZD7 augmente lors de la mise en quiescence des cellules. GPR173 fait partie de la sous-famille des RCPG SREB (*superconserved receptors expressed in brain*) comprenant SREB1 (GPR27), SREB2 (GPR85) et SREB3 (GPR173), localisés respectivement sur les chromosomes 3p21-p14, 7q31 and Xp11. Ces récepteurs sont spécifiquement exprimés dans le système nerveux central dans des régions impliquées dans la plasticité neurale (hippocampe, noyaux paraventriculaires, le système olfactif et supraoptique (Matsumoto et al., 2005). Pour l'instant les 3 récepteurs restent orphelins et la littérature pour ces gènes est très limitée (2 publications).

FZD7 fait partie de la famille des récepteurs Frizzled liant les protéines Wnt. Des études récentes montrent que FZD7 est le récepteur frizzled le plus surexprimé dans les cellules tumorales de cancer du colon (King et al., 2012). Il joue un rôle dans le développement et la progression tumorale et dans la biologie des cellules souches. Il est exprimé dans une population cellulaire enrichie en cellules souches cancéreuses dans les tumeurs de Wilms (Pode-Shakked et al., 2011), et il pourrait être impliqué dans le passage des cellules souches cancéreuses d'un état proliférant à un état quiescent. Les études

relatives à ce RCPG et à ses ligands Wnt3 et 11 concernent essentiellement les cancers du colon et mammaire. Il a été rapporté que ce récepteur pourrait constituer avec la voie de signalisation Wnt/β-caténine une cible dans les thérapies anticancéreuses (King et al., 2012). Dans les cellules TG1, le taux d'ARNm augmente graduellement. Au 23ème jour, ce taux est de 3,5 et 4 fois celui mesuré au début de l'expérience. Néanmoins, contrairement aux données de la littérature, FZD7 n'est pas surexprimé dans les cellules souches cancéreuses TG1 et non cancéreuses f-NSC par rapport à son expression dans les astrocytes.

En conclusion, la mise en quiescence des cellules souches cancéreuses TG1 ne conduit pas à des changements drastiques du transcriptome RCPG. Au total, 14 gènes, dont 5 gènes de ménage, ont une expression qui varie au cours de la mise en quiescence des cellules. Sept entités voient leur niveau d'ARNm diminuer (les cinq gènes correspondant à des gènes de ménage plus deux RCPG dont l'un est relié au métabolisme énergétique (bien que sa fonction au niveau cellulaire ne soit pas connue). Parmi les gènes de ménage, l'actine β et la sous-unité A de l'ARN polymérase II sont affectées de manière marquée dès les premiers jours de mise en quiescence et les profils de décroissance de leur ARNm se superposent. Compte tenu de la diminution de l'activité métabolique observée dans les cellules quiescentes, il n'est pas surprenant de voir une diminution dans le taux d'ARNm codant des protéines impliquées dans la production énergétique ou dans la transcription. Néanmoins, nous n'avons pas à ce stade de notre étude d'informations sur l'expression au niveau protéique, ni au niveau de l'activité enzymatique pour les enzymes. La mise en quiescence pourrait aussi s'accompagner de relocalisation de certaines protéines multifonctionnelles comme la GAPDH ou la β-actine. Cependant, des études menées sur des cellules non cancéreuses pouvant entrer en quiescence semble indiquer que la quiescence ne correspond pas uniquement à un ralentissement de l'activité cellulaire, avec ralentissement de la phase G1 (Coller, 2011; Coller et al., 2006; Liu et al., 2007), mais correspond à un véritable état de la cellule, dans lequel certains gènes permettant la survie de la cellule, sont activés. Dans cette optique, l'observation d'une augmentation transitoire de 3 RCPG et d'une augmentation du niveau d'expression de 4 autres RCPG mérite d'être signalée. Ces 4 récepteurs et notamment GPR173, un récepteur orphelin d'une famille de RCPG exprimés préférentiellement dans le cerveau et les organes génitaux et uniquement chez les vertébrés pourraient être intéressants dans des études futures. Enfin, il serait intéressant d'analyser le transcriptome des autres cellules que nous avons en culture (OB1 et TG16) lors de leur mise en quiescence afin d'émettre l'hypothèse que les résultats obtenus sont généralisables à toutes les CSC de glioblastomes et d'autres tumeurs.

3.4. Conclusions et perspectives

L'étude du transcriptome RCPG des cellules TG1 lors de leur mise en quiescence et celui des cellules OB1, f-NSC, de la lignée U-87 MG et des astrocytes humains a permis de mettre en évidence plusieurs gènes dont l'expression pourrait être relié à l'état physiopathologique des CSC (prolifération ou quiescence). Cette étude révèle des cibles potentielles pour le traitement des glioblastomes. Elle a aussi mis en lumière des gènes préférentiellement exprimés dans un type cellulaire plutôt qu'un autre. Ces gènes pourront servir de biomarqueurs, mais c'est vraisemblablement un ensemble de plusieurs gènes surexprimés dans un type cellulaire qui pourrait caractériser un type cellulaire donné. Ce profil d'expression des gènes constituerait une signature qui pourrait être utilisée dans la progression de la compréhension du fonctionnement cellulaire de l'état physiopathologique des glioblastomes.

Cette étude du profil d'expression des transcrits ARN de RCPG dans les CSC (TG1 et OB1), les f-NSC, la lignée de glioblastome U-87 MG et les astrocytes humains, doit être confirmée au niveau protéique. L'analyse du protéome membranaire des cellules TG1 par spectrométrie de masse est en cours. Elle se heurte à la faible expression des RCPG et ne permettra de valider qu'un petit nombre de récepteurs fortement exprimés. Des études basées sur l'utilisation d'anticorps pourront être mises en place, mais elles nécessitent une caractérisation préalable des anticorps utilisés pour éviter la révélation des « off-target ». Cette étude ne constitue qu'une première étape visant à analyser la participation d'un ensemble de gènes à une pathologie. De nombreux travaux sont encore nécessaires pour établir les réseaux de régulations mis en place et permettant le maintien et le développement dans l'organisme de cellules anormales, douées de propriétés leur permettant de générer un nouvel organe avec ses propres spécificités métaboliques.

RECHERCHE DE MOLECULES

ACTIVES SUR LES

CELLULES SOUCHES CANCEREUSES

DE GLIOBLASTOMES

4. Recherche de molécules actives sur les cellules souches cancéreuses de glioblastomes

"The most fruitful basis for the discovery of a new drug is to start with an old drug."

Sir James W. Black, Prix Nobel de Médecine et Physiologie, 1988

Les cellules souches cancéreuses sont particulièrement résistantes aux chimiothérapies et radiothérapies classiquement utilisées dans le traitement des glioblastomes et autres cancers. Elles seraient également responsables des reprises de la croissance tumorale après traitements par chimiothérapie et radiothérapie (voir introduction paragraphe 30). Il semble donc important de trouver des molécules capables d'inhiber la prolifération et/ou d'induire la différenciation des cellules souches cancéreuses afin de les rendre sensibles aux traitements administrés. Ces molécules pourront également permettre de comprendre la physiopathologie des cellules en donnant des indications sur les voies de signalisation qui régissent les fonctions essentielles à la survie et à la prolifération de ces cellules.

Afin de trouver des molécules capables d'inhiber la prolifération (ou l'activité métabolique) des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes, nous avons entrepris de cribler la chimiothèque *Prestwick Chemical Library®* sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. La stratégie du criblage repose sur un test basé sur la mesure de la quantité d'ATP présent dans les puits de la plaque contenant les cellules traitées. Les cellules vivantes contiennent de l'ATP. La mort cellulaire s'accompagne d'une hydrolyse de l'ATP cellulaire. La diminution de la quantité d'ATP dans un puits lors d'un criblage peut donc résulter soit de la mort des cellules, soit de l'action d'un composé sur l'activité métabolique des cellules, réduisant le taux d'ATP. Un composé empêchant la cellule de fabriquer de l'ATP peut soit être cytotoxique, auquel cas, la cellule meurt, soit être cytostatique, auquel cas la cellule ne peut plus proliférer tant que le composé est présent, mais elle peut reprendre sa prolifération dès le retrait de ce composé.

Un premier criblage (criblage primaire) a été réalisé sur toutes les molécules de la chimiothèque Prestwick®. Ceci a permis d'identifier des molécules actives sur les cellules souches cancéreuses de glioblastomes TG1. Ces molécules actives sont appelées des touches ou des « hits ». Un second criblage (criblage secondaire) permet ensuite de confirmer l'effet des touches issues du criblage primaire sur les cellules TG1. Les touches

confirmées lors de ce criblage secondaire sont ensuite testées en effectuant des courbes dose-réponse sur les cellules TG1 et sur les autres cellules souches cancéreuses isolées de glioblastomes de deux patients : OB1 et TG16, ainsi que sur les cellules souches neurales fœtales humaines (f-NSC), la lignée cellulaire de glioblastome (U-87 MG), la lignée cellulaire de rein embryonnaire humain (HEK 293) et une lignée primaire d'astrocytes humains (HA). Les courbes dose-réponse des molécules sur chacun des types cellulaires cités peuvent être trouvée en annexe. Ces tests permettent d'évaluer, la spécificité des molécules pour les cellules souches issues de glioblastomes.

4.1. Criblage primaire de la chimiothèque Prestwick®

Il existe différentes approches qui mènent à la découverte de nouveaux médicaments. La première est le criblage systématique d'un ensemble de composés choisis pour leur diversité pharmacologique. La deuxième est la modification de molécules actives existantes en vue d'améliorer les effets de ces molécules. La troisième est l'exploitation rétroactive (méta-analyse) d'observations biologiques ou médicales de l'effet d'un composé utilisé pour le traitement d'une autre pathologie. Enfin, la dernière est le design de molécules basé sur la connaissance des causes moléculaires d'une pathologie, après identification de cibles thérapeutiques liées à la pathologie et après validation thérapeutique de la cible. Ces quatre approches ne sont pas mutuellement exclusives et plusieurs approches peuvent être combinées. Notre stratégie dans la découverte de molécules actives sur les cellules souches cancéreuses de glioblastomes est basée sur l'approche dite « SOSA » (optimisation sélective des effets secondaires). Cette approche consiste à tester des « vieilles » molécules sur des « nouvelles » cibles pharmacologiques et nécessite une chimiothèque constituée d'un nombre limité de molécules très variées d'un point de vue structurel et fonctionnel, de toxicité et de biodisponibilité connues pour l'Homme (Wermuth, 2004; Wermuth, 2008).

La chimiothèque *Prestwick Chemical Library*® que nous avons criblée sur les cellules TG1 est une chimiothèque qui remplit ces conditions. Les 1120 molécules qui la composent sont des médicaments déjà commercialisés qui présentent une diversité pharmacologique et chimique importante afin d'augmenter la probabilité d'avoir des touches lors du criblage. Les molécules qui composent la chimiothèque sont également choisies en fonction de leur biodisponibilité, et leurs effets secondaires chez l'Homme sont connus. L'intérêt de cette chimiothèque est que les hits sont des candidats-médicaments potentiels pouvant passer plus rapidement aux essais cliniques de phase I chez l'Homme.

Le criblage primaire a été réalisé sur les cellules TG1 en prolifération à passage 14 et en quiescence à passage 10 sur la plateforme de criblage PCBIS (UMS 3286). La durée de mise en quiescence des cellules dites quiescentes est de 16 jours (= Q16). Pour toutes les expériences, chaque puits d'une plaque 96 puits contenait 30000 cellules TG1 proliférantes ou 40000 cellules TG1 quiescentes. Le contrôle positif, déterminé lors de la mise au point, est l'Ophioboline A qui, à 50µM et 24h d'incubation, induit la mort des cellules. Le contrôle négatif est donné par 1% de DMSO (diméthylsulfoxide) final, car tous les composés de la chimiothèque Prestwick sont dissous dans le DMSO. Lors des expériences de criblage et de courbes dose-réponse, le pourcentage de DMSO de chaque puits est fixé à 1%.

Lors du criblage primaire, les composés de la chimiothèque Prestwick ont été testés une seule fois, à 50µM, sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence (voir matériels et méthodes paragraphe 6.6.2). Après 24 heures d'incubation des cellules en présence des composés de la chimiothèque Prestwick, l'effet du composé est évalué par luminescence grâce au test Cell Titer-Glo® (Promega).

A la lecture des résultats, trois possibilités se présentent :

- La luminescence d'un puits contenant des cellules incubées avec un composé A est égale à celle des puits contenant les cellules incubées avec 1% de DMSO (contrôle négatif). Le taux d'ATP est donc identique dans les cellules incubées avec le composé A et dans les cellules contrôles : le composé A n'aurait pas d'effet cytotoxique sur les cellules testées. Il peut cependant, y avoir un effet cytostatique.
- La luminescence d'un puits contenant des cellules incubées avec un composé B est inférieure à celle d'un puits contenant les cellules incubées avec 1% de DMSO (contrôle négatif). Le taux d'ATP dans les cellules incubées avec le composé B est inférieur à celui des cellules contrôles : le composé B peut avoir un effet sur le métabolisme des cellules testées ou être cytotoxique pour les cellules testées.
- La luminescence d'un puits contenant des cellules incubées avec un composé C est supérieure à celle d'un puits contenant les cellules incubées avec 1% de DMSO (contrôle négatif). Le taux d'ATP dans les cellules incubées avec le composé C est supérieur à celui des cellules contrôles : le composé C peut avoir un effet hyperprolifératif sur les cellules testées, ou un effet sur le métabolisme en augmentant la production d'ATP des cellules testées.

Pour le criblage primaire, 2 règles définissent les touches. Une molécule est définie comme une touche si :

⇒ Le composé fait varier la luminescence totale dans un puits de plus de **cinq** fois l'écart-type du contrôle négatif (1% DMSO sans composé) par rapport à la moyenne du contrôle négatif

⇒ Le composé abaisse à moins de 5%, le pourcentage de survie cellulaire calculé par rapport au contrôle négatif.

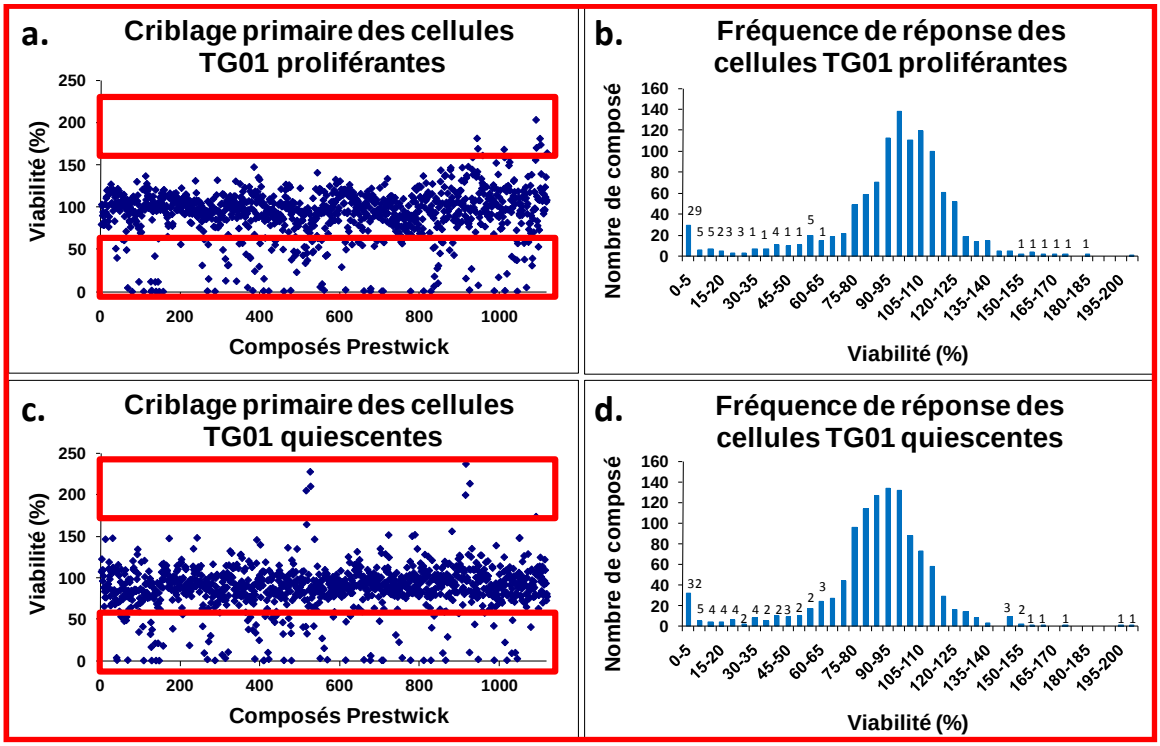


Figure 44 : Résultats du criblage primaire de la chimiothèque Prestwick® sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence.

Les graphiques a. et b. sont les représentations des résultats du criblage de la chimiothèque Prestwick® sur les cellules TG1 en prolifération. Les graphiques c. et d. sont les représentations des résultats du criblage de la chimiothèque Prestwick® sur les cellules TG1 en quiescence.

Dans les graphiques a. et c., chaque point représente le pourcentage de viabilité des cellules TG1, après traitement par l'une des 1120 molécules de la chimiothèque Prestwick®.

Les histogrammes b. et d. représentent le nombre de composés ayant une activité sur les cellules souches cancéreuses par tranche de 5% de viabilité cellulaire. Les chiffres indiqués au dessus de chaque barre indiquent le nombre de molécules actives sur les cellules souches cancéreuses TG1.

Les zones des graphiques encadrées en rouge contiennent des touches qui sont définies selon deux règles : 1- le composé fait varier la luminescence totale dans un puits de plus ou moins cinq fois l'écart-type du contrôle négatif (1% DMSO sans composé) par rapport à la moyenne du contrôle négatif, 2- le composé abaisse le pourcentage de survie cellulaire calculé par rapport au contrôle négatif à moins de 5%.

La reproductibilité de la mesure de chaque plaque est évaluée par le calcul du z' (voir chapitre matériels et méthodes paragraphe 6.6.2.4). Dans nos expériences, le facteur z' est fortement corrélé à l'homogénéité de la distribution des cellules dans les puits de la plaque. Une valeur de z' proche de 1 indique une plaque où tous les puits contrôles contiennent le même nombre de cellules. Une valeur proche de 0, est un indicateur de problèmes de répartition des cellules dans les puits contrôles et donc probablement dans l'ensemble des puits de la plaque. Dans nos travaux sur les cellules TG1, cette hétérogénéité dans la répartition est liée à la difficulté de dissociation des cellules qui, dans les conditions utilisées, poussent en neurosphères. La persistance d'agrégats lors de la répartition des cellules dans les puits peut être un facteur responsable de faibles valeurs du z'. Pour nos analyses, nous nous sommes fixé des valeurs de z' ≥ 0,5. Cette condition étant remplie pour l'ensemble des plaques du criblage primaire, toutes les plaques ont été analysées. Les résultats (figure 44) mettent en évidence 86 molécules actives sur les cellules TG1. Parmi ces 86 molécules testées à 50µM, 37 sont actives à la fois sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence (Q16), 20 molécules semblent avoir une action plus spécifique sur les cellules TG1 en prolifération, c'est-à-dire que les molécules sont considérées comme des touches, seulement pour les cellules en prolifération. De même, 32 molécules semblent avoir une action plus spécifique sur des cellules TG1 en quiescence (Q16). Les 86 touches ainsi mises en évidence, induisent une baisse du taux d'ATP mesuré dans les puits. D'autres molécules, apparemment capables d'induire une augmentation du taux d'ATP mesuré dans les puits et donc potentiellement liées à un effet hyperprolifératif sur les cellules, ont été repérées. Ainsi, 6 molécules qui auraient cet effet hyperprolifératif pour les cellules TG1 proliférantes, et 10 molécules pour les cellules TG1 quiescentes (Q16) ont été mises en évidence (figure 46). Au total, 103 touches sont issues de ce criblage primaire.

4.2. Criblage secondaire de la chimiothèque Prestwick®

Pour le criblage secondaire chacune des 103 touches issues du criblage primaire est testée en duplicata à 50µM et 5µM, sur les cellules TG1 proliférantes à passage 30 et sur les cellules quiescentes (Q16) à passage 25. La variabilité de chaque plaque étant supérieure à celles du criblage primaire, c'est-à-dire que les z' des plaques du criblage secondaire sont plus faibles (tout en restant supérieurs à 0,5) que les z' des plaques du criblage primaire, les molécules sont définies comme étant des touches confirmées si :

- ⇒ Le composé fait varier la luminescence totale d'un puits de plus de **trois** fois l'écart-type du contrôle négatif (1% DMSO) par rapport à la moyenne du contrôle négatif.
- ⇒ Le composé abaisse le pourcentage de survie cellulaire calculé par rapport au contrôle négatif à moins de 5%.

La reproductibilité calculée pour chaque plaque (z'>0,5) permet d'analyser les plaques du criblage secondaire. Cette analyse montre que très peu de molécules testées au criblage secondaire sont actives à 5µM, nous avons donc confirmé les touches uniquement sur la base des molécules actives sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence (Q16) à 50µM (figure 45).

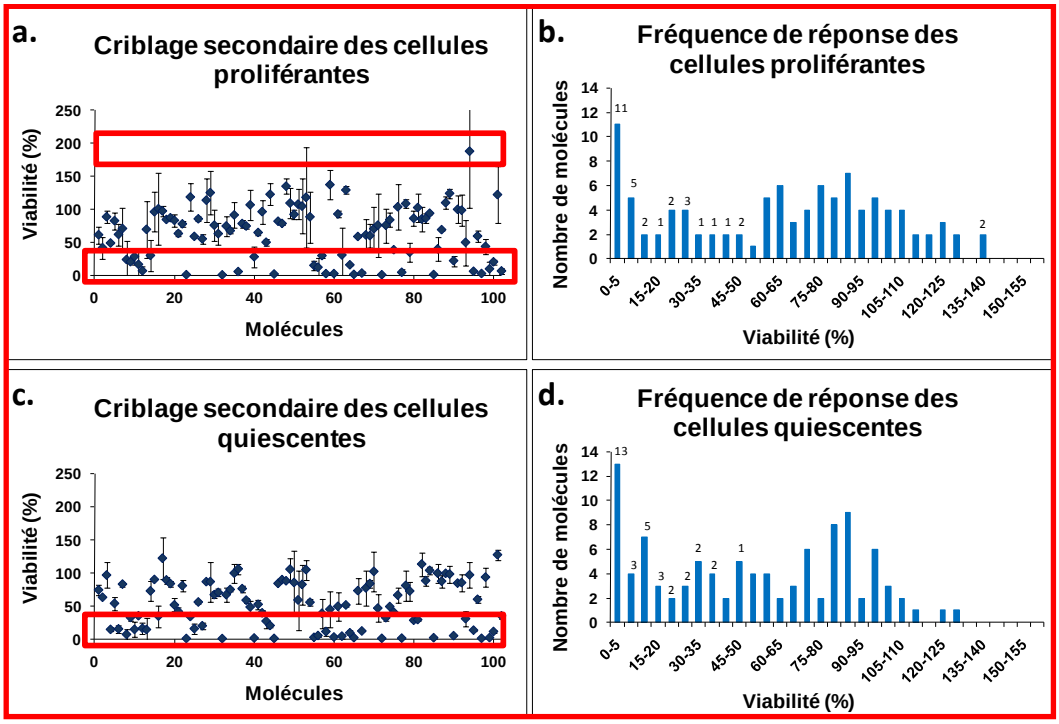


Figure 45 : Résultats du criblage secondaire de la chimiothèque Prestwick® sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence.
Les graphiques a. et b. sont les représentations des résultats du criblage de la chimiothèque Prestwick® à 50µM en duplicata sur les cellules TG1 en prolifération. Les graphiques c. et d. sont les représentations des résultats du criblage de la chimiothèque Prestwick® à 50µM en duplicata sur les cellules TG1 en quiescence.
Dans les graphiques a. et c., chaque point représente la moyenne des pourcentage de viabilité des cellules TG1, après traitement par une molécule de la chimiothèque Prestwick® testé en duplicata.
Les histogrammes b. et d. représentent le nombre de composés induisant une viabilité des cellules par tranche de 5%. Le nombre de touche dans chaque tranche est indiqué par le chiffre en haut des barres de l'histogramme.
Les zones des graphiques encadrées en rouge contiennent des touches qui sont définies selon deux règles : 1- le composé fait varier la luminescence totale dans un puits de plus ou moins trois fois l'écart-type du contrôle négatif (1% DMSO sans composé) par rapport à la moyenne du contrôle négatif, 2- le composé abaisse le pourcentage de survie cellulaire calculé par rapport au contrôle négatif à moins de 5%.

Des 86 touches induisant, à 50µM, une diminution de la quantité d'ATP dans les puits au criblage primaire, 39 sont confirmées au criblage secondaire à la même concentration. Il y a 6/20 touches confirmées pour être actives sur les cellules TG1 proliférantes, 10/32 touches confirmées, actives sur les cellules TG1 quiescentes et 23/37 touches confirmées, actives sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence (Q16). Enfin, aucune des touches sur les 10 ayant eu un effet « hyperproliératif » sur les cellules quiescentes au criblage primaire n'est confirmée et 2/6 touches ayant un effet hyperproliératif sur les cellules proliférantes sont confirmées au criblage secondaire (figure 46).

Ceci laisse penser que l'augmentation du taux d'ATP mesuré dans les puits des plaques du criblage primaire sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence (Q16) était liée à un surnombre initial de cellules dans ces puits plutôt qu'à un réel effet hyperproliférative des molécules sur les cellules, au moins pour les molécules non confirmées au criblage secondaire.

Au total, 29 molécules sont actives sur les cellules TG1 proliférantes (dont une qui n'était active que sur les cellules quiescentes au criblage primaire et qui, au criblage secondaire est active à la fois sur les cellules TG1 proliférantes et quiescentes) deux molécules semblent avoir un effet hyperproliférative sur les cellules TG1 proliférantes et 33 molécules sont actives sur les cellules TG1 quiescentes (Q16).

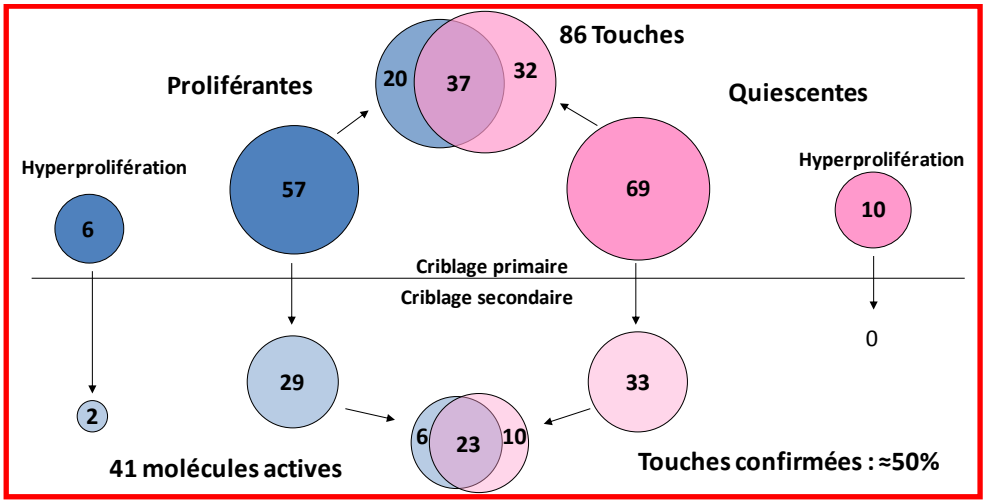


Figure 46 : Résultats des criblages primaires et secondaires de la chimiothèque Prestwick sur les CSC de glioblastome TG1.
Les cercles représentent l'ensemble des touches actives sur les cellules TG1 à l'issue du criblage primaire (en haut) ou secondaire (en bas); les chiffres indiquent le nombre de molécules qui sont actives sur les cellules TG1 ; en bleu, les touches actives sur les cellules TG1 en prolifération ; en rose, les touches actives sur les cellules TG1 en quiescence. Les molécules actives sur les cellules en prolifération et en quiescence sont indiquées dans la superposition des bulles.

Les 39 composés ayant un effet abaissant le taux d'ATP des puits et les deux composés augmentant le taux d'ATP, mis en évidence lors du criblage secondaire ont été regroupés par classe pharmacologique. Dans ce classement, 17 composés sont des antibactériens, antifongiques ou antiparasitaires, 10 des médicaments du système cardio-vasculaire, 2 des anticancéreux, 2 des antihistaminiques, 2 des antipsychotiques, 2 des dérivés d'hormones stéroïdes et 6 molécules n'entrent pas dans une classe particulière. La liste de ces molécules et un résumé de leurs effets sur les cellules proliférantes et quiescentes est présentée dans le tableau 8.

Nom de la molécule	Classe thérapeutique	Actif CI P	Actif CI Q	Actif CII P	Actif CII Q	Sélection
Amiodarone	Antiarrhythmique, antiangoreux	oui	oui	oui	oui	oui
Fendiline	Antiangoreux	non	oui	non	oui	oui
Félodipine	Antihypertenseur, antiangoreux	non	oui	non	oui	oui
Prazosine	Antihypertenseur	oui	oui	oui	oui	oui
Perhexiline	Vasodilatateur	oui	oui	oui	oui	oui
Prénylamine	Vasodilatateur	oui	oui	oui	oui	oui
Trapidil	Vasodilatateur coronaire	oui (Hyperproliferatif)	non	oui (Hyperproliferatif)	non	oui
Suloctidil	Vasodilatateur, hypocholestérolémique	oui	oui	oui	oui	oui
β-Escine	Traitement des désordres vasculaires périphériques	oui	oui	oui	oui	oui
Tribénoside	Phlébotonique, antiinflammatoire	oui	oui	oui	oui	non
Parthénolide	Antiinflammatoire	oui	oui	oui	oui	oui
Astémizole	Antihistaminique	oui	oui	non	oui	oui
Terfénadine	Antihistaminique	oui	oui	oui	non	oui
Ellipticine	Anticancéreux	oui	oui	oui	non	oui
Tamoxifène	Anticancéreux	oui	oui	non	oui	oui
Ménadione	Cytotoxique	oui	oui	oui	oui	non
Lynestrénole	Progestogène	oui	oui	non	oui	oui
Progestérone	Progestogène	non	oui	non	oui	oui
Sertraline	Antidépresseur, psychoanaleptique	oui	oui	oui	oui	oui
Zuclopenthixol	Antipsychotique	oui	non	oui	non	oui
Acide Ethacrynique	Diurétique	non	oui	non	oui	oui
Bisacodyl	Laxatif	non	oui	non	oui	oui
Lutéoline	Expectorant	non	oui	non	oui	oui
AMPc	Messager secondaire	oui (Hyperproliferatif)	non	non	non	oui
Pyrvinium	Anthelminthique	oui	oui	oui	oui	non
Avermectine	Anthelminthique, antiparasitaire	oui	oui	oui	oui	non
Ivermectine	Anthelminthique, antiparasitaire	oui	oui	oui	non	oui
Halofantine	Antipaludéen	oui	oui	oui	oui	non
Méfloquine	Antipaludéen	oui	oui	oui	oui	non
Primaquine	Antipaludéen	oui	non	oui	non	oui
Clioquinol	Amoebicide, antiseptique	oui	non	oui	non	oui
Alexidine	Antibactérien	oui	oui	oui	oui	non
Benzéthonium	Antibactérien	oui	oui	oui	oui	non
Méthylbenzéthonium	Antibactérien	oui	oui	oui	oui	non
Lasalocid	Antibactérien	oui	oui	oui	oui	non
Thonzium	Antibactérien	oui	oui	oui	oui	non
Butoconazole	Antibactérien, antifongique	oui	oui	oui	oui	oui
Isoconazole	Antibactérien, antifongique	oui	oui	non	oui	oui
Tomatine	Antibactérien, antifongique	oui	oui	oui	oui	non
Sertaconazole	Antibactérien, antifongique, anesthésiant	oui	oui	oui	oui	non
Sanguinarine	Antibactérien, antiinflammatoire	oui	oui	oui	oui	non

Tableau 8 : Molécules de la chimiothèque Prestwick issues du criblage secondaire et actives sur les CSC de glioblastomes TG1.

Les molécules sont dites actives si elles répondent au moins à l'une des deux règles énoncées pour le criblage primaire et pour le criblage secondaire (voir légendes, figure 44 et figure 45).

Abréviations : CI, criblage primaire ; CII, criblage secondaire ; P, TG1 proliférantes ; Q, TG1 quiescentes ; Sélection, molécules sélectionnées pour les courbes dose-réponse.

4.3. Courbes dose-réponse des touches confirmées de la chimiothèque Prestwick®

Des courbes doses-réponses ont été réalisées pour tous les composés issus du criblage secondaire de la chimiothèque Prestwick® et présentant une spécificité d'action sur les cellules en prolifération ou en quiescence. Nous avons exclu toutes les molécules antibactériennes, antifongiques, antiparasitaires, les molécules cytotoxiques et les détergents qui agissaient à la fois sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence (Q16) lors du criblage secondaire (tableau 8).

Les courbes dose-réponse ont été effectuées sur les CSC de glioblastome TG1 en prolifération et en quiescence mais aussi sur d'autres cellules à savoir :

- Les CSC de glioblastomes TG16 et OB1 en prolifération et en quiescence
- Les cellules de la lignée de glioblastome U-87 MG
- Des cellules neurales non cancéreuses : cellules souches neurales fœtales (f-NSC) et des astrocytes humains (HA)
- Des cellules humaines non neurales et non cancéreuses, les cellules de rein embryonnaire HEK293.

Tester les molécules sur plusieurs types de cellules permet de mettre en évidence la spécificité des composés pour les cellules souches cancéreuses. Ainsi, les poudres des 27 composés sélectionnés, dont deux avec un effet hyperproliférratif supposé, ont été commandées (Prestwick® Chemical Library) et des solutions à 10mM dans 100% de DMSO ont été préparées pour chacun des composés. La plupart des composés étant actifs à 50µM mais pas à 5µM lors du criblage secondaire, nous avons réalisé les courbes dose-réponse aux concentrations finales suivantes : 1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM, en triplicata. Les expériences ont, en outre, été effectuées trois fois (N=3). Les résultats présentés sont la moyenne de ces trois expériences et les courbes ont été ajustées en utilisant l'équation de Hill (voir matériels et méthodes paragraphe 6.6.4.3).

Les résultats des courbes dose-réponse sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence montrent que sur les 27 composés testés, 24 composés sont actifs dont 2 composés sont actifs à de plus faibles concentrations sur les cellules en prolifération que sur les cellules en quiescence (Q16), 3 composés sont actifs à de plus faibles concentrations sur les cellules en quiescence que sur les cellules en prolifération, 19 composés ont le même effet sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. Trois composés n'ont d'effet ni sur les cellules proliférantes, ni sur les cellules quiescentes (tableau 9).

Molécule	Structure	EC50 TG1 P (µM)	EC50 TG1 Q (µM)	Résultats
Zuclopenthixol		20±3	52±3	
Parthénolide		15±2	48±6	
Bisacodyl		>100	1,5±0,3	
Isoconazole		72±14	18±2	
Progestérone		>100	25±11	
Astémizole		12±2	28±3	
Prazosine		18±3	31±5	
Sertraline		19±1	39±1	
Ellipticine		13±1	19±5	
Fendiline		22±1	32±1	
Ivermectine		3±1	4±1	
Amiodarone		10±3	10±3	
β-Escine		17±3	12±3	
Perhexiline		10±1	14±3	
Prénylamine		22±3	27±3	
Suloctidil		11±1	13±1	

Molécule	Structure	EC50 TG1 P (µM)	EC50 TG1 Q (µM)	Résultats
Terfénadine		8±1	17±1	
Butoconazole		38±1	14±2	
Acide Ethacrynique		81±11	41±11	
Lutéoline		>100	20±2	
Lynestrénol		36±2	43±8	
Félodipine		38±1	30±3	

Molécule	Structure	EC50 TG1 P (µM)	EC50 TG1 Q (µM)	Résultats
Tamoxifène		14±2	20±1	
Clioquinol		31±1	103±5	
AMPc		>100	>100	
Primaquine		>100	>100	
Trapidil		>100	>100	

Tableau 9 : EC_{50} des molécules sélectionnées lors du criblage secondaire.

Les molécules sélectionnées lors du criblage secondaire ont été testées en courbes dose-réponse (1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM) sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. Les courbes ont été réalisées en triplicata, les EC50 ont été déterminés à partir de l'équation de Hill ayant servi à ajuster les courbes. En gris, composés qui n'ont pas d'effet, en rose, composés ayant plus d'effet sur les cellules TG1 quiescentes, en bleu, composés ayant plus d'effet sur les cellules TG proliférantes.

Les trois composés sélectionnés lors des criblages primaires et secondaires et qui n'ont plus d'effet lors des essais de courbes dose réponse sont la **primaquine**, l'**AMPc** et le **trapidil**. Le **trapidil** et l'**AMPc** semblaient avoir un effet hyperprolifératif sur les cellules TG1 en prolifération. L'absence d'effet du **trapidil** et de l'**AMPc** sur les cellules TG1 proliférantes en courbe dose-réponse suggère que l'augmentation du taux d'ATP observée dans ces puits lors des criblages primaire et secondaire était lié à une hétérogénéité dans la répartition des cellules dans les puits avec un nombre initial de cellules dans ces puits plus important que dans les puits contrôles, plutôt qu'à un réel effet hyperprolifératif de ces molécules sur les CSC de glioblastomes TG1 en prolifération. La **primaquine** avait un effet cytotoxique sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. Ce composé n'ayant plus d'effet sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence (Q16) peut s'expliquer par un mélange de molécules dans certains puits des plaques de la chimiothèque, ou par une modification du composé. Un puits présentant un mélange de molécules chimiques, induirait, dans notre cas, un effet sur les cellules TG1 en prolifération et/ou en quiescence. Cet effet n'est plus visible en courbe dose-réponse puisque les solutions sont préparées à partir des poudres.

Les 24 composés actifs ont ensuite été testés sur deux autres types de cellules souches de glioblastome TG16 et OB1 (isolées de deux autres patients) en prolifération et en quiescence (Q16), sur les f-NSC, la lignée cellulaire U-87 MG et les astrocytes humains. Les résultats montrent que chaque composé présente un effet similaire sur les cellules souches de glioblastome TG1, TG16 et OB1 proliférantes d'une part, et sur ces mêmes cellules dans les conditions de quiescence à 16 jours d'autre part. En effet, les courbes pour chaque composé présentent le même profil en fonction du type de CSC issue de glioblastome (voir tableaux en annexe et les histogrammes figure 47 et figure 50).

Peu de composés ont une action réellement différente sur les cellules souches de glioblastome (TG1, TG16 et OB1) proliférantes et quiescentes. L'**acide éthacrynique** semble plus actif sur les cellules souches de glioblastomes en quiescence que sur les cellules en prolifération (EC_{50} d'environ 20µM pour les trois types de CSC de glioblastome en quiescence et d'environ 60µM pour les 3 types de CSC en prolifération) et le **bisacodyl** semble être spécifiquement actif sur les cellules souches de glioblastomes en quiescence, avec un EC_{50} d'environ 1µM sur les trois types de cellules souches de glioblastome. D'autre part, seul le **zuclopenthixol** semble vraiment plus actif sur les cellules souches en prolifération que sur les cellules quiescentes (EC_{50} d'environ 25µM pour les trois types de CSC de glioblastome en prolifération et d'environ 50µM pour les 3 types de CSC en quiescence). La plupart des molécules testées en courbe dose-réponse sont actives à de plus faibles concentrations sur les cellules f-NSC que sur les cellules souches de glioblastomes en prolifération et en quiescence et sur les cellules U-87 MG, HEK et les

astrocytes humains. La majeure partie des composés issus du criblage de la chimiothèque Prestwick ne sont donc pas spécifiques des cellules souches cancéreuses de glioblastome. Cependant, l'étude des mécanismes d'action menant à la mort des CSC, de ces composés pourrait aider à mieux comprendre la physiopathologie des CSC de glioblastomes et permettre de développer des médicaments ciblant spécifiquement les voies de signalisation essentielles pour le développement et la survie des CSC de glioblastomes.

4.3.1. Molécules connues pour leurs activités sur des lignées cellulaires cancéreuses

Des 24 molécules issues du criblage sur les cellules souches de glioblastomes TG1, 17 ont été décrites pour avoir une action antiproliférative ou cytotoxique sur des lignées de cellules cancéreuses ou sur des modèles de xénogreffes. Il s'agit de : **amiodarone, astémizole, clioquinol, ellipticine, β-escine, acide éthacrynique, félodipine, fendiline, ivermectine, lutéoline, parthénolide, perhexiline, prazosine, prénylamine, sertraline, tamoxifène, et terfénadine**. Le **tamoxifène** et l'**ellipticine** sont des anticancéreux notoires. Les autres molécules ont une activité pharmacologique différente, mais ont montré des activités cytotoxiques sur des lignées cellulaires cancéreuses.

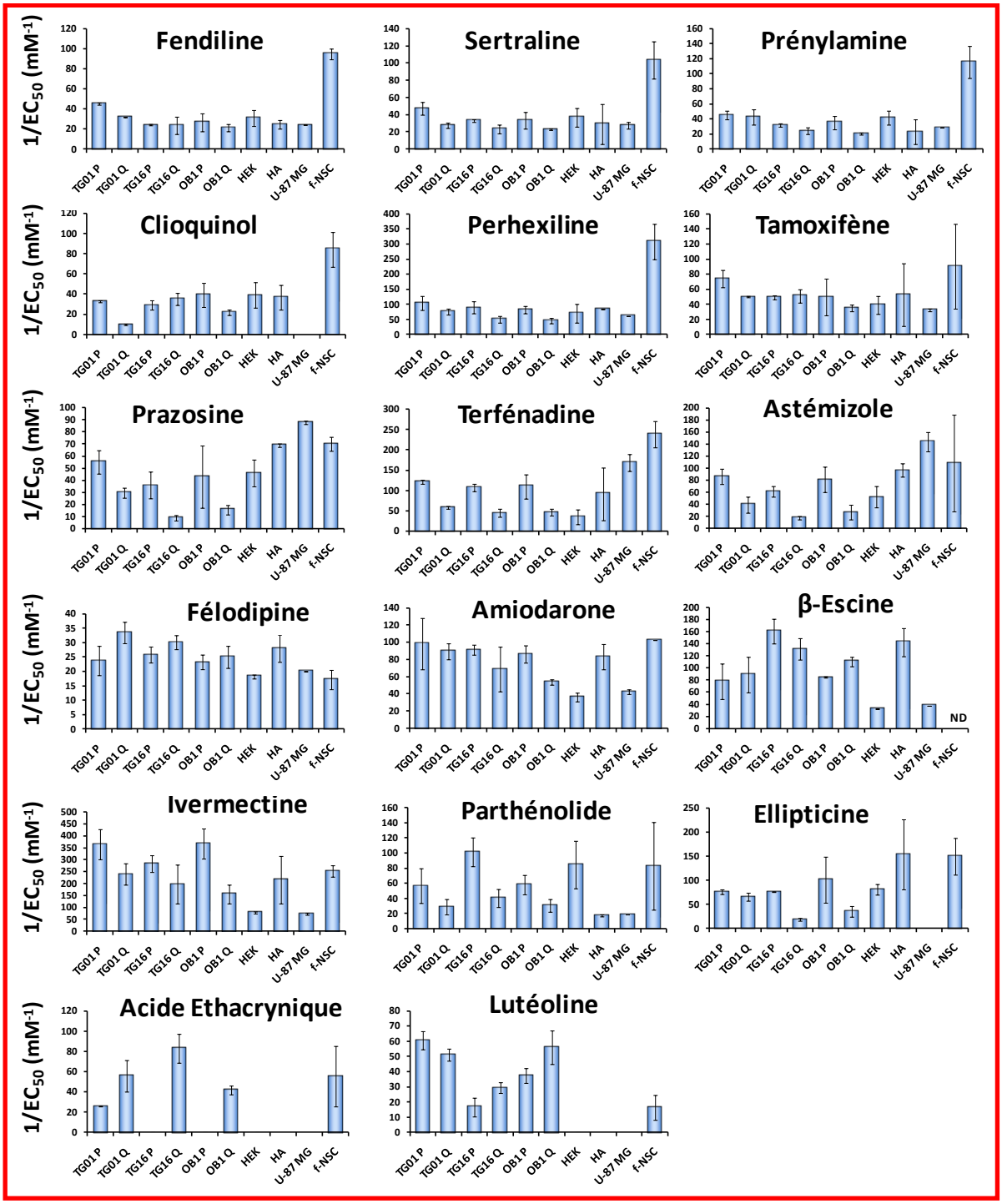


Figure 47 : Histogrammes de l'efficacité des molécules issues de la chimiothèque Prestwick sur les CSC de glioblastomes en prolifération et en quiescence (Q16) et sur les cellules HEK, U-87 MG, f-NSC et les astrocytes humains (HA).

Les molécules présentées ici sont des molécules issues des criblages primaire et secondaire de la chimiothèque Prestwick sur les cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes TG1 en prolifération et en quiescence. Ces molécules ont la particularité d'avoir été précédemment décrites comme étant actives sur des lignées de cellules cancéreuses et seront discutées ci-dessous.

P, proliférantes ; Q, quiescentes ; ND, non déterminé.

Parmi toutes les molécules actives sur les cellules souches cancéreuses issues de glioblastome TG1 en prolifération et en quiescence, seules le **tamoxifène** et l'**ellipticine** ont été développées en tant que molécules anticancéreuses, les autres molécules ayant été développées pour d'autres applications médicales.

Le **tamoxifène** est un anti-œstrogène largement utilisé dans le traitement des cancers du sein hormono-dépendants. Cette molécule est également connue pour inhiber PKC (protéine kinase C), très exprimée et active dans les lignées cellulaires de glioblastome U-87 MG et A172 et qui est corrélée avec le fort taux de croissance de ces cellules. L'inhibition de PKC dans ces cellules induit leur mort par apoptose (Couldwell et al., 1994). Le **tamoxifène** a également été décrit pour induire la mort des cellules C6 de gliome de rat *via* une inhibition des voies de signalisation PI3K/AKT, JNK et ERK (Feng et al., 2010). Cette molécule est déjà en essai clinique de phase I en association avec le témozolomide et une radiothérapie concomitante. Les résultats encourageant obtenus pour cet essai devraient le faire passer prochainement en essai clinique de phase II (Patel et al., 2011). Cette molécule est toxique pour les cellules souches cancéreuses en prolifération et en quiescence, sans présenter de spécificité particulière pour les CSC en prolifération ou en quiescence, ni pour les cellules HEK, HA, U-87 MG et f-NSC (figure 47).

L'**ellipticine** est un alcaloïde dont l'activité anti-tumorale a été utilisée dans le traitement du cancer du sein métastatique. Récemment, elle a été décrite pour inhiber la protéine kinase CK2, qui intervient dans les processus de cancérisation, notamment dans le cancer de la prostate, du sein et dans les leucémies myéloïdes aigues (Prudent et al., 2010). Elle a également été décrite pour avoir une activité antiproliférative en formant des adduits au niveau de l'ADN, sur la lignée cellulaire de glioblastome U-87 MG lors d'une incubation de 72 heures à 1µM (Martinkova et al., 2011). Ce composé est toxique sur les cellules souches cancéreuses en prolifération et en quiescence (Q16) (tableau 10).

	TG1	**TG16**	**OB1**
Proliférantes	13±1 µM	13±1 µM	8±1 µM
Quiescentes	19±5 µM	56±10 µM	30±9 µM

Tableau 10 : Effet de l'ellipticine sur les cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes en prolifération ou en quiescence (Q16).
Les valeurs indiquées sont les EC_{50} en (µM) de l'ellipticine pour chacun des types cellulaires testés, en prolifération et en quiescence (Q16).

La toxicité de l'**ellipticine** est cependant encore plus importante sur les astrocytes humains (EC_{50}= 5±1µM) et sur les cellules f-NSC (EC_{50}=7±2µM). Cependant, elle n'est pas toxique pour les cellules U-87 MG dans les conditions que nous avons testées (de 1µM à

100µM pendant 24 heures). Ces données suggèrent que l'**ellipticine** peut avoir deux effets. Un effet cytotoxique pour les cellules souches cancéreuses en prolifération et en quiescence, pour les astrocytes humains et les f-NSC, au moins pour des concentrations supérieures à 5µM, et un effet antiprolifératif à 1µM, sur les cellules U-87 MG. L'**ellipticine** pourrait également avoir un effet antiprolifératif sur les cellules souches cancéreuses en prolifération, les astrocytes humains et les f-NSC à faible concentration.

Parmi les molécules qui ont été développée pour des applications médicales autres que la cancérologie, certaines, comme la **prénylamine** (Popper and Batra, 1993), la **fendiline** (Jan et al., 2001), la **sertraline** (Huang et al., 2011) et la **terfénadine** (Jangi et al., 2008) ont été décrites comme induisant une augmentation de la concentration calcique intracellulaire et la mort des cellules cancéreuses (tableau 13).

La **terfénadine** est une molécule antihistaminique agissant comme antagoniste des récepteurs HRH1. Cet antihistaminique n'est plus commercialisé en France car il présente le désavantage de provoquer des torsades de pointes et un allongement de l'intervalle QT (anomalie du rythme cardiaque) dû à son action sur les canaux potassiques hERG (gène humain relié au gène « ether-à-gogo ») (Aslanian et al., 2009). Par ailleurs, la **terfénadine** a montré une activité cytotoxique sur une lignée de cellules de mélanome A375 (Jangi et al., 2008). Cette molécule induirait la mort des cellules de la lignée de mélanome par apoptose *via* un signal calcique intracellulaire important.

Une étude du signal calcique induit par la **terfénadine** sur les cellules TG1 en prolifération, a été menée au laboratoire. La **terfénadine** induit également une augmentation du signal calcique intracellulaire dans les CSC TG1 (figure 48). L'allure du signal calcique dépend de la concentration. A 20µM de **terfénadine**, l'augmentation du calcium cytosolique semble transitoire avec un retour progressif, à la normale. La concentration calcique augmente de manière biphasique pour les concentrations de 30 et 40µM de **terfénadine**, puis directement à partir de 50µM. Cette augmentation soutenue de la concentration calcique cytosolique est probablement liée à une activité « ionophore » de la molécule, telle que suggérée par l'équipe de Hey en 2009 (Aslanian et al., 2009). Les EC_{50} de la **terfénadine** sur les CSC TG1 en prolifération et en quiescence étant respectivement de 8±1µM et de 17±1µM, ces résultats peuvent suggérer que le mécanisme à l'origine de la mort des cellules souches de glioblastomes TG1 n'implique pas le récepteur histaminique HRH1, mais que comme pour les cellules de mélanome A375, la **terfénadine** induirait la mort cellulaire des cellules TG1 *via* un signal calcique intracellulaire important.

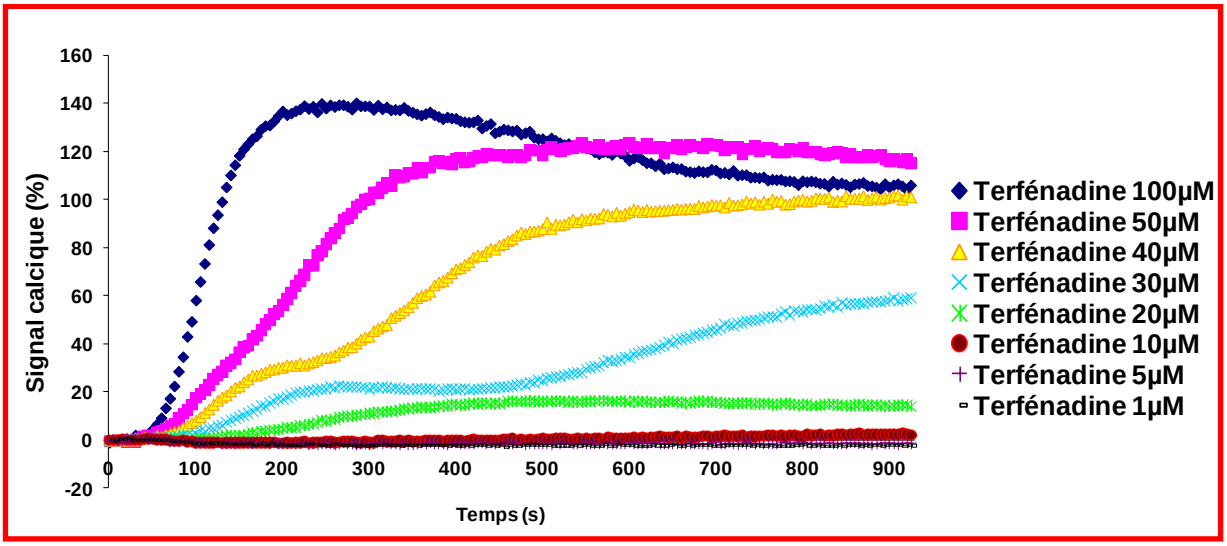


Figure 48 : Réponse calcique des cellules TG1 en prolifération à différentes concentrations de terfénadine.
Le graphique représente l'évolution du signal calcique intracellulaire au cours du temps, suite à une addition au temps T=30s de différentes concentrations de terfénadine. Les concentrations de terfénadine testées sont de 1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM. Des résultats identiques ont été obtenus en duplicata. Le signal calcique est exprimé en fonction du signal maximum de fluorescence obtenu suite au relargage de tout le calcium intracellulaire dans le puits par 100µM de digitonine. Ce signal, obtenu en fin de réaction, correspond à un signal calcique de 100%.

La **prénylamine**, la **fendiline** et la **sertraline** ont également été décrites pour modifier le signal calcique intracellulaire de cellules cancéreuses. La **prénylamine** est un vasodilatateur coronarien qui a été décrit pour induire une augmentation de la concentration calcique intracellulaire et pour causer la mort des cellules cancéreuses d'une lignée de cancer ovarien humain (Popper and Batra, 1993). La **fendiline** est un vasodilatateur coronarien, antagoniste du calcium. Une étude montre que la **fendiline** provoque une augmentation de la concentration calcique intracellulaire et la mort des cellules PC-3, une lignée de cancer de la prostate (Jan et al., 2001) et les cellules OC2, une lignée cellulaire de cancer oral humain (Huang et al., 2009). Cette étude propose que la faible augmentation du signal calcique intracellulaire ait pour rôle de protéger la cellule contre les effets toxiques de la **fendiline**. La **sertraline** est un antidépresseur qui inhibe la recapture de la sérotonine. Cette molécule a été décrite pour augmenter la concentration calcique intracellulaire des cellules PC-3 (une lignée cellulaire de cancer de la prostate) et induire leur apoptose, indépendamment de l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire (Chien et al., 2011).

Ces molécules ont fait l'objet d'une étude préliminaire concernant leurs effets sur la variation de la concentration calcique intracellulaire des CSC TG1. Les signaux calciques

qu'elles induisent sur les cellules TG1 en prolifération semblent plus faibles et de nature différente de celui induit par la **terfénadine**.

La **prazosine** est un antagoniste des récepteurs adrénergiques α1 qui sont des RCPG. Elle est utilisée comme antihypertenseur, mais la **prazosine** est décrite pour induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G2, dû à une inactivation de cdk1 (*cyclin dependant kinase 1*), provoquant l'apoptose des cellules. Cet effet semble être indépendant des récepteurs α1-adrénergiques (Lin et al., 2007). Ces récepteurs ne semblent d'ailleurs pas significativement exprimés dans les cellules TG1 en prolifération et en quiescence (voir annexe). La **prazosine** possède plusieurs analogues antagonistes des récepteurs α-adrénergiques, dont la **doxazosine** et la **térazosine** (figure 49).

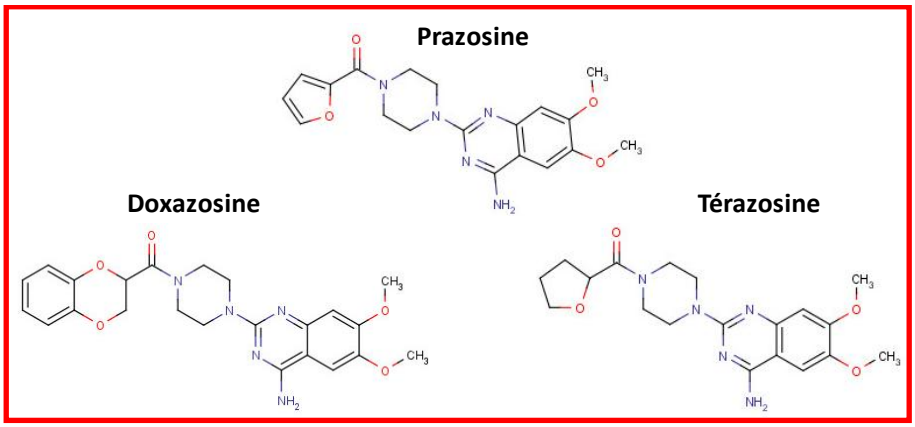


Figure 49 : Structures de la prazosine, de la doxazosine et de la térazosine.

Ces molécules sont moins toxiques que la **prazosine** et n'arrêtent pas le cycle cellulaire des lignées de cancer de la prostate en phase G_2 (Lin et al., 2007). Selon cette équipe, un impact différent de ces molécules dans la régulation du cycle cellulaire et le fait que la **prazosine** soit capable d'induire des dommages à l'ADN, pourraient expliquer la différence d'activité de ces molécules sur les lignées cellulaires de cancer de la prostate, DU145, LNCaP et PC-3. La **doxazosine** et la **térazosine** se trouvent dans la chimiothèque Prestwick® et ont été testées lors du criblage primaire de la chimiothèque sur les cellules souches de glioblastomes TG1 proliférantes et quiescentes (Q16). La **doxazosine** était une touche du criblage primaire qui a été retestée en criblage secondaire. Les pourcentages de viabilité obtenus pour les cellules TG1 proliférantes et quiescentes (Q16) traitées avec la **doxazosine** lors du criblage secondaire ne confirmant pas les résultats obtenus au criblage primaire, la **doxazosine** n'a pas été retenue pour les courbes dose-réponse (tableau 11).

Molécule	Criblage	Viabilité des cellules TG1 proliférantes (%)	Viabilité des cellules TG1 quiescentes (%)
Prazosine	Primaire	8%	2%
	Secondaire	22 ± 8%	5 ± 1%
Doxazosine	Primaire	58%	10%
	Secondaire	109 ± 6%	80 ± 20%
Térazosine	Primaire	101%	98%
	Secondaire	Non testée	

Tableau 11 : Effet de la prazosine, de la doxazosine et de la térazosine sur la viabilité des cellules TG1 proliférantes et quiescentes lors des criblages primaire et secondaire de la chimiothèque Prestwick®.
Lors du criblage primaire, les molécules sont testées à 50µM sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence (Q16). Lors du criblage secondaire, les molécules sont testées en duplicata à 50µM sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence (Q16). Les pourcentages de viabilité sont calculés par rapport au signal obtenu pour les puits contenant les cellules en présence de 1% de DMSO (diméthysulfoxide) (contrôle négatif) qui est fixé à 100% de viabilité.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'équipe de Guh (Lin et al., 2007), puisque la **prazosine** semble être cytotoxique à de plus faibles concentrations que la **doxazosine** et la **térazosine**, sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. Cependant, il n'est pas évident que l'effet cytotoxique de la prazosine soit uniquement relié à un arrêt du cycle cellulaire, car, dans nos expériences, cette molécule est toxique pour les CSC issues de glioblastome en quiescence, donc situées « en dehors » du cycle cellulaire (phase G_0), bien qu'à des doses plus élevées que pour les CSC de glioblastomes en prolifération (tableau 12).

	TG1	**TG16**	**OB1**
Proliférantes	18±3 µM	29±8 µM	37±8 µM
Quiescentes	31±5 µM	118±34 µM	67±8 µM

Tableau 12 : Effet de la prazosine sur les cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes en prolifération ou en quiescence (Q16).
Les valeurs indiquées sont les EC_{50} (en µM) de la prazosine pour chacun des types cellulaires testés, en prolifération et en quiescence (Q16).

D'autres molécules issues du criblage ont été précédemment décrites pour potentialiser l'effet de molécules anticancéreuses classiques, comme l'**amiodarone** qui augmente la toxicité de l'adriamycine, de la vincristine, de l'étoposide (van der Graaf et al., 1991) et de la doxorubicine probablement grâce à son inhibition du transporteur

ABCB1 (*ATP binding cassette* aussi appelé glycoprotéine p ou MDR1 pour *multi-drug resistant*) (Theodossiou et al., 2008). De nombreuses molécules issues du criblage ont d'ailleurs été décrites pour inhiber le transporteur ABCB1 largement exprimé dans les cellules souches cancéreuses (voir chapitre 1 paragraphe 1.3.3.2). La **prénylamine** (Safa et al., 1987), la **prazosine** (Takara et al., 2009), la **terfénadine** (Hait et al., 1994), **l'astémizole** (Ishikawa et al., 2000), le **tamoxifène** (Teft et al., 2011) et la **sertraline** (Wang et al., 2008b) pourraient avoir en plus de leurs activités cytotoxiques, une action renforçant la sensibilité des cellules aux médicaments anticancéreux existants *via* leur interactions avec le transporteur ABCB1.

Ces molécules sont intéressantes pour leur efficacité sur différents types de cellules souches cancéreuses. Cependant, leur mécanisme d'action peut varier en fonction des cellules testées. Il serait donc intéressant d'étudier plus en détail les voies de signalisation impliquées dans l'induction de la mort des cellules souches cancéreuses par ces molécules afin de mieux comprendre les voies de signalisation essentielles pour induire la prolifération, l'apoptose ou le maintien de la survie des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes.

Molécule	Lignée cellulaire (cancer)	EC_{50}	Effet	Publication
Amiodarone	DU143 (cancer de la prostate)	Ø	Augmente la toxicité de la doxorubicine (100µM)	Theodossiou et al., 2008
Astémizole	MDA-MB435S (cancer du sein)	Ø	Inhibe la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes (50mg/kg)	García-Quiroz et Camacho, 2011
β-escine	KMB5 ; Jurkat (leucémies, myélomes)	Ø	Potentialise l'effet du TNF, effet apoptotique, anti-invasif, anti-prolifératif, anti-angiogénique (30µM)	Harikumar et al., 2010
Clioquinol	LNCaP et C4-2B (cancer de la prostate)	≈ 30µM	Effet cytotoxique en présence de cuivre	Di Chen et al., 2007
Ellipticine	U-87 MG (glioblastome)	Ø	Empêche la prolifération cellulaire, ne tue pas les cellules (1µM)	Martinkova et al., 2010
Acide Ethacrynique	DLD1 (cancer du colon)	Ø	Augmente la prolifération cellulaire à faible concentration (20-30µM), cytotoxique sur les mêmes cellules à forte concentration (60-100µM)	Aizawa et al., 2003
Félodipine	MzChA-1 (cancer du canal biliaire)	26µM	Cytotoxique sur la lignée, Actif sur modèle xénogreffe en association avec la gemcitabine	Braconi et al., 2010
Fendiline	PC3 (cancer de la prostate)	Ø	Augmente le signal calcique intracellulaire et entraine la mort des cellules (100µM)	Jan et al., 2001
Ivermectine	OCL AML-2, HL60, U937, KG1a, TEX (leucémies)	≈ 5µM	Mort cellulaire par apoptose après 24h de traitement	Sharmeen et al., 2010
Lutéoline	A549 (carcinome du poumon non à petites cellules)	4,2µM	Mort cellulaire par apoptose après 48h de traitement, Arrêt du cycle cellulaire en phase G2	Cai et al., 2011
Parthénolide	U138MG, C6 (rat), U-87 MG, U373 (glioblastomes)	22±5µM ; 29±6µM ; 17±4µM ; 13±5µM	Inhibe le facteur NFκB et induit la mort cellulaire par apoptose après 36h d'incubation (test MTT)	Zanotto-Filho et al., 2011
Perhexiline	HT29 (cancer du colon)	10µM	Bloque les canaux calciques et induit la mort cellulaire	Batra et Alenfall, 1991
Prazosine	PC3 ; DU 145 ; LNCaP (cancer de la prostate)	11,1µM ; 16,7µM ; 7,5µM	Induit l'inactivation de la cycline dépendant des kinase (Cdk1) et provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2, puis la mort par apoptose des cellules	Lin et al., 2007
Prénylamine	HT29 (cancer du colon)	10µM	Augmente le signal calcique intracellulaire et entraine la mort des cellules	Batra et Alenfall, 1991
Sertraline	PC3 (cancer de la prostate)	≈ 27µM	Augmente la concentration calcique intracellulaire et entraine la mort des cellules après 24 heures de traitement	Huang et al., 2011
Tamoxifène	C6 (gliome du rat)	Ø	Active la voie de signalisation PI3K/Akt JNK ERK menant à la mort des cellules	Feng et al., 2010
Terfénadine	A375 (mélanome)	6,7µM	Augmente la concentration calcique intracellulaire et induit la mort des cellules par apoptose après 8h de traitement	Jangi et al., 2008

Tableau 13 : Effet des molécules sur des lignées de cellules cancéreuses dans la littérature.
Ce tableau regroupe les données de la littérature indiquant des effets toxiques des molécules issues du criblage, sur des lignées cancéreuses, le cancer duquel elles proviennent est indiqué entre parenthèses. L'EC_{50} est donné en µM lorsqu'il est disponible. Dans le cas contraire, la dose utilisée est indiquée dans la colonne indiquant l'effet de la molécule sur les cellules.

4.3.2. Molécules actives sur les cellules souches de glioblastomes, mais non connues pour leur effet sur des cellules cancéreuses

Les autres molécules issues du criblage n'ont jamais été décrites comme cytotoxiques ou inhibitrices de la prolifération de cellules cancéreuses (**butoconazole, isoconazole, lynestrenol, suloctidil, zuclopenthixol, progestérone et bisacodyl**). Parmi ces molécules, l'**isoconazole** et le **butoconazole** sont deux molécules antifongiques de structures proches (Fromtling, 1988) qui, dans nos expériences, semblent avoir le même profil d'action sur les différents types de cellules testées. Bien qu'ils semblent actifs à de plus faibles concentrations sur les cellules souches cancéreuses en quiescence, l'**isoconazole** et le **butoconazole** ne sont pas spécifiques des CSC issues de glioblastomes puisqu'ils sont également cytotoxiques pour les cellules HEK, U-87 MG, f-NSC et les astrocytes humains.

Le **suloctidil** est un vasodilatateur (Calderon et al., 1986) bloquant les canaux calcique. Ce composé semble avoir le même profil d'action sur les différents types de cellules testées que des molécules comme la **fendiline**, la **sertraline**, la **prénylamine**, le **clioquinol** et la **perhexiline** (figure 47 et figure 50) décrites comme actives sur des cellules cancéreuses. Le **suloctidil** (Calderon et al., 1986), a également été décrite pour sa capacité à augmenter la concentration calcique intracellulaire. Cette molécule pourrait donc avoir un mécanisme d'action similaire à celui décrit pour la **fendiline** (Tripathi et al., 1993), la **sertraline** (Huang et al., 2011) et la **prénylamine** (Popper and Batra, 1993), passant par une augmentation de la concentration calcique intracellulaire pour induire la mort des cellules. Ceci expliquerait le profil d'action, similaire en fonction des lignées, observé pour ces molécules.

Le **zuclopenthixol** est un neuroleptique utilisé dans le traitement de la schizophrénie et d'autres maladies mentales. Il s'agit d'un antagoniste des récepteurs dopaminergiques de classe D1 et D2 qui sont des récepteurs couplés aux protéines G (Lublin et al., 1991). Son profil d'action sur les différents types de cellules testées (figure 50) est semblable aux profils d'actions de la terfénadine, de l'astémizole et de la prazosine. Ces quatre molécules présentent une cytotoxicité à plus faible concentration sur les CSC de glioblastomes (TG1, TG16 et OB1) en prolifération par rapport aux mêmes cellules en quiescence. Leurs activités cytotoxiques semblent être plus importantes encore sur les cellules U-87 MG, f-NSC et sur les astrocytes humains (figure 47 ; figure 50). Les récepteurs DRD1 et DRD5 appartiennent à la classe des récepteurs dopaminergiques D1 et les récepteurs DRD2, DRD3 et DRD4 à la classe D2 (Le Foll et al., 2009). Les récepteurs des classes D1 et D2 ne semblent pas significativement exprimés dans aucun des types cellulaires testés, ni dans les conditions de prolifération ou dans les conditions de quiescence (voir annexes), à l'exception du récepteur

DRD4 dans les astrocytes humains. Il ne semble pas y avoir de corrélation entre l'expression des récepteurs dopaminergiques de classe D1 et D2 et la cytotoxicité du **zuclopenthixol**. Ainsi, la mort des cellules traitées au **zuclopenthixol** n'implique vraisemblablement pas les RCPG, mais d'autres cibles comme cela a été discuté pour la **terfénadine**, l'**astémizole** et la **prazosine**.

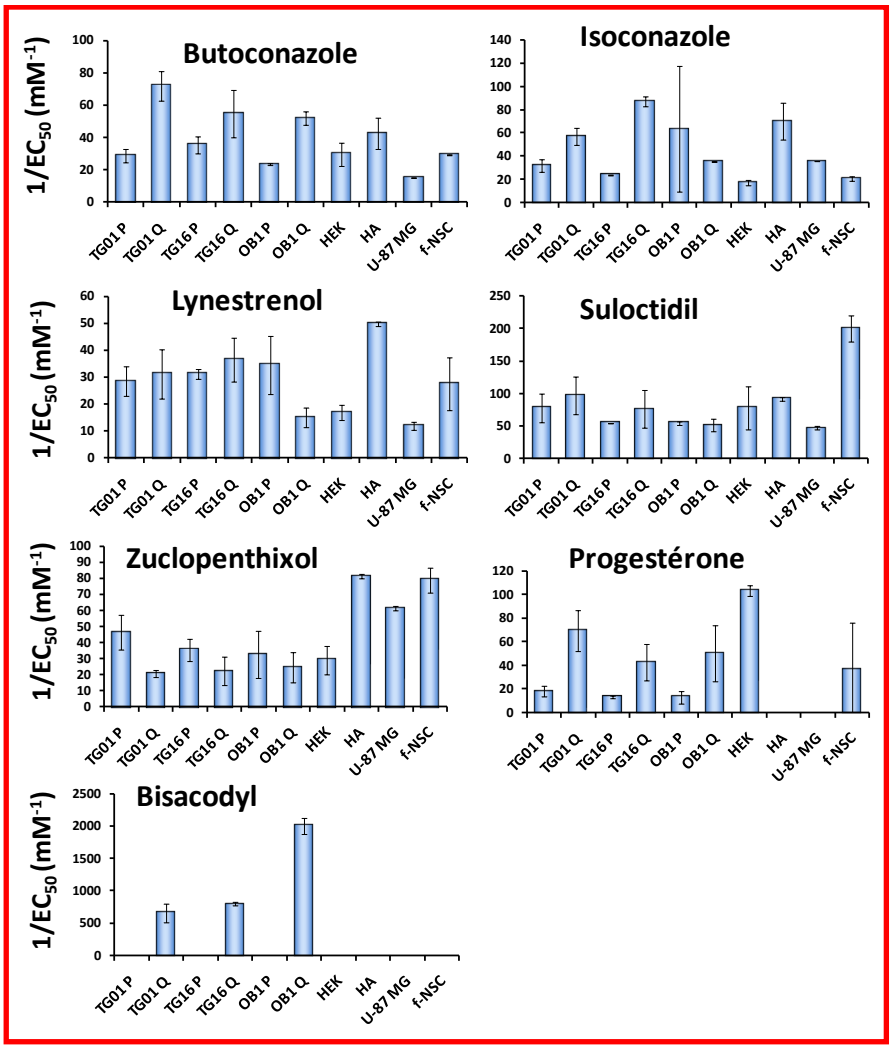


Figure 50 : Histogrammes de l'efficacité de molécules de la chimiothèque Prestwick® toxiques sur les CSC de glioblastomes, non décrites précédemment pour leur activité anti-cancéreuses
Les molécules présentées ici sont des molécules issues des criblages primaires et secondaires de la chimiothèque Prestwick sur les cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes TG1. Ces molécules n'ont jamais été décrites dans la littérature pour avoir des activités toxiques sur des cellules cancéreuses. Leur activité a été testée également sur les cellules HEK, U-87 MG, f-NSC et sur les astrocytes humains (HA).

Le **bisacodyl** est une molécule utilisée couramment pour le traitement des constipations passagères. La particularité de cette molécule réside dans le fait qu'elle semble active uniquement sur les cellules souches cancéreuses cultivées dans des

conditions de quiescence (figure 50). Parmi les 24 touches issues du criblage de la chimiothèque Prestwick, le bisacodyl est la seule molécule qui présente une telle spécificité d'action vis à vis des cellules souches cancéreuses en condition de quiescence. De plus, parmi toutes les molécules testées, elle présente l'EC_{50} la plus faible (EC_{50}=1µM) pour son action sur les CSC issues de glioblastome (TG1, TG16 et OB1) testées dans les conditions de quiescence. Cette molécule a retenu notre attention et nous avons mené une étude afin de préciser l'activité de cette molécule sur les cellules souches cancéreuses et d'étudier les groupements chimiques essentiels à sa fonction en étude de relation structure-activité (RSA).

4.4. Le bisacodyl et ses dérivés

Le **bisacodyl** est un laxatif qui se trouve dans des spécialités pharmaceutiques (suppositoires, comprimés, solutions buvables) comme le Contalax®, le Dulcolax® ou le Prepacol®. C'est un dérivé de diphénylméthane (figure 51). Il provoque l'accumulation d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale (Gaginella et al., 1994).

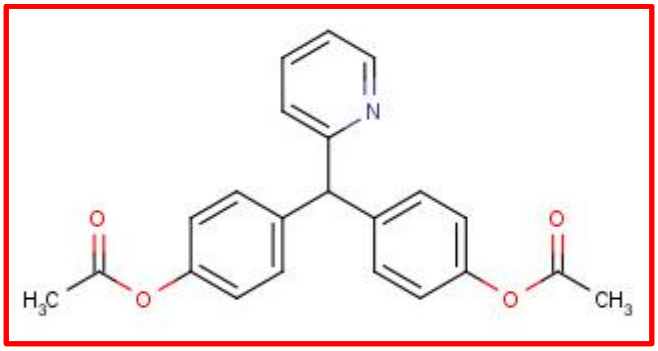


Figure 51 : Structure moléculaire du bisacodyl ou 4,4'-(pyridin-2-ylméthylène)bis(4,1-phénylène) diacétate

Le **bisacodyl** est une pro-drogue (Farack et al., 1985). Dans l'organisme, au niveau de l'intestin, il est hydrolysé à hauteur des deux groupements acétyles ($-OCOCH_3$) pour former le **4,4'-dihydroxydiphényl-(2-pyridyl)méthane** (**DDPM**) ou **désacétylbisacodyl** (figure 52).

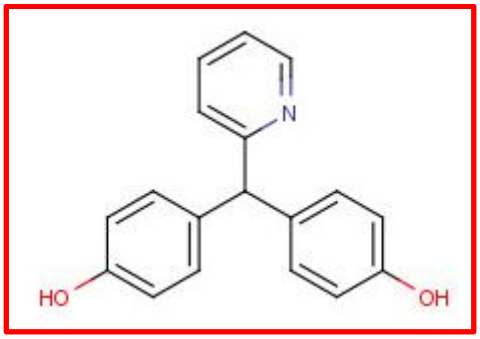


Figure 52 : Structure moléculaire du désacétylbisacodyl (DDPM)

La littérature relative au mécanisme d'action du bisacodyl est rudimentaire. Le bisacodyl stimule la synthèse d'oxyde nitrique (NO) dans les cellules épithéliales de l'intestin (Gaginella et al., 1994). Le NO s'accumule dans la lumière intestinale et pourrait, au moins en partie, provoquer une accumulation des fluides. Le NO joue également sur les neurones myentériques et les cellules musculaires lisses qui entourent l'intestin afin de créer une relaxation des fibres musculaires et détendre l'intestin. Ces trois mécanismes provoquent la défécation (Gaginella et al., 1994). Aucune donnée présente dans la littérature ne montre que le **bisacodyl** pourrait avoir une toxicité cellulaire ou des propriétés anticancéreuses.

4.4.1. Effet du bisacodyl et de son métabolite actif sur les cellules souches cancéreuses de glioblastomes

4.4.1.1. Courbes doses-réponses du bisacodyl sur les CSC

Le bisacodyl induit une forte diminution du taux d'ATP dans les CSC de glioblastome en quiescence (Q16) et montre peu d'effet sur ces mêmes cellules cultivées dans des conditions de prolifération. Cette spécificité d'effet, apparemment fonction de l'état physiologique des cellules, est retrouvée pour les cellules souches cancéreuses TG16 et OB1 (figure 53). L'EC_{50} sur les CSC en quiescence est de l'ordre de 1µM. Le taux de survie cellulaire pour des concentrations de 5µM à 100µM de **bisacodyl** est compris entre 5% et 20% en fonction du type cellulaire. L'effet du **bisacodyl** sur les cellules souches cancéreuses en prolifération est moins marqué puisque la survie cellulaire mesurée au plateau est comprise entre 80% et 60% en fonction du type cellulaire (figure 53). Dans les conditions utilisées pour notre test, le **bisacodyl** n'est pas actif sur les cellules U-87 MG ni sur les f-NSC, puisque la viabilité cellulaire est de 100% pour toutes les concentrations de **bisacodyl** testées. Le **bisacodyl** est légèrement actif sur les cellules HEK avec une

diminution de la viabilité de l'ordre de 30% pour des concentrations de **bisacodyl** de 10µM à 100µM. Enfin, le **bisacodyl** semble actif sur les astrocytes humains (HA) avec une diminution de la viabilité de 40% dès 1µM de **bisacodyl**.

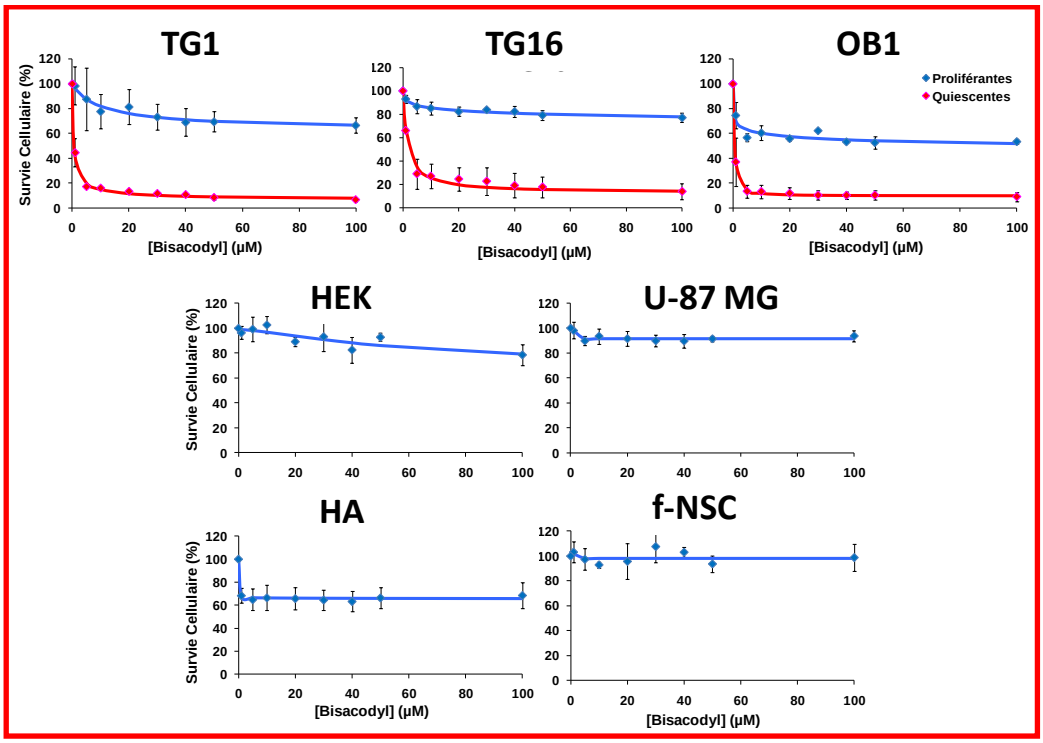


Figure 53 : Courbes doses-réponses du bisacodyl sur les cellules souches cancéreuses en prolifération et en quiescence et sur les cellules contrôles.
Les graphiques représentent la variation de la survie cellulaire (taux d'ATP) en fonction de la concentration en bisacodyl. Le bisacodyl a été testé sur les cellules TG1, TG16 et OB1 dans les conditions de prolifération et de quiescence, et sur les cellules contrôles f-NSC, HEK, HA et U-87 MG à 1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM. Les cellules ont été incubées 24 heures à 37°C en présence des composés. La viabilité est mesurée en calculant le taux d'ATP présent dans les puits à l'aide du test Cell Titer-Glo® de Promega. Les courbes ont été ajustées grâce à l'équation de Hill.

Une courbe dose-réponse à de plus faibles concentrations nous a permis de préciser l'EC_{50} du **bisacodyl** sur les cellules TG1 quiescentes. Le **bisacodyl** a été testé à 0nM, 250nM, 500nM, 750nM, 1000nM, 1250nM, 1500nM et 1750nM sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. L'effet du bisacodyl sur les cellules TG1 en culture à 16 jours de quiescence se situe entre 500nM et 1500nM, avec un EC_{50} de 1,04 ± 0,02 µM (figure 54). A ces concentrations, le bisacodyl n'a pas d'effet sur les cellules TG1 maintenues dans des conditions proliférantes.

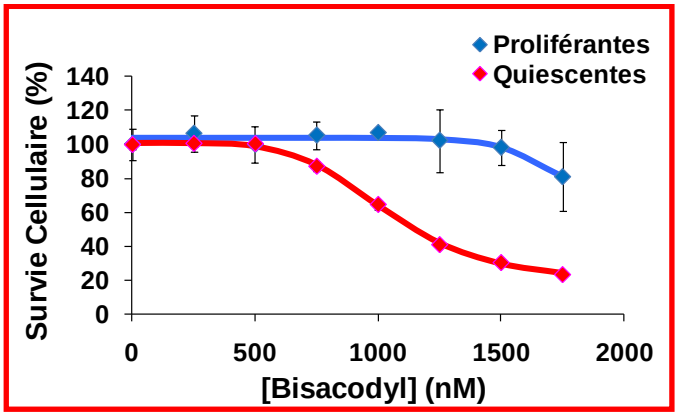


Figure 54 : Courbe dose-réponse du bisacodyl sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence à de faibles concentrations.
Le bisacodyl a été testé à 250nM, 500nM, 750nM, 1000nM, 1250nM, 1500nM et 1750nM sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence (Q16). Les cellules ont été incubées 24 heures à 37°C en présence des composés. La viabilité est mesurée en calculant le taux d'ATP présent dans les puits à l'aide du test Cell Titer-Glo® de Promega. Les courbes ont été ajustées en utilisant l'équation de Hill (le coefficient de Hill, n, étant de 5 pour les cellules TG1 en quiescence).

Ces différences d'efficacité du **bisacodyl** sur les cellules souches cancéreuses en condition de prolifération et en condition de quiescence, et son activité marquée à faible concentration, nous ont amené à poursuivre nos études sur cette molécule. Dans un premier temps, nous avons étudié la stabilité du bisacodyl dans les milieux de culture des cellules proliférantes et des cellules quiescentes.

4.4.1.2. Stabilité du bisacodyl

Dans l'organisme, le bisacodyl est hydrolysé en son métabolite actif, le désacétylbisacodyl (DDPM). Afin de savoir si le **bisacodyl** s'hydrolyse spontanément dans nos conditions expérimentales lors du test de viabilité des CSC proliférantes et quiescentes, une étude de la stabilité du **bisacodyl** dans le milieu des CSC proliférantes, c'est-à-dire du milieu NS34 qui n'a jamais été en contact avec les cellules, et du milieu conditionné des cellules quiescentes, c'est-à-dire du milieu qui a été en contact durant 16 jours avec des cellules TG1, a été entreprise. Cette étude a été réalisée sur la plateforme TechMed^{ILL} de l'UMS 3286 (Illkirch). La stabilité du **bisacodyl** a été mesurée sur une période de 24 heures. L'analyse par HPLC indique une disparition du pic correspondant au **bisacodyl** dans le milieu des cellules proliférantes et l'apparition de deux autres pics, dont l'un des deux (le plus lent) disparait également tandis que le plus rapide augmente. Le temps nécessaire à la disparition de la moitié du composé **bisacodyl** est d'environ 2h (tableau 14) dans le milieu des cellules proliférantes, mais après 24 heures d'incubation du composé dans le milieu des

cellules proliférantes environ 5% de **bisacodyl** n'ont pas été hydrolysés (figure 55). Les mêmes observations sont faites pour le **bisacodyl** dans le milieu des cellules quiescentes. Cependant, le temps nécessaire à la disparition de la moitié du composé est d'environ 4h20 (tableau 14) et le pic correspondant au composé **bisacodyl** a complètement disparu après 24 heures d'incubation du composé dans le milieu des cellules quiescentes (figure 55).

Milieu	Stabilité du biscodyl	$T_{1/2}$ du bisacodyl dans le milieu
Proliférant	Instable	≈ 2 h
Quiescent	Instable	4 h 20

Tableau 14 : Stabilité du bisacodyl dans le milieu des cellules proliférantes et quiescentes

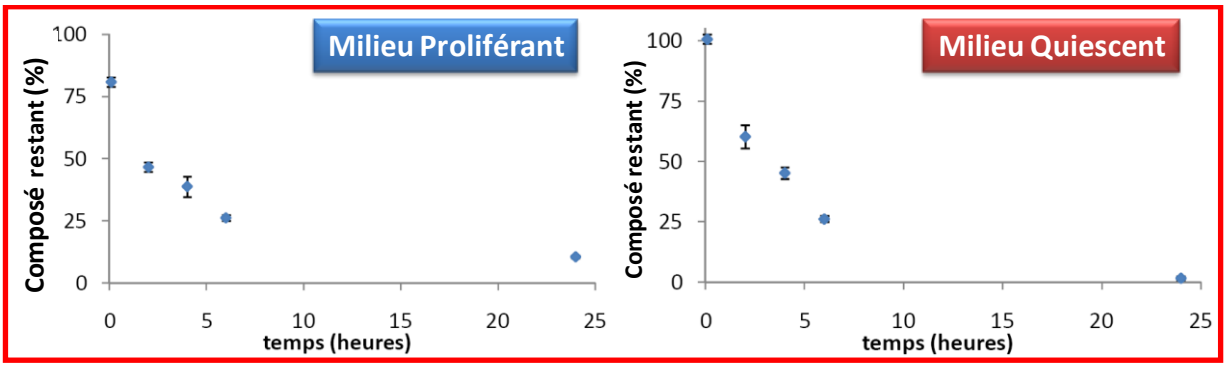


Figure 55 : Stabilité du bisacodyl dans le milieu des cellules proliférantes et dans le milieu des cellules quiescentes

Les graphiques représentent le pourcentage de bisacodyl restant dans le milieu des cellules proliférantes (à gauche) et dans le milieu des cellules quiescentes (à droite) en fonction du temps d'incubation du composé dans les milieux. L'étude est réalisée en duplicata et le pourcentage de composé restant est mesuré à l'aide d'un appareil HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance). Les résultats sont analysés en pourcentage de composé restant par rapport à une solution de référence contenant le bisacodyl dilué dans de l'eau et de l'acétonitrile.

Ces résultats montrant l'apparition successive de deux pics lors de la disparition du celui correspondant au **bisacodyl**, sont compatibles avec l'hydrolyse du composé **bisacodyl** perdant un premier groupement acétate puis un deuxième groupement acétate.

Contrairement au **bisacodyl**, son métabolite, le **DDPM**, est très stable dans le milieu des cellules proliférantes comme dans le milieu des cellules quiescentes (figure 56). De plus, l'analyse du spectre UV du produit correspondant au deuxième pic provenant de l'hydrolyse du **bisacodyl** et du spectre UV du **DDPM** montre que les spectres sont superposables (données non montrées). Ces données nous ont conduit à l'hypothèse que le composé hydrolysé **DDPM** est le dérivé du **bisacodyl** qui est actif sur les cellules souches en quiescence.

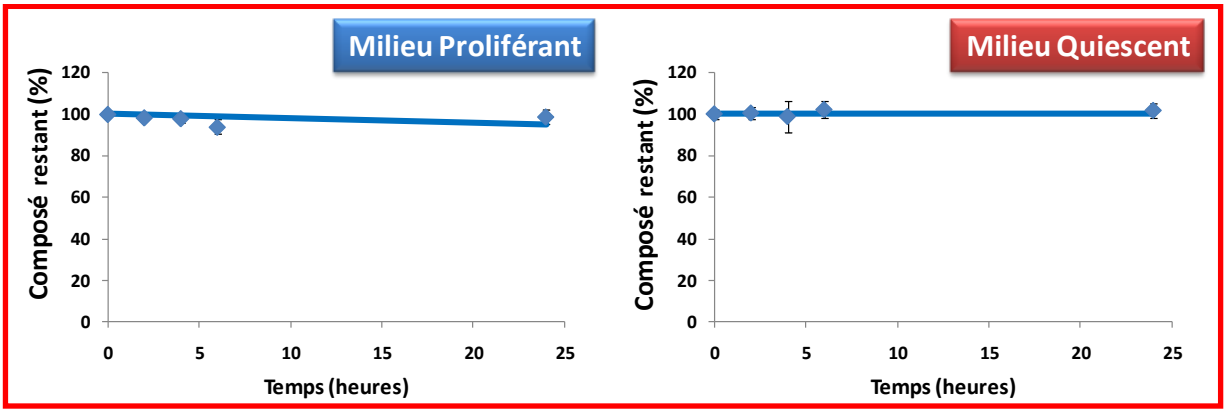


Figure 56 : Stabilité du DDPM dans le milieu des cellules proliférantes et dans le milieu des cellules quiescentes

Les graphiques représentent le pourcentage de DDPM restant dans le milieu des cellules proliférantes (à gauche) et dans le milieu des cellules quiescentes (à droite) en fonction du temps d'incubation du composé dans chacun des milieux à 2h, 4h, 6h et 24h. L'étude est réalisée en duplicata et le pourcentage de composé restant est mesuré par HPLC. Les résultats sont analysés en pourcentage de composé restant par rapport à une solution de référence contenant le DDPM dilué dans de l'eau et de l'acétonitrile.

4.4.1.3. Effet du désacétylbisacodyl sur les cellules souches cancéreuses

Le **désacétylbisacodyl** (**DDPM**) a été synthétisé au laboratoire par le Dr Samir Mameri et testé sur les cellules souches cancéreuses TG1 et OB1 en prolifération et en quiescence, sur les cellules U-87 MG, les f-NSC et sur les astrocytes humains. L'effet du DDPM sur les différents types cellulaires testés (figure 57) est similaire à celui décrit précédemment pour le bisacodyl (figure 53). En effet, aux concentrations les plus élevées, le **DDPM** induit un plateau de survie de 60% pour les cellules TG1 et OB1 en prolifération et de 5% et 20% respectivement pour les cellules TG1 et OB1 en condition de quiescence, avec un EC_{50} autour de 1µM. Le **DDPM** n'a pas d'effet sur les cellules U-87 MG et f-NSC où la viabilité cellulaire reste à 100%, même en présence de 100µM de **DDPM**. Un plateau de survie de 60% est observé pour les cellules HA avec un EC_{50} inférieur à 1µM (figure 57).

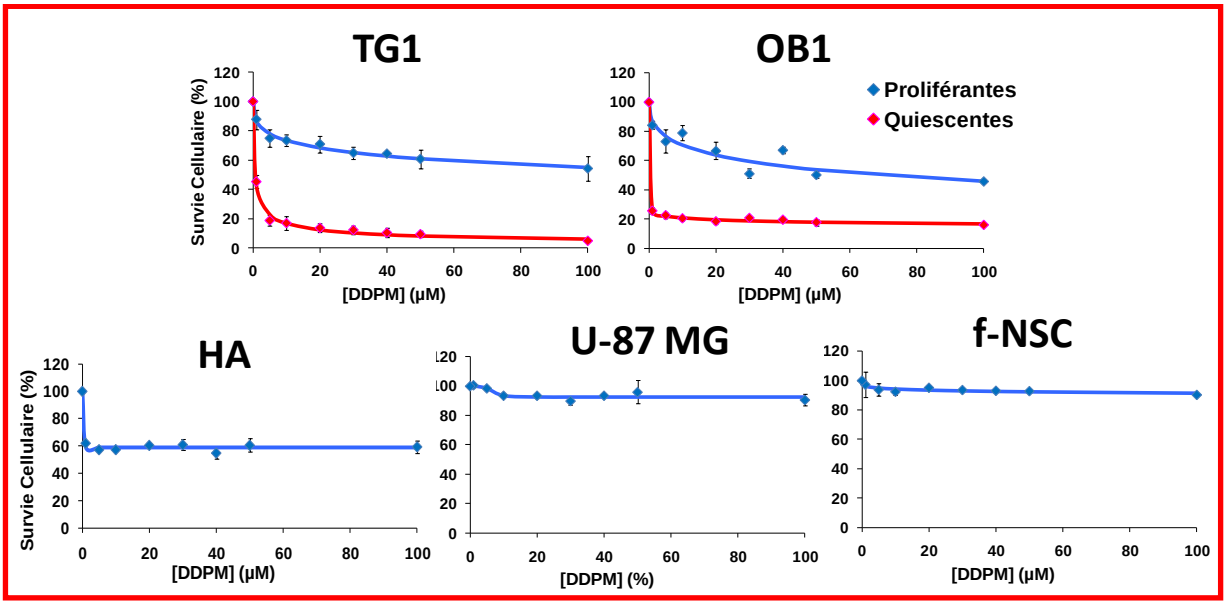


Figure 57 : Action du DDPM sur les cellules souches cancéreuses et sur les cellules contrôles. *Ces graphiques représentent la viabilité des cellules en pourcentage par rapport aux mêmes cellules non traitées en fonction de la concentration en DDPM. Les cellules sont incubées dans leurs milieux respectifs pendant 24h à 37°C en présence de DDPM à 1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM.*

Cette expérience confirme que le **DDPM** est capable d'induire un effet sur les cellules souches cancéreuses en quiescence. Cependant, cette expérience ne permet pas d'affirmer que c'est uniquement le **DDPM** qui produit l'activité de la molécule sur les cellules souches cancéreuses quiescentes et que le **bisacodyl** n'a d'activité qu'une fois hydrolysé en **DDPM**. Pour tenter d'apporter une réponse, et pour connaitre la cinétique d'action du **bisacodyl** et du **DDPM**, un suivi de l'effet du **bisacodyl** en fonction du temps d'incubation, à différentes concentrations, a été réalisé.

4.4.1.4. Cinétique d'action du bisacodyl et du DDPM

La cinétique d'action du **bisacodyl** et du **DDPM** a été étudiée en testant les deux composés à 10µM sur des cellules TG1 quiescentes à 1h, 2h, 4h, 6h, 10h et 24h d'incubation à 37°C (figure 58). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre la cinétique d'action du **bisadodyl** et celle du **DDPM** (figure 58a.). Pour les deux composés, l'effet sur la survie des cellules est maximal dès 10 heures d'incubation et le temps nécessaire pour obtenir la moitié de l'effet maximum (T½) est de moins de 4 heures (3,8h pour le **bisacodyl** et 4,0h pour le **DDPM**). Les molécules ont également été testées à 1µM, 5µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM en cinétique sur les cellules TG1

quiescentes. Pour 5µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM de **bisacodyl** ou de **DDPM**, aucun changement significatif de la cinétique et du T½ n'est observé (figure 58b.).

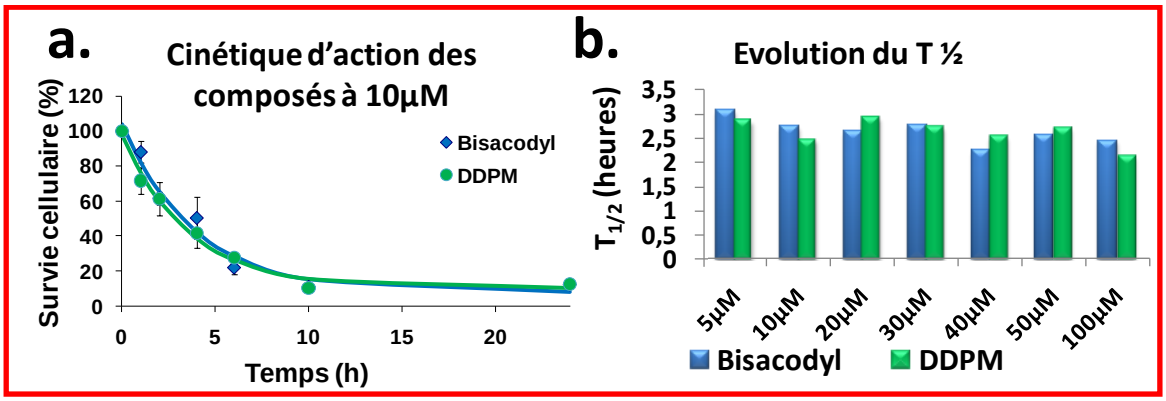


Figure 58 : Cinétique d'action du bisacodyl et du DDPM sur les cellules TG1 quiescentes
Les composés bisacodyl et DDPM sont testés à 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM, et 100µM sur les cellules TG1 en condition de quiescence à 1h, 2h, 4h, 6h, 10h et 24h d'incubation à 37°C. Les courbes sont ajustées avec une courbe exponentielle. Le temps½ (T½), c'est-à-dire le temps pour lequel la moitié de l'effet maximal est atteint pour un composé est calculé d'après l'équation de la courbe exponentielle (T½ ≈ 3,8h pour le bisacodyl et T½ ≈ 4,0h pour le DDPM).
a. Cinétique d'action du bisacodyl et du DDPM à 10µM sur les cellules TG1 quiescentes.
b. Evolution du temps½ en fonction de la concentration en bisacodyl et en DDPM.
nd, non déterminable.

La cinétique d'action du **bisacodyl** est limitée par une étape qui suit une cinétique d'ordre 1. Cette étape n'est pas la dégradation du composé **bisacodyl** en **DDPM** puisque la même cinétique est observée pour le **DDPM** et que le T½ de l'hydrolyse du **bisacodyl** dans le milieu des cellules quiescentes est plus court (T½=2h) que celui de son effet sur la survie cellulaire. Compte tenu de la similitude d'effet entre le **bisacodyl** et son métabolite, le **DDPM**, nous avons, dans la suite de nos études, préférentiellement utilisé le **DDPM**.

Aussi, avant de poursuivre nos études sur l'effet du **DDPM** sur les CSC de glioblastome, et compte tenu de la différence d'effet de la molécule sur les cellules cultivées en condition de prolifération et de quiescence, nous avons réalisé un suivi de leur cinétique d'entrée en quiescence afin de choisir les meilleures conditions d'étude et testé l'évolution du pH du milieu de culture lorsque les cellules sont mises en quiescence.

4.4.1.5. Suivi de différents paramètres relatifs aux cellules et au milieu de culture dans les conditions de mise en quiescence : quiescence, viabilité cellulaire et pH du milieu de culture

L'une des particularités du **bisacodyl** et de son métabolite, le **DDPM** est leur activité sur les CSC en condition de quiescence. La quiescence des cellules est obtenue en laissant les cellules pendant 16 jours dans leur milieu, sans renouveler les nutriments nécessaires à leur prolifération (glucose, facteurs de croissance…) (voir figure 59 et le paragraphe 6.1.1.4 du chapitre matériels et méthodes). Parmi les trois conditions de culture classiquement utilisées pour induire l'entrée en quiescence des cellules, la privation de nutriments et de facteurs de croissance est la seule applicable à nos CSC. En effet, les deux autres conditions sont la perte d'adhérence, or nos cellules poussent en suspension, et la perte d'inhibition de contact, or nos cellules forment des sphères (Coller et al., 2006; Moore and Lyle, 2010).

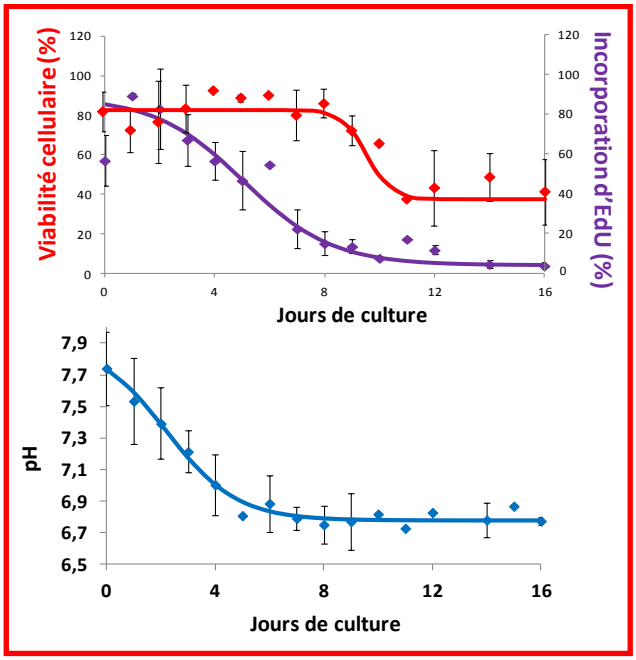


Figure 59 : Suivi de la viabilité et de la prolifération des cellules et évolution du pH du milieu extracellulaire, en fonction du nombre de jours de mise en culture.
Les cellules TG1 sont mises en quiescence au jour 0 qui correspond au jour du dernier passage des cellules. Les cellules sont ensuite maintenues en culture sans changement de leur milieu de culture. La viabilité des cellules (en rouge) est mesurée à l'aide du test d'exclusion du bleu de Trypan. Le taux de prolifération cellulaire (en violet) est mesuré grâce au test Click-iT EdU (Invitrogen™) permettant l'incorporation de l'EdU (éthynyldésoxyribouracile) dans l'ADN, et sa détection grâce à l'Alexa 488 à l'aide du cytomètre capillaire Guava EasyCyte (Millipore™). Le taux de prolifération est calculé en fonction du nombre de cellules incorporant l'EdU dans leur ADN par rapport à la population totale de cellules vivantes. Le pH du milieu extracellulaire est mesuré chaque jour à l'aide d'un pH-mètre (en bleu).

Ces résultats montrent qu'au 9ème jour de mise en culture, les cellules TG1 ont un taux d'incorporation de l'EdU (donc de prolifération) d'environ 10%, alors que la viabilité cellulaire mesurée par exclusion du bleu de trypan est toujours de 80%. Les cellules TG1 avec 8 ou 9 jours de mise en quiescence présentent un avantage au niveau de la viabilité cellulaire par rapport à celles de 16 jours de mise en quiescence car le taux de survie cellulaire à 16 jours de mise en quiescence n'est alors plus que de 35%. Les cellules à 8 ou 9 jours de mise en quiescence seront donc utilisées pour poursuivre nos études.

Lors de l'évaluation de l'effet du DDPM sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence, les conditions expérimentales ne sont pas tout à fait identiques. Le test sur les cellules en prolifération est réalisé dans du milieu frais, alors que les cellules en quiescence sont testées dans le milieu conditionné à 9 ou 16 jours de quiescence. Afin de tester le rôle du milieu de culture dans l'effet du DDPM, nous avons, dans un premier temps, croisé les milieux des CSC en condition de prolifération et de quiescence.

4.4.1.6. Croisement des milieux des cellules TG1 proliférantes et quiescentes

Pour cette expérience des cellules TG1 proliférantes ont été incubées pendant 24h dans le milieu conditionné des cellules quiescentes (c'est-à-dire du milieu qui a été mis en contact avec des cellules TG1 durant 16 jours sans être renouvelé) et réciproquement, des cellules TG1 en quiescence ont été incubées 24h dans le milieu NS34 fraichement préparé en absence et en présence de **DDPM** à différentes concentrations (1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM et 50µM). La figure 60**a** montre un effet plus marqué du **DDPM** sur les cellules TG1 en prolifération lorsque celles-ci sont dans le milieu conditionné des cellules quiescentes (le plateau de survie des cellules proliférantes est de 50% dans le milieu conditionné des cellules quiescentes alors qu'il est de 80 à 70% dans le milieu NS34 frais). A l'inverse, le **DDPM** a un effet moins marqué sur les cellules quiescentes lorsque celles-ci sont dans le milieu NS34 frais (figure 60**b**) (le plateau de survie des cellules quiescentes est de 60% dans le milieu NS34 frais alors qu'il est de 5 à 20% dans le milieu conditionné des cellules quiescentes).

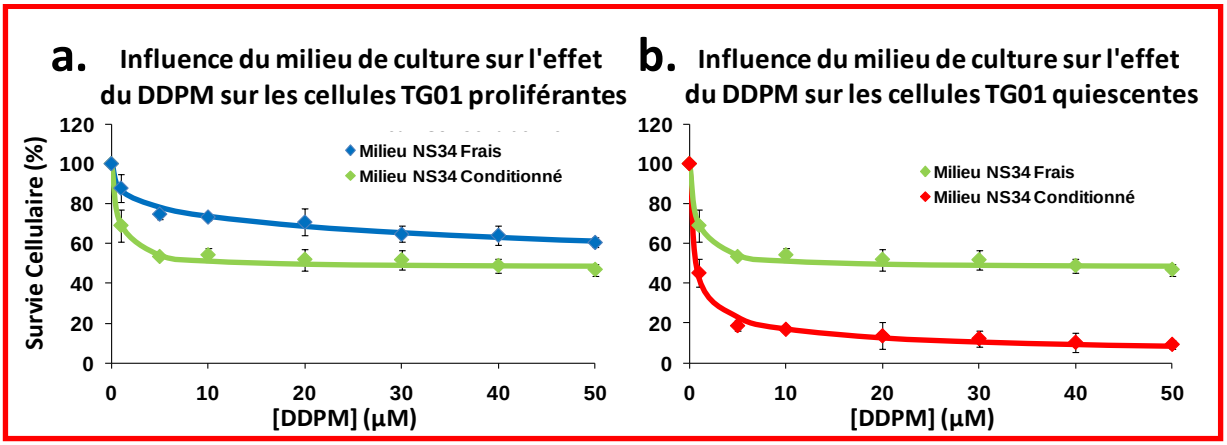


Figure 60 : Influence du milieu de culture sur l'effet du DDPM sur les cellules TG1 proliférantes et quiescentes.
La survie cellulaire est mesurée grâce au test Cell Titer-Glo® (Promega), les valeurs obtenues pour les cellules en présence des composés étant rapportée aux valeurs obtenues pour les mêmes cellules en présence d'1% de DMSO (contrôle négatif).
a. *Les cellules TG1 proliférantes sont incubées 24h en présence de DDPM (1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM et 50µM) dans du milieu NS34 fraichement préparé (courbe bleue) ou dans le milieu conditionné des cellules à 16 jours de mise en quiescence (courbe verte). Des résultats similaires sont obtenus en utilisant du milieu conditionné des cellules à 9 jours de mise en quiescence.*
b. *Les cellules TG1 quiescentes (TG1 Q) sont incubées pendant 24h en présence de DDPM (1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM et 50µM) dans le milieu NS34 fraichement préparé (courbe verte) ou dans leur propre milieu après 16 jours de quiescence (courbe rouge). Des résultats identiques sont observés pour les cellules après 9 jours de quiescence.*

Cette expérience suggère qu'au moins une partie de l'effet du **DDPM** sur les cellules TG1 en quiescence serait dû à un facteur présent dans leur milieu de culture.

Parmi les multiples modifications qui s'opèrent dans le milieu extracellulaire lors de ces 16 jours de maintien en culture, l'un des changements majeurs et directement observables est l'acidification du milieu (l'indicateur coloré contenu dans le milieu de culture vire du rose au jaune). Nous avons donc exploré l'effet du pH sur l'action du DDPM sur les cellules TG1.

4.4.1.7. Changement du pH des milieux des cellules TG1 proliférantes et quiescentes

L'importance du milieu de culture dans l'action du **bisacodyl** et de son métabolite (**DDPM**) sur les cellules souches cancéreuses issues de glioblastome, en prolifération et en quiescence a été démontrée figure 60. Afin de tester l'influence du changement du pH du milieu des CSC proliférantes et quiescentes sur l'effet du **DDPM**, nous avons procédé à

différentes expériences à pH acide (compris entre 6,3 et 6,6) et à pH physiologique (compris entre 7,2 et 7,4) notamment :

- ⇒ Incubation des cellules en présence de DDPM dans le milieu conditionné à pH ≈ 6,6
- ⇒ Incubation des cellules en présence de DDPM dans le milieu conditionné, mais le pH de celui-ci est amené à 7,4
- ⇒ Incubation des cellules en présence de DDPM dans le milieu NS34 fraichement préparé à pH 7,4
- ⇒ Incubation des cellules en présence de DDPM dans le milieu NS34 fraichement préparé dont le pH a été fixé à 6,5.

La figure 61a. montre que le pH joue un rôle dans l'effet du **DDPM** sur les cellules TG1 proliférantes. L'acidification du milieu sensibilise les cellules au **DDPM**. En effet, le plateau de survie des cellules proliférantes est amené à 50% dans le milieu NS34 fraichement préparé acide (pH 6,6) et à 70% dans le milieu conditionné des cellules quiescentes (pH 6,7), alors qu'il est à 90% et à 80% dans les milieux NS34 fraichement préparé (pH 7,4) et dans le milieu conditionné des cellules quiescentes amené à pH 7,4.

La figure 61b. montre le rôle essentiel du pH dans l'action du **DDPM** sur les cellules TG1 quiescentes (à 9 jours de mise en quiescence). A pH 7,4 dans le milieu des cellules proliférantes ou dans le milieu des cellules quiescentes, la molécule a un effet faible sur les cellules en quiescence (plateau de survie d'environ 50 à 60%), alors que son activité est plus importante lorsque les milieux sont à pH 6,6 (plateau de survie de 10 à 20%).

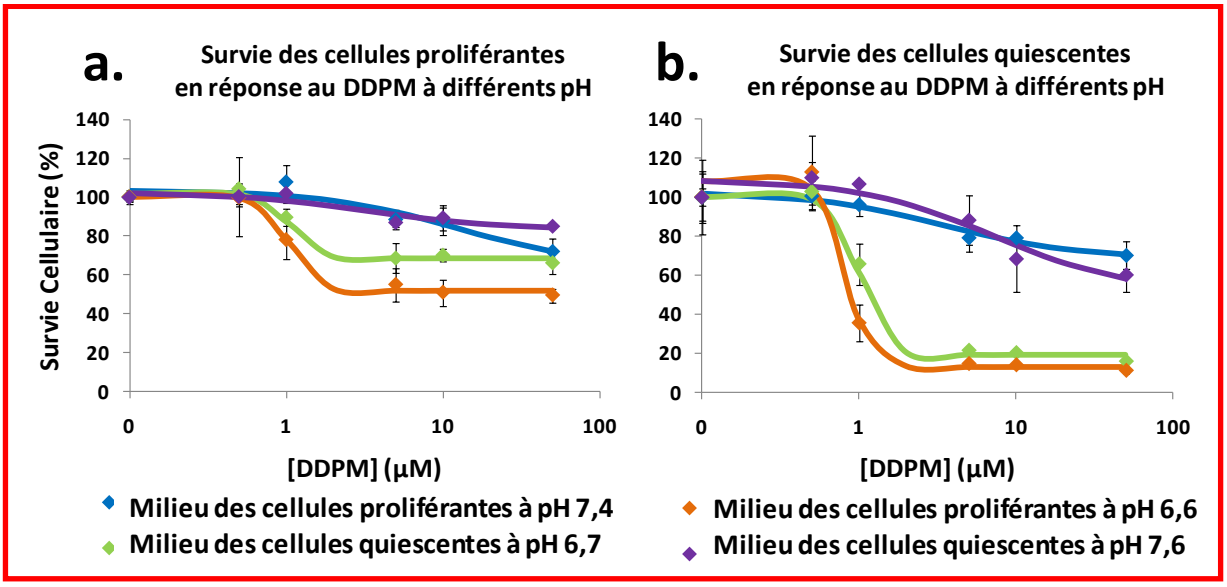


Figure 61 : Etude de la survie des cellules TG1 proliférantes et quiescentes traitées au DDPM en fonction du pH.
Le DDPM a été testé sur les cellules TG1 proliférantes (a.) et sur les cellules quiescentes laissées pendant 9 jours sans changement de milieu (b.). Les conditions testées sont le milieu NS34 frais à pH7,4 (en bleu) et à pH6,6 (en orange) et le milieu conditionné des cellules quiescentes à pH 6,7 (en vert) et à pH7,6 (en violet).
Les cellules sont incubées pendant 24h dans les différentes conditions à différentes concentrations de DDPM (0,5µM, 1µM, 5µM, 10µM et 50µM). La survie cellulaire des cellules traitées avec le DDPM est exprimée en pourcentage par rapport aux mêmes cellules traitées avec 1% de DMSO (contrôle négatif). La survie cellulaire est mesurée à l'aide du Cell Titer-Glo® (Promega).

Cette expérience montre que les cellules TG1 proliférantes semblent plus résistantes au **DDPM** que les cellules quiescentes dans les mêmes conditions et que le pH est un facteur nécessaire pour avoir un effet marqué du **DDPM** sur les cellules TG1, quelles soient en prolifération ou en quiescence. Nos résultats montrent d'ailleurs que les cellules TG1 sont particulièrement résistantes aux variations du pH du milieu extracellulaire, puisque la viabilité cellulaire (sur les 24 heures de l'expérience) n'est pas modifiée par les changements de pH.

4.4.1.8. Effet apoptotique du DDPM sur les cellules TG1

Dans une première approche de la compréhension du mécanisme par lequel le **DDPM** induit la mort des cellules TG1 en prolifération et en quiescence dans le milieu acide, un test de l'activité des caspases-3/7 a été réalisé après avoir traité les cellules avec du **DDPM**. Les caspases-3 et 7 sont les deux caspases effectrices de l'apoptose (figure 62) (Boatright and Salvesen, 2003).

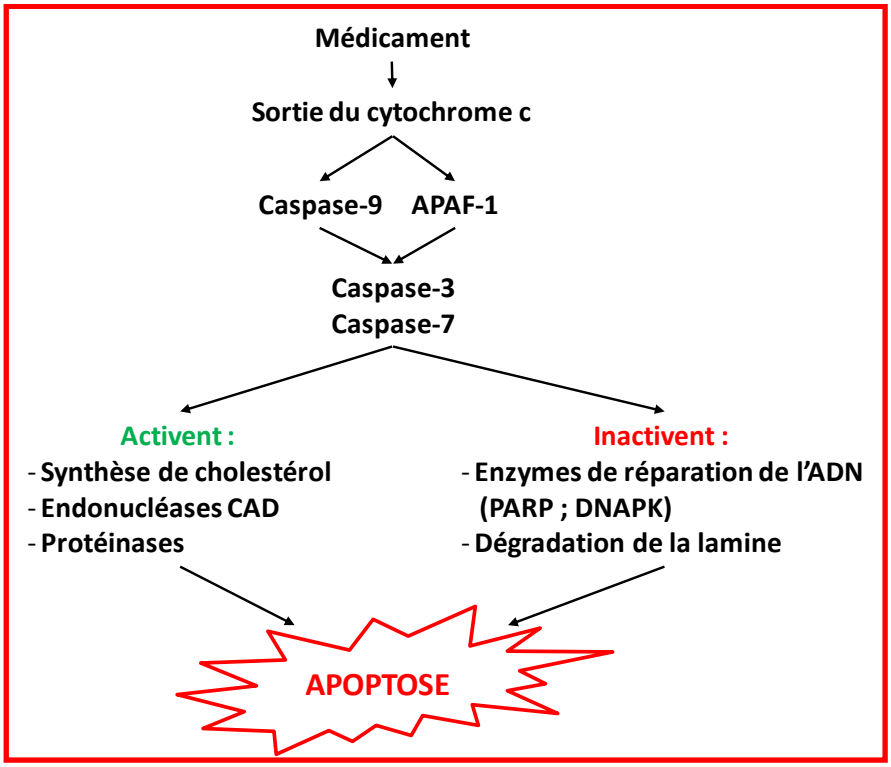


Figure 62 : Rôle des caspases 3 et 7 dans l'apoptose cellulaire.
Une molécule induisant l'apoptose agit sur une cellule. Celle-ci répond par la sortie de cytochrome c, qui va activer les caspases 9 et APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1). Ces deux protéines activent à leur tour les caspases 3 et 7 qui augmentent la synthèse de cholestérol afin de stabiliser la membrane plasmique, active les endonucléases CAD (caspase activated desoxyribonucleases) qui fragmentent l'ADN et les protéinases qui dégradent les protéines et le cytosquelette. Les caspases 3 et 7 inactivent les enzymes intervenant dans la réparation de l'ADN telles que DNAPK (DNA dependant kinase) et PARP (polyADP Ribose Polymerase). Enfin, la caspase 3 déstabilise l'architecture nucléaire, favorisant de fait l'action des endonucléases en dégradant la lamine B. Ces mécanismes aboutissent à l'apoptose.

Les cellules TG1 en prolifération et les cellules TG1 à 9 jours de mise en quiescence ont été traitées à différentes concentrations de **DDPM** (0,5µM, 1µM, 5µM, 10µM et 50µM) dans le milieu NS34 fraichement préparé à pH 7,3 et dans ce même milieu à pH 6,4. L'activité des caspases 3/7 est plus élevée d'environ 5 fois pour les cellules TG1 en quiescence par rapport aux cellules TG1 en prolifération (contrôle négatif 1% DMSO) (figure 63). Cependant, l'activité des caspases ne semble pas modifiée par l'acidité du milieu dans les cellules traitées avec 1% de DMSO qui servent de contrôle. L'augmentation de l'activité caspases dans les cellules quiescentes pourrait être liée à l'augmentation de la mortalité des cellules qui se met en place à partir du 9ème/10ème jour de mise en quiescence. Lorsque les cellules sont traitées par le **DDPM** à pH 7,3, aucune modification de l'activité des caspases 3/7 n'est observée (figure 63 a. et b.). A pH acide (6,4), le **DDPM** induit une augmentation de l'activité des caspases 3/7 dans les cellules TG1 en prolifération et en quiescence.

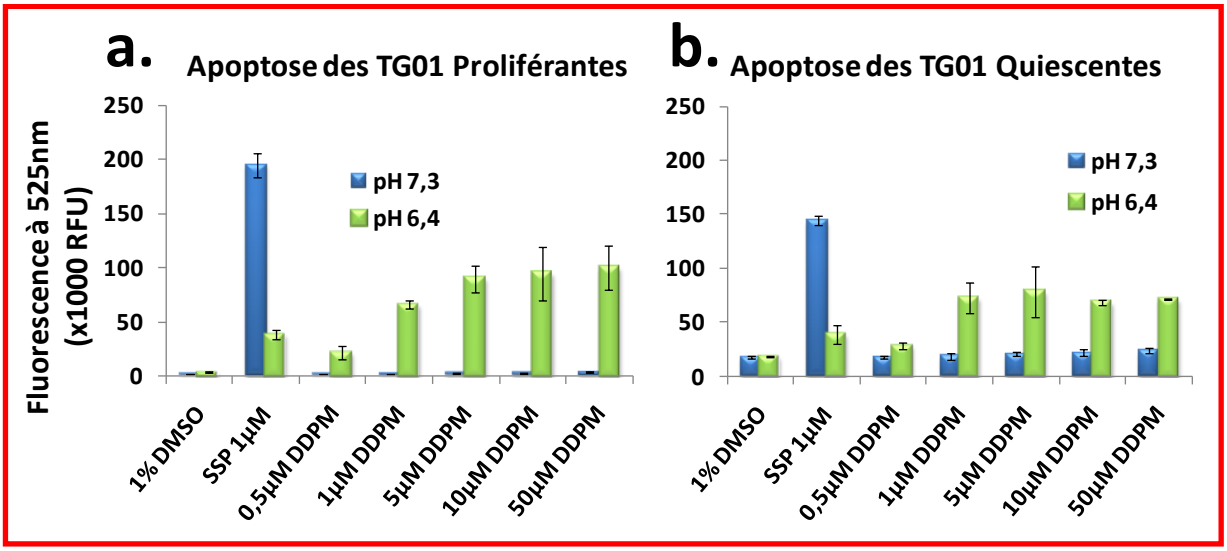


Figure 63 : Apoptose induite par le DDPM sur les cellules TG1 proliférantes et quiescentes en fonction du pH.
Les cellules TG1 proliférantes et les cellules TG1 à 9 jours de mise en quiescence sont traitées à différentes concentrations de DDPM (0,5µM, 1µM, 5µM, 10µM et 50µM) pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite traitées avec le réactif du kit Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay de Promega pendant 4heures puis la fluorescence est lue au fluorimètre Victor 3 (Perkin Elmer, Inc.). Le contrôle positif est donné par les cellules traitées avec 1µM de staurosporine (SSP) le contrôle négatif par les cellules traitées avec 1% de DMSO. Le signal fluorescent des cellules est corrigé par rapport à la fluorescence basale du milieu seul.
a. *Signal fluorescent corrigé par rapport à la fluorescence basale pour les cellules TG1 en prolifération à pH 7,3 (en bleu) et à pH 6,3 (en vert).*
b. *Signal fluorescent corrigé par rapport à la fluorescence basale pour les cellules TG1 en quiescence à pH 7,3 (en bleu) et à pH 6,3 (en vert).*

Ces observations sont à rapprocher de celles concernant l'effet du **DDPM** sur le plateau de survie des cellules TG1 proliférantes et quiescentes et suggèrent qu'au moins une partie de l'effet toxique du **DDPM** sur la survie des cellules TG1 en milieu acide, passe par une stimulation des mécanismes d'apoptose. Il est à noter que la staurosporine, utilisée comme témoin positif pour l'apoptose, voit son effet diminuer en milieu acide. Dans la littérature, une diminution de l'effet de certaines molécules anticancéreuses en milieu acide (pH du microenvironnement tumoral) a été rapportée. La plupart de ces molécules sont des bases faibles qui ne sont pas retenues au niveau des tumeurs (McCarty and Whitaker, 2010).

Si l'acidification du milieu des cellules TG1 sensibilise ces cellules à l'action du **DDPM**, une acidification du milieu des cellules pourrait donc sensibiliser d'autres cellules au **bisacodyl** et au **DDPM**, son métabolite. Afin de tester cette hypothèse, des courbes dose-réponse à différentes concentrations de **DDPM** sur les lignées cellulaires f-NSC, U-87 MG et sur les astrocytes humains, ont été réalisées en milieu acide (pH≈6,4).

4.4.1.9. Effet du DDPM sur les cellules f-NSC, U-87 MG et HA en milieu acide

Nos premières expériences, menées sur l'effet du **bisacodyl** et du **DDPM** sur les cellules autres que les CSC, avaient montré l'absence d'effet de la molécule sur les cellules f-NSC et les cellules U-87 MG, et un effet limité sur les astrocytes humains (HA) (figure 53 et figure 57). Ces cellules avaient été testées dans leur milieu de culture « normal » à pH 7,5. Suite aux résultats obtenus sur les cellules TG1 et au rôle du pH dans l'effet du **bisacodyl** et de son métabolite, le **DDPM**, nous avons testé l'effet du **DDPM** sur ces différentes cellules à pH 6,4 en parallèle d'une étude de leur viabilité à ce pH.

Une première analyse montre que les cellules f-NSC sont sensibles à l'environnement acide même en l'absence de traitement par le **DDPM** (figure 64**a**). Ainsi, le témoin négatif, constitué des cellules f-NSC en milieu NSC à pH 6,4 en présence d'1% de DMSO voit sa viabilité diminuer de 6,5 fois par rapport aux mêmes cellules dans le milieu NSC à pH 7,5 et en présence d'1% de DMSO (figure 64a). Le **DDPM** accentue encore la mort des cellules f-NSC en milieu acide (courbe verte), avec une mortalité de 95% des cellules pour une concentration en **DDPM** de 5µM ($EC_{50} \approx 1,7$µM) (figure 64**b**).

Contrairement aux cellules f-NSC, les cellules U-87 MG (figure 64**c**) et les astrocytes humains (HA) (figure 64**e**) résistent bien à l'acidification de leur milieu (diminutions des viabilités respectives de 1,3 et 1,6 fois). En milieu acide, les deux types cellulaires ont une sensibilité au **DDPM** plus forte qu'en milieu à pH 7,3 (figure 64 d et f). En effet, les cellules U-87 MG ont un EC_{50} d'environ 3µM en milieu à pH 7,3 et à pH 6,4, mais le plateau de survie cellulaire est de 80% à pH 7,4, alors qu'il est inférieur à 20% à pH 6,4. Les astrocytes humains ont un EC_{50} inférieur à 1µM à pH 7,4 et 6,4, mais les plateaux de survie cellulaire sont de 50% à pH 7,4 et 5% à pH 6,4.

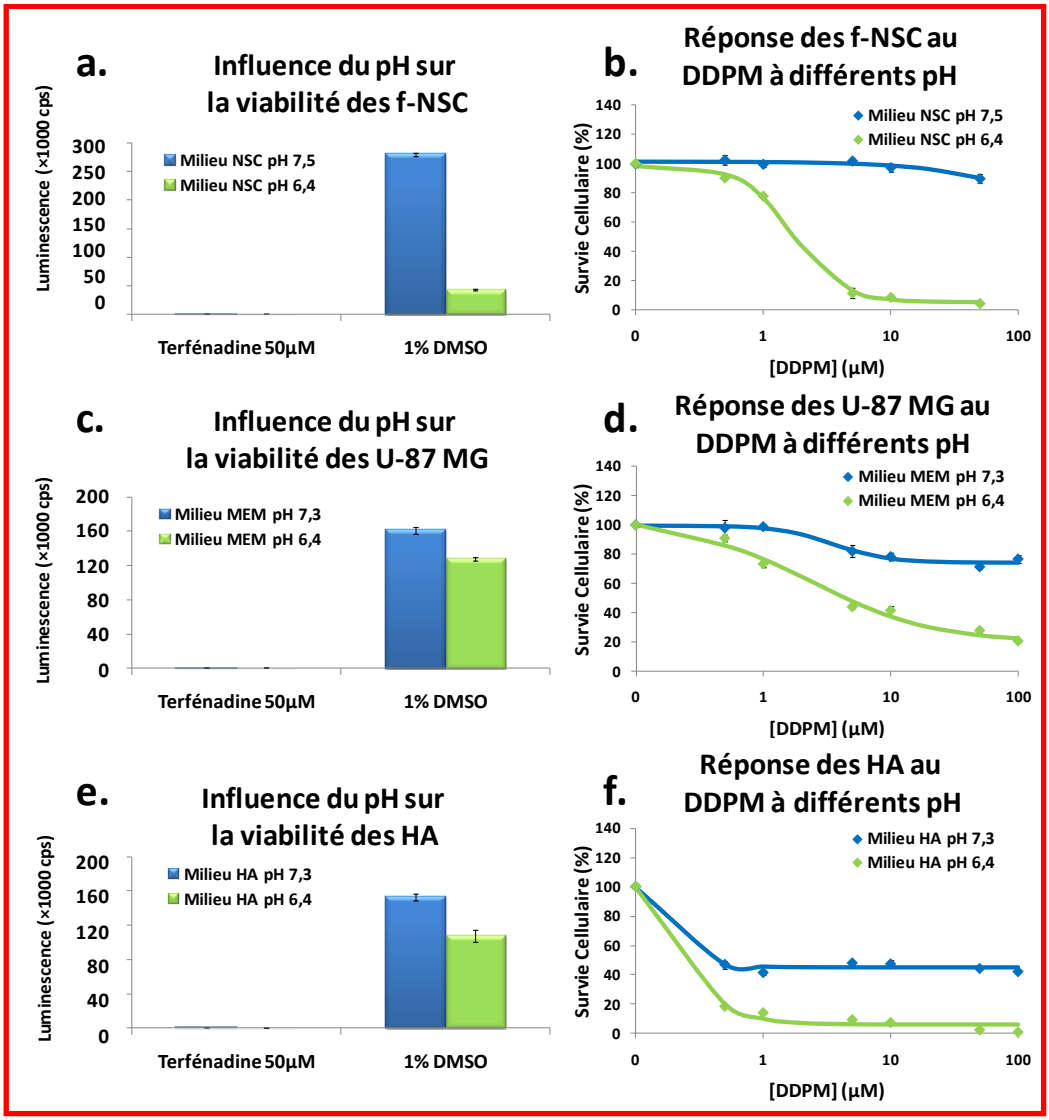


Figure 64 : Réponse des cellules f-NSC, U-87 MG et HA au DDPM en fonction du pH du milieu extracellulaire.
Des cellules souches neurales fœtales (f-NSC) (figures a. et b.), des cellules de la lignée de glioblastome (U-87 MG) (figures c. et d.) et des astrocytes humains (HA) (figures e. et f.) sont incubés dans leurs milieux de culture respectifs à pH≈7,4 ou après acidification de ce milieu à pH 6,4, pendant 24 h à différentes concentrations de DDPM (0,5µM, 1µM, 5µM, 10µM, 50µM et 100µM). Les contrôles positifs pour la viabilité sont donnés par des cellules traitées avec 50µM de terfénadine en milieu à pH 7,4 ou 6,4. Le contrôle négatif est donné par des cellules traitées avec 1% de DMSO en milieu à pH 7,4 ou 6,4 (figures a., c. et e.). La survie cellulaire des cellules traitées avec le DDPM est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle négatif et mesurée à l'aide du kit Cell Titer-Glo® (Promega). Le signal lumineux (luminescence) est exprimé en coups par secondes (cps) et mesuré à l'aide du luminomètre Victor 3 (Perkin Elmer Inc.) (figures b., d. et f.).

En conclusion, nos résultats suggèrent que deux facteurs peuvent intervenir dans la cytotoxicité du **bisacodyl** et de son métabolite actif, le **DDPM** sur les CSC issues de glioblastomes. L'acidité du milieu extracellulaire et l'état non prolifératif (quiescent) des

cellules souches cancéreuses sensibilisent les CSC de glioblastome à ces composés. Le **DDPM** est également capable à pH acide d'induire la mort des cellules non souches et/ou non cancéreuses de la lignée des cellules neurales. Nos résultats suggèrent également que le mécanisme d'action du métabolite **DDPM** passe au moins en partie, par la voie apoptotique.

4.4.2. Etude de relation structure-activité

Afin de définir les groupements chimiques nécessaires à l'activité du **bisacodyl** et de son métabolite le **DDPM**, une collaboration a été établie avec les chimistes du laboratoire. Les différentes modifications structurelles des molécules ont été réalisées par le Dr Samir Mameri. Les effets des composés préparés, sur les cellules TG1 en condition de prolifération et de quiescence ont été testés selon les conditions habituelles (concentration en composé de 1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM) et la détection de la luminescence se fait à l'aide du kit Cell Titer-Glo® de Promega.

L'étude de relation structure-activité (RSA) est basée sur des modifications de la structure de base du **bisacodyl** (figure 65). Précisément, notre travail a consisté à modifier la molécule au niveau des groupements R1 et R2, ainsi qu'au niveau de la pyridine (cycle A). Plusieurs familles de composés ont ainsi été préparés afin de définir les fonctions de choix et les positions libres également exploitables pour la fonctionnalisation de la molécule avec un fluorophore afin de localiser la molécule dans la cellule, ainsi que pour une immobilisation sur des surfaces (ex : Affigel) pour permettre l'identification de la, ou des protéine(s) cible(s).

La dénomination des molécules de la série est **GSC-xxx**. Le **bisacodyl** et son métabolite, le **DDPM** correspondent dans cette nomenclature à **GSC-001** et **GSC-002** respectivement.

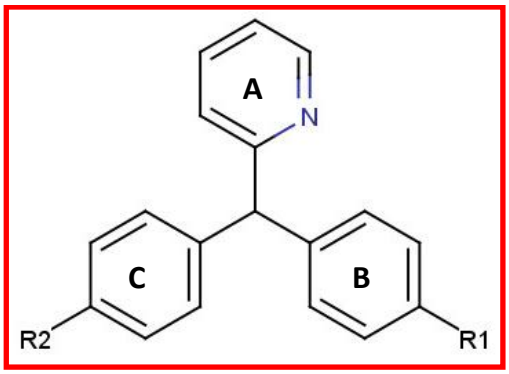


Figure 65 : Structure de base exploitée pour l'étude RSA du bisacodyl

4.4.2.1. Importance des groupements R1 et R2

Le **bisacodyl** présente deux fonctions acétyle (-$OCOCH_3$) en R1 et en R2 des cycles phényle. Le **DDPM**, produit d'hydrolyse des esters, offre deux fonctions hydroxyles (-OH) salifiables. Les résultats biologiques montrent une activité similaire de ces deux composés vis-à-vis des CSC en prolifération et en quiescence. L'hydrolyse sélective du **bisacodyl** dans des conditions douces (LiOH en milieu hydroorganique) a permis d'isoler l'analogue mono-phénolique **GSC-006** qui a la propriété d'être dissymétrique (R1 ≠ R2), avec une chiralité au niveau du carbone tertiaire (point de connexion des cycles aromatiques).

L'analyse HPLC (chromatographie liquide haute performance) du **bisacodyl** révèle sa disparition progressive au profit de deux pics successifs (voir section 4.4.1.2 : Stabilité du bisacodyl p.156). Ainsi, le mécanisme d'hydrolyse du **bisacodyl** en **DDPM** se déroule dans des conditions cinétiques plutôt lentes (T½ ≈ 4h dans les milieux des cellules en prolifération et en quiescence), en passant par le composé **GSC-006**.

L'activité biologique de **GSC-006** sur les CSC en prolifération et en quiescence est similaire à celle du **DDPM** et du **bisacodyl**. Les EC_{50} de ces molécules sur les cellules TG1 quiescentes sont proches d'1µM pour les CSC en condition de quiescence (tableau 15).

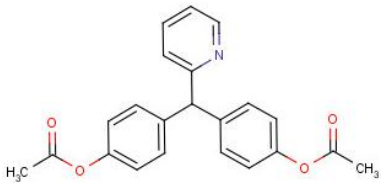
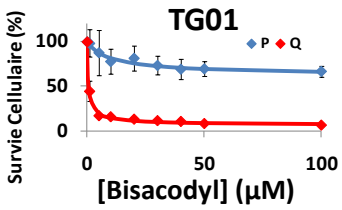
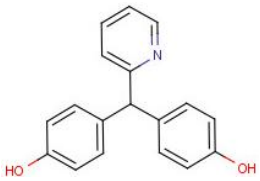
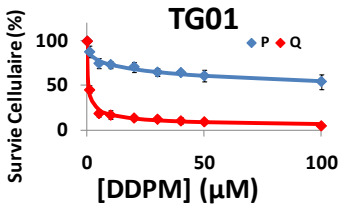
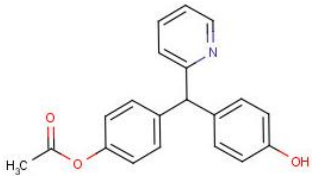
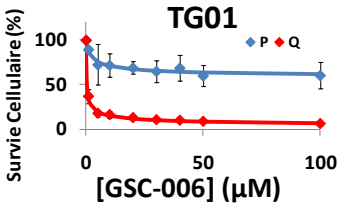
Noms	Structure	Effet sur TG1 P et Q	EC50 TG1 Q
Bisacodyl = GSC-001			**1,5 ± 0,3µM**
DDPM = GSC-002			**1,0 ± 0,5µM**
GSC-006			**1,0 ± 0,5µM**

Tableau 15 : Effet de dérivés hydrolysables du bisacodyl sur les cellules TG1 en prolifération (P) et en quiescence (Q)

Afin de tester l'importance des fonctions hydroxyles, les radicaux phénols ont été convertis en éthers non hydrolysables. La méthode générale de synthèse a consisté à mettre en réaction le bisacodyl ou son analogue partiellement hydrolysé (GSC-006) avec l'agent d'alkylation (iodure d'alcane) en présence d'hydrure de sodium (NaH, base forte). Plusieurs molécules ont ainsi été synthétisées. En particulier, le composé symétrique **GSC-017** avec ses deux groupements méthoxy (-OCH_3) en R1 et R2. De manière intéressante, la toxicité sur les cellules TG1 en quiescence est annihilée (tableau 16), ce qui révèle l'importance des fonctions alcools sous leur forme libre. En outre, les chaines carbonées ont été rallongées avec 3 carbones (**GSC-026**), 5 carbones (**GSC-031**) et 9 carbones (**GSC-032**), ce qui confère à ces nouveaux analogues une lipophilie augmentée par rapport à **GSC-017** et au **bisacodyl**. Aucune de ces molécules ne semblent être toxique sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence (concentrations allant jusqu'à 100µM en composé).

Ensuite, des molécules présentant deux fonctions non hydrolysables de type anilines libres (-NH2 ; **GSC-046**) ou fonctionnalisées (-NHAc ; **GSC-048**) ont été préparées et testées sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. Aucun de ces analogues n'affiche une quelconque activité *in vitro* (tableau 16).

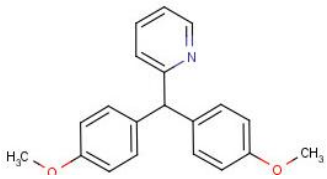
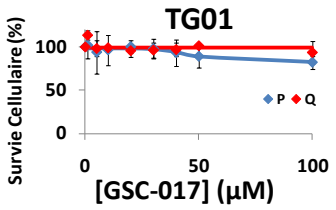
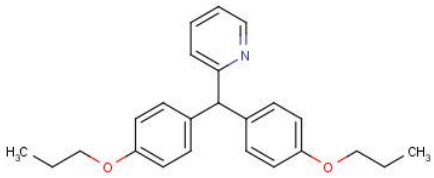
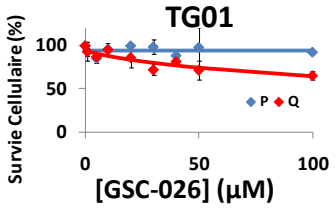
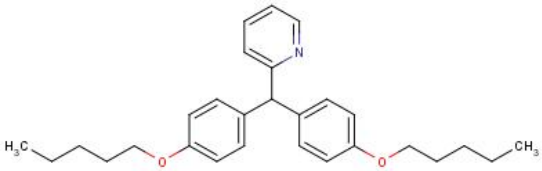
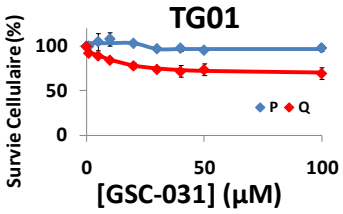
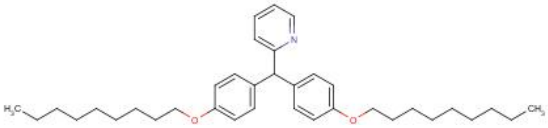
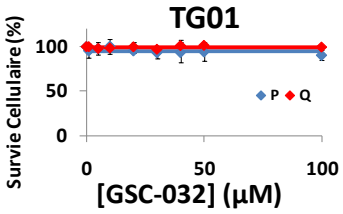
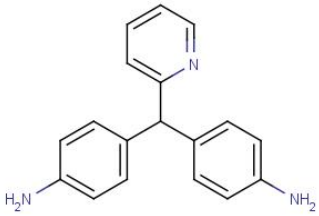
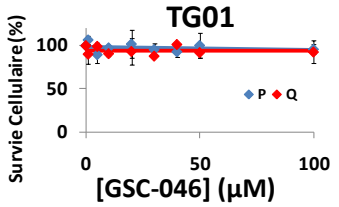
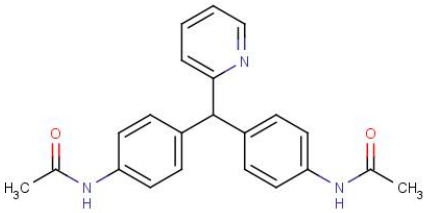
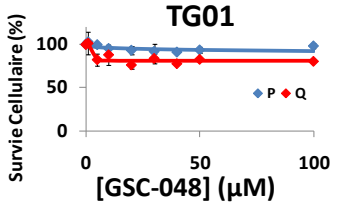
Noms	Structure	Effet sur TG1 P et Q
GSC-017		
GSC-026		
GSC-031		
GSC-032		
GSC-046		
GSC-048		

Tableau 16 : Analogues symétriques non hydrolysables du bisacodyl

Les résultats obtenus avec les différents analogues non hydrolysables synthétisés au laboratoire soulignent le rôle essentiel des groupements hydroxyles dans l'action de la molécule sur les cellules TG1 quiescentes.

Cependant, nous avons montré que l'effet cytotoxique sur les cellules TG1 quiescentes peut être conservé par la présence d'une seule fonction alcool (phénol) comme reflété par les exemples regroupés dans le tableau 17. Ainsi, le composé **GSC-018** mono-esthérifié avec un groupement méthoxy ($-OCH_3$), conserve un effet sélectif sur les cellules quiescentes (en milieu acide). L'EC_{50} est toutefois supérieur à celui du **DDPM** (8±6 µM pour **GSC-018** contre 1±0,5 µM pour le **DDPM**). Le composé **GSC-045** présente (au groupement phénol) un éthylène glycol avec une fonction amine primaire terminale ($-OC_2H_4OC_2H_4OC_2H_4NH_2$) convenable pour une fonctionnalisation avec un fluorophore pour l'identification de sa localisation cellulaire ou pour une immobilisation sur des surfaces (ex : Affigel) pour identifier la (les) protéines cibles. De manière intéressante, ce composé conserve également un effet sélectif pour les cellules quiescentes, avec un EC_{50} de 6µM, supérieur à celui du **DDPM**.

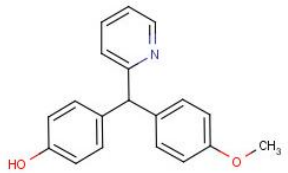
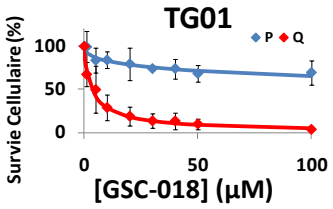
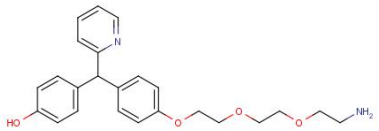
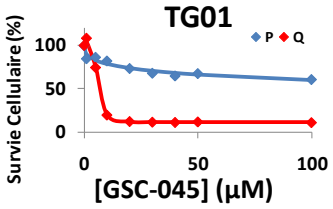
Noms	Structure	Effet sur TG1 P et Q	EC50 TG1 Q
GSC-018			**8 ± 6 µM**
GSC-045			**6 µM**

Tableau 17 : Analogues dissymétrique non hydrolysables du DDPM sélectifs pour les cellules TG1 en quiescence (Q)

Un composé qui porte une fonction alcane en C_9 (**GSC-033**) présente un effet avec un EC_{50} d'environ 25µM sur les cellules TG1 proliférantes et quiescentes. Le profil d'action de **GSC-033** est à comparer à celui obtenu avec l'analogue bis-alkylé GSC-032 qui n'affiche aucune activité sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. Ainsi, cela renforce raisonnablement la nécessité pour une molécule de conserver au moins une fonction hydroxyle (-OH) en R1 ou R2 pour garder une sélectivité sur les cellules en quiescence (milieu acide) par rapport aux cellules en prolifération (milieu à pH 7,4).

Le composé **GSC-028** présente une fonction hydroxyle (-OH) et un groupement alcyne ($-OCH_2CCH_3$) en R1 et R2 respectivement. La fonction alcyne est un point d'ancrage

pratique pour un couplage avec un fluorophore au moyen de la réaction largement explorée et dite de « click chemistry ». Ce nouvel analogue présente un effet intermédiaire par rapport aux effets du **DDPM** et de **GSC-033**. En effet, cette molécule induit également un effet total (100% de toxicité pour les cellules TG1, à son effet maximal de 100µM) et a un EC_{50} d'environ 3µM sur les cellules TG1 quiescentes, mais d'environ 39µM sur les cellules TG1 proliférantes.

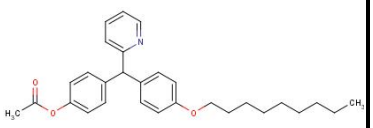
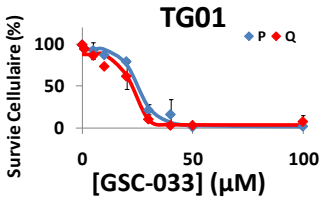
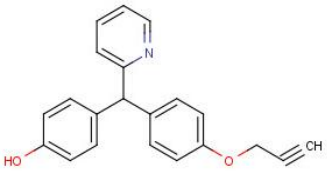
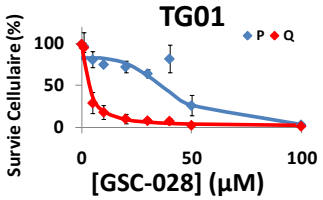
Noms	Structure	Effet sur TG1 P et Q	EC50 TG1 P	EC50 TG1 Q
GSC-033			**23±1 µM**	**22±2 µM**
GSC-028			**39±6 µM**	**3±1 µM**

Tableau 18 : Molécules ayant un groupement hydroxyle ou hydrolysable et un groupement non hydrolysable actives sur les cellules TG1 proliférantes (P) et sur les cellules quiescentes (Q).

Sur la base des différents exemples précédents, il est raisonnable de suggérer que la présence d'une fonction hydroxyle (-OH) suffit à rendre la molécule (analogue du **bisacodyl**) active sur les cellules TG1 en prolifération ou en quiescence. Cependant, toutes les molécules remplissant cette condition ne sont pas pour autant actives sur les cellules TG1 en prolifération ou en quiescence. Par exemple, l'éther de glycol **GSC-041** est une molécule conçue originalement pour fixer un fluorochrome à l'extrémité de la chaine éther. De manière surprenante, ce composé n'a pas d'activité cytotoxique sur les cellules TG1 en prolifération ou en quiescence bien que sa structure soit proche de celle du **GSC-045** qui est sélectivement active sur les cellules TG1 quiescentes. Comme la seule différence entre les deux molécules réside dans la fonction chimique portée par la chaine polyglycol ($-NH_2$ ou -OH), la question de la solubilité de **GSC-041** peut être évoquée pour expliquer la différence d'action observée.

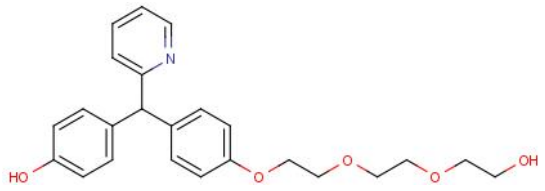
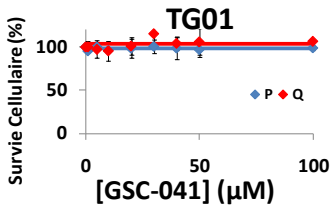
Noms	Structure	Effet sur TG1 P et Q
GSC-041		

Tableau 19 : Analogue dissymétrique non hydrolysable du DDPM non actif sur les cellules TG1 en prolifération (P) ou en quiescence (Q)

Comme le remplacement des fonctions hydroxyles (-OH) par des amines primaires (-NH2) prive la molécule de son activité, voire de sa sélectivité, ces résultats suggèrent qu'au moins une fonction hydroxyle (-OH) ou précurseur de celle-ci (facilement clivable) est nécessaire à l'activité du composé sur les cellules TG1. L'absence de groupement lipophile sur l'un des phényles en R1 ou R2 est une nécessité pour la sélectivité d'action sur les cellules TG1 quiescentes, ou pour leur action sélective en milieu acide. De plus, les molécules possédant une fonction hydroxyle (-OH) ainsi qu'un groupement lipophile en R1 et R2 changent radicalement d'effet sur les cellules TG1 proliférantes et quiescentes, ce qui peut suggérer un changement de la cible moléculaire, ayant pour conséquence la mort des cellules proliférantes et quiescentes indépendamment du pH du milieu extracellulaire. Enfin, le remplacement des groupements acétyles (-OAc) du **bisacodyl** par des amides primaires (-NHAc) entraine une inactivité de la molécule (**GSC-048**). En somme, l'hydrolyse du **bisacodyl** en **DDPM** est nécessaire pour cet effet sur les cellules TG1 quiescentes et en milieu acide.

4.4.2.2. Importance de l'azote de la pyridine

Afin de déterminer l'importance de la pyridine (cycle A, figure 65), notamment de son azote et de la position de celui-ci dans le cycle, d'autres analogues du **DDPM** ont été synthétisés.

Les isomères de position **GSC-003** (méta) et **GSC-004** (para) sont tous deux actifs et sélectifs pour les cellules TG1 en quiescence (tableau 20). Cependant, une baisse de l'activité de la molécule est observée lorsque l'azote est placé en position méta ($EC_{50} \approx 8\mu M$) et encore d'avantage lorsqu'il est placé en position para ($EC_{50} \approx 40\mu M$). L'oxydation de l'azote par la liaison de son doublet libre avec un groupement méthyle (**GSC-011**) bloque l'action de la molécule sur les cellules TG1 en quiescence ou dans le milieu acide. D'autre

part, la fixation d'une amine primaire (-NH_2) en position ortho de l'isomère portant l'atome d'azote en position méta (**GSC-047**) réduit l'efficacité de la molécule sur les cellules TG1 en quiescence ou dans un milieu acide (EC_{50} ≈ 32µM).

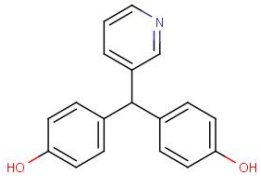
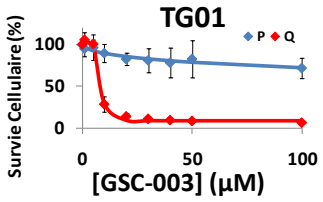
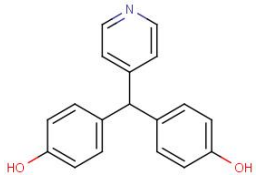
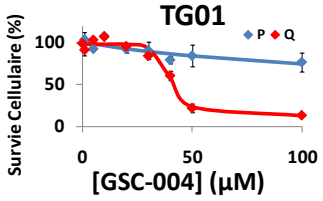
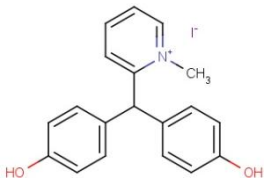
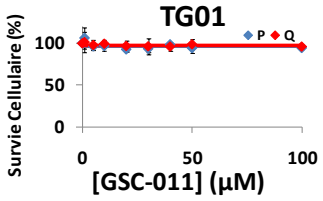
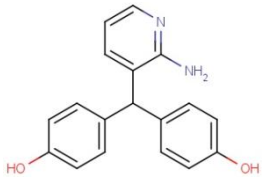
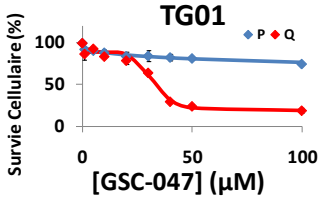
Noms	Structure	Effet sur TG1 P et Q	EC50 TG1 Q
GSC-003			**8±3 µM**
GSC-004			**39±2 µM**
GSC-011			**Ø**
GSC-047			**32±2 µM**

Tableau 20 : Analogues du DDPM modifié au niveau de la pyridine (cycle A) et activité sur les cellules TG1 en prolifération (P) et en quiescence (Q)

Ces résultats montrent que la position de l'azote de la pyridine est également un critère essentiel pour l'optimisation de l'efficacité de la molécule. Par ailleurs, la conversion de la pyridine en pyridinium (**GSC-011**) prive la molécule de son efficacité sur les cellules TG1 quiescentes ou en milieu acide, ce qui confirme que l'azote joue également un rôle essentiel dans l'activité de la molécule sur les cellules TG1 quiescentes ou en milieu acide. En revanche, l'azote placé en position méta et offrant un groupement amine en position ortho n'empêche aucunement l'activité totale de la molécule.

Ces résultats sont très encourageants et ouvrent des perspectives nouvelles pour la préparation de nouveaux analogues, pour le renforcement de la solubilité de la molécule,

pour la fixation d'un fluorophore afin de localiser la molécule dans la cellule, et pour l'immobilisation de la molécule sur des surfaces afin d'identifier la cible moléculaire.

4.5. Discussions / Perspectives

Le criblage de la chimiothèque Prestwick® s'inscrit dans un programme d'étude des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes par une approche de chimie biologie. Ce programme vise à utiliser les petites molécules chimiques afin d'améliorer la compréhension des propriétés et du fonctionnement des cellules souches cancéreuses dans le but d'améliorer les thérapies qui ciblent les glioblastomes. La découverte des CSC au sein des glioblastomes a jeté une vision nouvelle sur le développement des glioblastomes. La résistance des CSC aux chimiothérapies et radiothérapies classiques serait à l'origine des rechutes des glioblastomes après traitement. Cette propriété fait des CSC une cible à ne pas négliger dans le traitement des glioblastomes.

Un criblage primaire de la chimiothèque Prestwick®, en utilisant des CSC issues de glioblastomes (cellules TG1) en prolifération et en quiescence (Q16), a mis en évidence 103 molécules actives sur les CSC issues de glioblastome TG1, soit en ayant un effet hyperprolifératif, soit en ayant un effet toxique. Ainsi, 9,2% des molécules de la chimiothèque Prestwick® sont actives sur les CSC TG1. Ce taux est cohérent avec des données issues de la littérature. Ainsi, l'équipe de Lander a criblé 16000 composés sur des cellules cancéreuses mammaires ayant subi une transition épithélio-mésenchymateuse et donc un enrichissement en cellules souches. Parmi ces 16000 composés, environ 10% étaient actifs pour réduire la viabilité des cellules, mais seulement 0,2% de la chimiothèque agissaient de manière spécifique sur des cellules ayant subi une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (et donc une population cellulaire enrichie en cellule présentant des propriétés souches) par rapport aux mêmes cellules n'ayant pas subi de TEM (Gupta et al., 2009). L'équipe de Dirks quant à elle a criblé 1267 composés (chimiothèque LOPAC de Sigma®) sur des cellules souches neurales non cancéreuses murines. L'étude montre que 12,6% des composés inhibent significativement la prolifération de ces cellules (Diamandis et al., 2007). Plus récemment, l'équipe de Kornblum a publié un criblage de 31624 composés sur des cellules souches issues de glioblastomes (Visnyei et al., 2011b). Le criblage primaire de toutes ces molécules par un test évaluant la quantité d'ATP dans les puits, a mis en évidence 694 composés actifs sur les cellules souches cancéreuses issues de glioblastome, soit seulement 2,2% des molécules testées. La proportion de composé actif par rapport au nombre de composé testés lors de notre criblage, montre que les conditions choisies pour le

criblage primaire sont correctes puisqu'elles permettent de mettre en évidence un nombre de composés acceptable pour des tests plus approfondis.

Les 103 molécules actives issues du criblage primaire ont été retestées lors du criblage secondaire. Un taux de confirmation des touches d'environ 50%, a été observé. Ce taux est relativement faible comparé à d'autres études qui ont également réalisé un criblage secondaire. Ainsi, l'équipe de Dirks a obtenu un taux de confirmation des touches de 93% (Diamandis et al., 2007). Cependant, cette équipe a choisi 43 molécules représentatives des 160 touches obtenues lors de leur criblage primaire alors que nous avons choisi de retester les 103 touches obtenues lors de notre criblage primaire. L'équipe de Kornblum dans son criblage secondaire a choisi de retenir uniquement les molécules ayant une activité spécifiquement sur les cellules souches cancéreuses de glioblastome, c'est-à-dire des composés dont l'EC_{50} est 10 fois inférieur pour les cellules souches cancéreuses de glioblastomes que pour une lignée de fibroblastes 293T (cellules saines). Ils ont ainsi identifié 168 composés, soit 24,2% des composés présentant une spécificité d'action pour les CSC de glioblastome par rapport aux fibroblastes.

Dans notre cas, le criblage secondaire étant plus bruité que le criblage primaire, nous sommes peut être passés à côté de molécules inhibant la prolifération de cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes. Cependant, les 41 molécules issues du criblage secondaire, sont celles qui ont l'effet le plus marqué et qui sont donc les plus intéressantes pour des études plus approfondies.

Certaines molécules mises en évidence lors du criblage secondaire n'ont pas été testées en courbes dose-réponse. Ainsi, des molécules telles que des détergents ont été écartées car nous avons considéré qu'elles n'allaient pas présenter de spécificité particulière pour les CSC de glioblastomes. D'autres molécules telles que des antibactériens, des antifongiques et des anthelminthiques ont également été écartées de l'étude en courbe dose-réponse si ces molécules agissaient à la fois sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. Ce choix nous semblait judicieux, néanmoins, l'équipe de Lander a mis en évidence une molécule à activité anti-bactérienne, la salinomycine, active spécifiquement sur leurs cellules cancéreuses mammaires ayant subi une transition épithélio-mésenchymateuse et donc un enrichissement en cellules souches cancéreuses (Gupta et al., 2009). Les molécules, que nous avons écartées de la sélection pour les courbes dose-réponse, pourraient finalement s'avérer plus intéressantes que prévu initialement. Ces molécules pourront être testées ultérieurement pour leur spécificité envers les cellules souches cancéreuses issues de glioblastome. La sélection comportait 25 composés sélectionnés pour leur activité antiproliférative sur les CSC TG1, et 2 composés sélectionnés pour leur activité hyperproliférative supposée sur les CSC TG1.

Ces composés appartiennent à différentes classes pharmacologiques. La classe la plus représentée est la classe des médicaments du système cardio-vasculaire car 9 molécules, parmi les 27 molécules choisies pour réaliser les courbes dose-réponse, appartiennent à cette classe. D'autres classes pharmacologiques sont également représentées, comme les antibactériens/antifongiques/anthelminthiques qui sont représentés par 5 molécules (semblant agir différentiellement sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence), 2 antihistaminiques, 2 anticancéreux, 2 médicaments du système nerveux, 2 progestogènes et 5 molécules qui n'entrent pas dans une classe pharmacologique précise. Sur les 27 molécules choisies, 15 ont précédemment été décrites pour agir sur des canaux ioniques. Ainsi, l'**amiodarone** (Ding et al., 2001), la **fendiline** (Tripathi et al., 1993), la **félodipine** (Scholz, 1997), la **lutéoline** (Jiang et al., 2005) et le **suloctidil** (Calderon et al., 1986) ont été décrites pour agir sur les canaux calciques. L'**acide éthacrynique** (Schauf and Wilson, 1987), l'**ivermectine** (Wolstenholme, 2011) et la **sertraline** (Maertens et al., 2002) ont été décrites pour agir sur les canaux chloriques. Enfin, l'**amiodarone** (Kiehn et al., 1999), l'**astémizole** (Suessbrich et al., 1996), la **lutéoline** (Jiang et al., 2005), la **perhexiline** (Perrin et al., 2008), la **prazosine** (Thomas et al., 2004), la **prénylamine** (Katchman et al., 2006), la **progestérone** (Wu et al., 2011), le **tamoxifène** (Thomas et al., 2003) et la **terfénadine** (Suessbrich et al., 1996) ont été décrites pour agir sur les canaux potassiques de type hERG (« Ether a-go-go » humain). Ces observations suggèrent qu'une grande partie de l'effet toxique de certaines molécules sur les CSC issues de glioblastome TG1 passe par les canaux ioniques et notamment les canaux potassiques hERG. Ces canaux potassiques hERG sont largement impliqués dans les toxicités cardiaques induites par des molécules qui ont dû être retirées du marché, telles que la **terfénadine,** car elles provoquent à forte dose, une torsade de pointe et un allongement de l'intervalle QT (Friemel and Zunkler, 2010). Ces canaux potassiques hERG ont récemment été démontrés pour être une cible anticancéreuse intéressante car ils sont souvent surexprimés au niveau des cellules cancéreuses (Garcia-Quiroz and Camacho, 2011). Une caractéristique des molécules qui interagissent avec les canaux potassiques hERG est qu'elles ont une tête lipophile consistant en une partie aromatique attachée à une amine basique *via* une chaine carbonée de longueur variable (Aslanian et al., 2009). Ces molécules sont donc pour la plupart des bases faibles. Or, dans le milieu légèrement acide des cellules quiescentes (pH 6,4), l'action des bases faibles n'est pas facilitée (Adams, 2005). Ceci peut expliquer la différence d'action de l'**astémizole**, de la **prazosine**, de la **prénylamine**, le **tamoxifène** et la **terfénadine**, qui agissent à de plus faibles concentration sur les cellules TG1 en prolifération que sur les cellules TG1 en quiescence. Aucune différence d'activité de l'**amiodarone** et de la **perhexiline** n'est observée concernant leur activité sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. La

lutéoline et la **progestérone** quant à elles sont actives à de plus faibles concentration sur les cellules TG1 en quiescence que sur les cellules TG1 en prolifération. Ceci peut indiquer que les molécules sont sensibles au pH du milieu dans lequel elles agissent, ou que les cellules TG1 en prolifération et en quiescence expriment différemment les canaux potassiques hERG. Des expériences de « patch clamp » et de RT-PCR des canaux potassiques hERG devraient permettre de déterminer si les canaux potassiques sont exprimés de manière différente dans les cellules TG1 en prolifération et en quiescence et si les molécules issues du criblage de la chimiothèque Prestwick induisent un effet sur les cellules *via* des canaux ioniques. Dans tous les cas, les molécules issues du criblage et actives sur des canaux potassiques hERG pourraient constituer un axe thérapeutique intéressant pour le traitement des glioblastomes et aider à comprendre la physiopathologie des cellules souches cancéreuses issues de glioblastomes.

Les 27 composés issus du criblage de la chimiothèque Prestwick sur les cellules souches cancéreuses TG1 ont été testés en courbe dose-réponse sur les cellules TG1, ainsi que sur deux autres types de CSC issues de glioblastomes, les TG16 et les OB1. La spécificité des molécules a également été testée en effectuant les courbes dose-réponse sur une lignée cellulaire de glioblastome (U-87 MG), sur une lignée cellulaire contrôle, classiquement utilisée lors de tests cellulaires (HEK), des astrocytes humains (HA) et des cellules souches neurales fœtales humaines non cancéreuses (f-NSC). Au final, ce criblage a permis de mettre en évidence 24 molécules présentant une activité toxique sur les cellules TG1, dont deux ont une activité à plus faible concentration sur les cellules souches TG1 en prolifération, trois ont une activité à plus faible concentration sur les cellules souches TG1 en quiescence et 19 ont une activité similaire sur les cellules souches cancéreuses en prolifération en en quiescence. La plupart des molécules a montré des activités similaires sur les 3 types de CSC (TG1, TG16 et OB1) lorsqu'elles sont en prolifération ou lorsqu'elles sont en quiescence. Cependant, les molécules issues du criblage ont, pour la plupart d'entre elles, une activité à plus faible concentration sur les cellules HEK, U-87 MG, HA et f-NSC.

La seule molécule issue du criblage ayant montré une certaine spécificité pour les 3 types de cellules souches cancéreuses (TG1, TG16 et OB1) en condition de quiescence, était le **bisacodyl**. Cette molécule présente les caractéristiques essentielles de n'être pas active sur les cellules U-87 MG, HA et f-NSC. Une étude plus approfondie de l'activité du **bisacodyl** et de son métabolite actif le **désacétylbisacodyl** (**DDPM**) dont les fonctions acétyles ont été hydrolysées, a montré l'importance du pH extracellulaire dans l'activité de ce composé sur les cellules souches cancéreuses en prolifération et en quiescence, mais aussi sur les cellules HA, U-87 MG et les f-NSC. L'acidité extracellulaire, essentielle pour une activité optimale de la molécule, est retrouvée au niveau des tumeurs (Morris et al., 2011;

Vaupel et al., 1989). En effet, l'hypoxie tumorale entraine plusieurs changements au niveau des tumeurs, et notamment des adaptations cellulaires. Les cellules tumorales répondent en exprimant des facteurs de croissance comme le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) et l'EGF pour leur prolifération. Elles développent également des mécanismes de résistance à l'apoptose, surexpriment des transporteurs de type ABC (*ATP binding cassette*), et opèrent un changement métabolique de la phosphorylation oxydative à la glycolyse (Cosse and Michiels, 2008). Les cellules tumorales ont une consommation accrue de glucose, ce qui entraine une production d'acides métaboliques tels que l'acide lactique et l'acide carbonique. Le contrôle du pH intracellulaire est très important, car la variation de 0,1 unité de pH peut entrainer des bouleversements dans la production d'ATP, la synthèse protéique, la prolifération et la migration cellulaire ainsi que dans la régulation de l'apoptose. Les cellules ont donc de multiples mécanismes leur permettant de réguler leur pH intracellulaire. Ainsi, des transporteurs et des échangeurs membranaires sont constitutivement exprimés à la membrane, tels que les échangeurs Na+/H+, la pompe à proton H+-ATPase, les transporteurs monocarboxylates, et les transporteurs et échangeurs de bicarbonates. En condition hypoxique, des mécanismes supplémentaires sont développés par les cellules tumorales qui expriment un système tel que les anhydrases carboniques associées à la membrane. Les protons se retrouvent donc à l'extérieur des cellules où ils s'accumulent. En condition normoxique, les protons sont évacués par la circulation sanguine, mais en condition d'hypoxie, les protons ne peuvent pas être évacués et l'environnement extracellulaire tumoral s'acidifie (Chiche et al., 2010; Parks et al., 2010). L'acidité du milieu extracellulaire et l'hypoxie provoquent un ralentissement de la prolifération cellulaire, les cellules entrent en quiescence. Ces deux mécanismes, hypoxie et acidité extracellulaire diminuent l'activité de certains composés chimiothérapeutiques sur les cellules tumorales et favorisent également la sélection des cellules les plus résistantes aux conditions hypoxiques et acide (Rohwer and Cramer, 2011). Ces données montrant que l'acidité du microenvironnement tumoral est une généralité concernant les tumeurs de tous types suggèrent que le **DDPM** pourrait être actif sur d'autres tumeurs que les glioblastomes.

Bien que l'importance de l'acidité du milieu extracellulaire ait été montrée pour l'activité du **DDPM** sur les CSC TG1 en prolifération et en quiescence, le **DDPM** n'atteint pas, sur les cellules TG1 proliférantes en milieu acide, l'efficacité qu'il atteint sur les cellules TG1 quiescentes. Ceci suggère qu'un deuxième facteur spécifique des cellules en quiescence (ou plus exprimé pour les cellules souches cancéreuses en quiescence qu'en prolifération) intervient dans l'activité du **DDPM**. Ainsi, un modèle d'action du **DDPM** peut être proposé, dans lequel interviennent le pH du milieu extracellulaire et au moins un autre facteur (facteur X) présent au niveau des cellules souches cancéreuses en quiescence. Ces

deux facteurs (pH et facteur X) interagissent avec le **DDPM** pour induire une toxicité sur les cellules souches cancéreuses faisant intervenir une activation des caspases 3 et 7. Une étude plus approfondie de l'action du **DDPM** sur les cellules TG1 devrait permettre de définir la nature du facteur X et les mécanismes mis en jeu dans la cytotoxicité sélective du **DDPM** dans les conditions de quiescence et d'acidité.

L'étude de relation structure-activité a montré que les groupements chimiques essentiels pour l'action du **bisacodyl** ou de son métabolite, le **DDPM**, sont les alcools (-OH) en R1 et R2 et la position de l'azote sur la pyridine (cycle A).

Une seule fonction hydroxyle est suffisante pour obtenir un effet toxique sur les cellules TG1 en quiescence ou en condition acide. Cependant, toutes les molécules présentant un tel groupement ne sont pas forcément actives sélectivement sur les CSC TG1 en quiescence ou en condition acide. Des molécules dissymétriques exposant un groupement hydroxyle et un groupement lipophile en R1 et R2 perdent leur sélectivité pour les cellules TG1 quiescentes. De telles molécules sont actives à la fois sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. Une étude prochaine devrait permettre de déterminer si ces molécules sont également actives sur les cellules f-NSC, U-87 MG et HA et découvrir si la modification de l'effet biologique et la perte de sélectivité observés sur les cellules TG1 proliférantes et quiescentes sont observables sur les autres types de cellules. Le remplacement d'une fonction hydroxyle par un groupement lipophile entraine probablement un changement de cible biologique du composé ainsi créé. Cette hypothèse expliquerait la perte de sélectivité observée pour cette molécule.

La position de l'azote de la pyridine (cycle A) est également importante pour l'activité du bisacodyl ou de son métabolite. L'étude RSA révèle que l'azote positionné en ortho de la pyridine est optimal pour l'activité de la molécule sur les cellules TG1 quiescentes et que la fonctionnalisation de cet azote empêche la molécule d'être active.

En conclusion, l'étude RSA n'a pas permis pour l'instant, de découvrir de molécule plus active sur les cellules TG1 quiescentes que le **bisacodyl** et son métabolite actif, le **DDPM**. La molécule active sur les cellules TG1 en condition de quiescence ou d'acidité est probablement le **DDPM** puisque le blocage des fonctions R1 et R2 par des anilines fonctionnalisées non hydrolysables (-NHAc) annule l'effet de la molécule. L'hydrolyse du **bisacodyl** en **DDPM** semble donc être une étape primordiale pour l'effet sur les CSC quiescentes ou en condition acide. D'autres composés devront être synthétisés afin de tenter de découvrir des molécules qui présentent une meilleure activité pour les cellules TG1 quiescentes. Le **DDPM** devrait également être modifié afin de greffer un fluorochrome qui pourrait permettre de suivre l'action de la molécule sur les cellules grâce à la microscopie de

fluorescence. Enfin, la fixation du **DDPM** sur une surface solide de type « Affigel » pourrait permettre de récupérer la cible moléculaire du **DDPM** et de l'analyser par spectrométrie de masse. Des tests sur modèles murins immunodéprimés présentant une xénogreffe de cellules TG1 sont en cours et permettront d'évaluer l'efficacité du **DDPM** *in vivo* avant de passer, le cas échéant, en tests cliniques.

CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

5. Conclusions / Perspectives

La cancérologie a été marquée au cours des dernières décennies par le développement de nouveaux concepts et l'apparition de technologies permettant une analyse plus fine et plus exhaustive des tumeurs et des cellules qui la constituent. Un des faits marquant a été la mise en évidence, au sein des tumeurs, des cellules souches cancéreuses qui par leurs propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation joueraient un rôle similaire aux cellules souches somatiques. La tumeur peut ainsi être considérée comme un organe formé de différents types cellulaires, accepté par le système immunitaire, irrigué par un système vasculaire résultant d'une néovascularisation et doué d'un métabolisme lui permettant de s'adapter à une croissance parfois rapide et/ou à l'hypoxie souvent lié à un réseau vasculaire défectueux (vaisseaux malformés/déformés et incomplets).

L'origine des cellules souches cancéreuses n'est pas encore clairement établie. Historiquement, les premières cellules souches cancéreuses, isolées à partir de leucémies, ont été considérés comme résultant de la cancérisation de cellules souches hématopoïétiques normales. Elles ont été caractérisées par la présence de marqueurs de surface (marqueurs de progéniteurs hématopoïétiques), mais aussi par leurs propriétés fonctionnelles et notamment leur très forte aptitude à générer de nouvelles tumeurs après xénogreffes à des animaux immunodéficients. Par la suite, la mise en évidence de cellules souches cancéreuses dans plusieurs tumeurs solides a suscité un certain nombre de débats quant à l'origine de ces cellules. Les cellules souches dérivent-elles nécessairement de cellules souches somatiques ? La question est d'autant plus pertinente que ces cellules souches cancéreuses ne présentaient pas nécessairement tous les marqueurs de surface caractérisant un type de cellules souches somatiques ou des progéniteurs. A l'heure actuelle, la cellule souche cancéreuse est définie par ses propriétés fonctionnelles (aptitude à se différencier et à donner une tumeur présentant les mêmes caractéristiques que la tumeur d'origine après xénogreffes sur des animaux immunodéficients). La cellule à l'origine de la tumeur n'est pas nécessairement une cellule souche cancéreuse et peut très bien être une cellule somatique différenciée devenue cancéreuse après plusieurs lésions génomiques, puis ayant acquis des propriétés souches par suite de phénomènes de reprogrammation analogues aux iPS (*induced pluripotent stem cells*) permettant à une cellule différenciée de remonter dans la hiérarchie cellulaire. Cette reprogrammation est liée à la dynamique génomique et permet à une cellule de remplir sa fonction en tenant compte de

l'environnement dans lequel elle se trouve. Cette possibilité de reprogrammation, qui est une propriété inhérente aux cellules, permet d'entrevoir l'origine de la cellule souche cancéreuse (sans exclure la possibilité que cela puisse être une cellule souche somatique normale). La cellule cancéreuse ainsi reprogrammée pourrait ensuite, en fonction de son microenvironnement et des signaux émis par les cellules environnantes se diviser de manière symétrique ou asymétrique et donner naissance à ce nouvel organoïde constitué de cellules plus ou moins différenciées.

On peut essayer de rassembler l'ensemble des théories dans le schéma suivant :

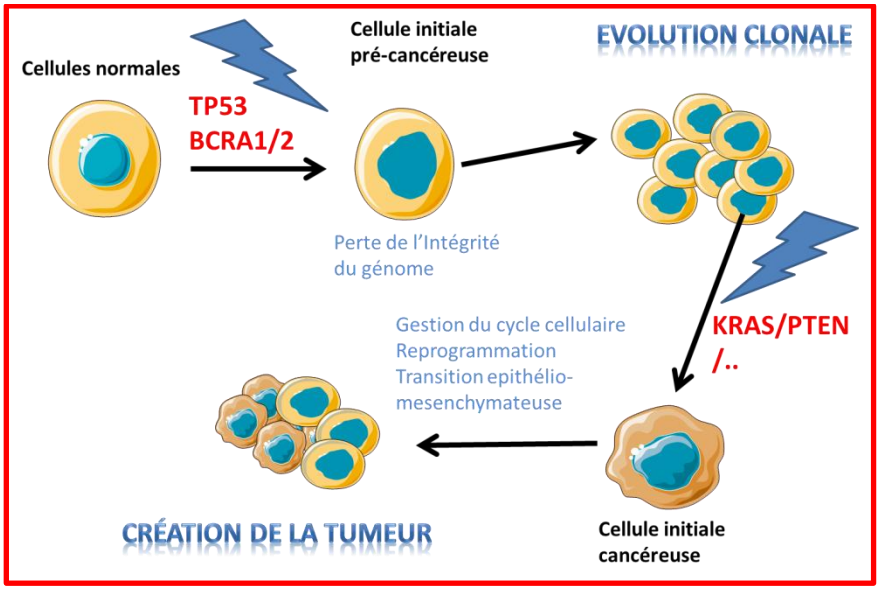


Figure 66 : Schéma présentant l'hypothèse de la double mutation, de l'évolution clonale et de la création de la tumeur.

Le schéma précédent met en cohérence :

La théorie du « **double hit** » avec une première mutation ayant pour conséquence de diminuer l'activité de protéines « gardienne de l'intégrité du génome » et une deuxième mutation permettant de modifier les équilibres entre prolifération, apoptose et différenciation.

Cette première mutation va libérer/assouplir les mécanismes de maintenance de l'intégrité du génome et induire l'apparition de clones cellulaires présentant des altérations cellulaires qui s'accumulent au cours des mitoses (**hypothèse de l'évolution clonale**).

La deuxième mutation apparait dans un ou plusieurs clones cellulaires. La tumeur se construit par sélection des cellules et des réseaux cellulaires les mieux adaptés aux contraintes exercées par le tissu environnant et les cellules stromales. Comme explicité précédemment, par des phénomènes de reprogrammation ou de transdifférenciation, des cellules souches cancéreuses apparaissent dans la tumeur et trouvent où construisent leurs niches.

Contrairement aux cellules saines, les cellules cancéreuses sont caractérisées par des altérations génomiques plus ou moins marquées et des aberrations chromosomiques liées au fonctionnement des mécanismes de réparation de l'ADN et des phénomènes de recombinaison homologue (avec exacerbation de la réparation mutagène), ainsi qu'à des anomalies mitotiques. Pour les cellules étudiées le caryotype établi par Patru *et al.* (2010) sur les CSC TG1 montre une aneuploidie avec 62 chromosomes. On peut se poser la question sur l'origine de cette anomalie génétique, mais aussi celle de la stabilité d'un tel génome. Ce problème a été abordé dans le **chapitre 2 de la thèse**, où un suivi du caryotype des cellules TG1 a été réalisé en fonction du nombre de passages des cellules en culture. L'utilisation des cartes Genome Wide SNP_6 d'Affymetrix, qui permet une analyse très résolutive des variations génomiques, a mis en évidence la très forte instabilité génétique des cellules souches cancéreuses. Le nombre de chromosomes varie au cours des passages en culture (67,5 au passage 8 ; 64, 5 au passage 13 ; 65 au passage 22 ; 58,5 au passage 38 ; 57 au passage 48). Il faut noter que le résultat de l'analyse génomique par SNP correspond au génome moyen d'une population cellulaire, alors que les caryotypes classiques présentent les chromosomes d'une seule cellule. L'instabilité génétique des cellules souches cancéreuses en culture n'est pas à relier à la situation artificielle des cultures cellulaires, car le caryotype de cellules souches non cancéreuses (f-NSC) en culture est remarquablement stable. Cette instabilité existe vraisemblablement au sein des tumeurs et permet probablement l'émergence dans les tumeurs de nouveaux clones cellulaires qui peuvent ou non présenter un avantage sélectif sur les autres cellules dans un environnement changeant (propriété métastique plus importante, prolifération accrue, capacité à se mettre en quiescence, ...). Elle contraste avec une apparente stabilité protéomique observée par l'équipe du Dr Chneiweiss (Patru et al., 2010) par gel 2D et la stabilité d'expression des gènes codant les récepteurs couplés aux protéines G (chapitre 3 de la présente étude). On peut supposer que l'instabilité génétique soit un mécanisme conférant à la cellule cancéreuse un haut pouvoir d'adaptation alors que l'homéostasie phénotypique serait un garant de la survie de la cellule cancéreuse. Cependant, malgré l'expression de marqueurs spécifiques des cellules souches cancéreuses tels que Nanog, POU5F1 et SOX2 dont la présence dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome TG1 et OB1 a été vérifiée dans le **chapitre 2 de cette thèse**, nous ne pouvons pas affirmer que cette instabilité soit spécifique des cellules souches cancéreuses de glioblatomes, d'autres types de cellules souches cancéreuses n'ayant pas été testés.

Dans un contexte plus général, l'instabilité génétique, la mise en évidence de cellules souches dans les tumeurs et la plasticité cellulaire, permettent de fournir une explication mécanistique à l'hétérogénéité tumorale observée depuis des décennies. La tumeur est hétérogène tant d'un point de vue cellulaire que dans son microenvironnement interne (à l'intérieur de la tumeur) et externe (cellules tumorales en contact avec le tissu sain). L'ensemble des cellules de la tumeur forme un réseau (figure 67) qui est optimisé pour :

- Obtenir les nutriments nécessaires à la survie tumorale,
- Favoriser l'angiogenèse pour combattre l'hypoxie, dynamiser la communication intercellulaire, faciliter les échanges cellulaires,
- Etablir le système d'immunotolérance de la tumeur en agissant par exemple sur la modulation des cellules T régulatrices (T_{reg}) (Han et al., 2011).

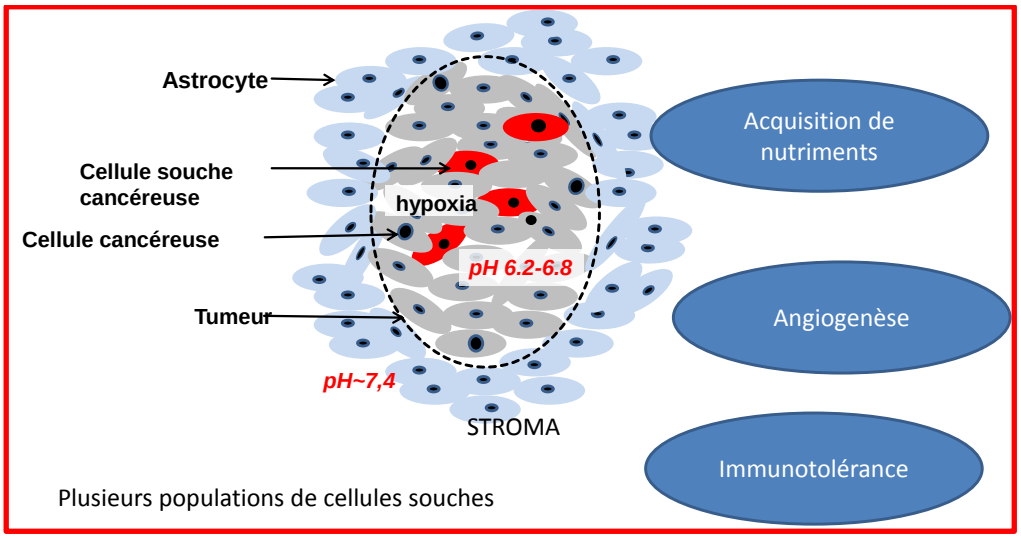


Figure 67 : L'hétérogénéité tumorale.
Schéma illustrant l'hétérogénéité tumorale, ses microenvironnements et les fonctions qui pourraient induire les pressions de sélection sur l'organe tumoral. Une des caractéristiques du tissu cancéreux est son acidité, liée à un changement métabolique qui privilégie la glycolyse aérobie au détriment de l'oxydation phosphorylante.

A partir de cette vision de la tumeur, différentes stratégies ont été construites pour développer de nouvelles thérapies anticancéreuses.

⇒ Interférer avec le réseau de signalisation des cellules tumorales

Pour répondre aux contraintes extérieures, les cellules tumorales doivent posséder un système de détection et de gestion de l'information, avoir la capacité de gérer l'interaction cellule-cellule et pouvoir moduler leurs rapports avec le support extracellulaire. Les protéines membranaires constituent, pour une cellule, un ensemble de détecteurs de l'environnement extérieur. Dans cet ensemble de protéines, les récepteurs couplés aux protéines G jouent un rôle central.

On peut imaginer qu'en interférant avec ces protéines, il serait possible de perturber le réseau cellulaire tumoral et induire la disparition de la tumeur. Pour nous approcher de ce but, nous avons d'abord voulu établir un catalogue des RCPG exprimés dans des cellules cancéreuses avec des propriétés souches ou différenciées. Ceci a été réalisé par une mise en place des techniques et stratégies pour analyser le transcriptome des RCPG (**chapitre 3 de cette thèse**). Nous avons commencé à valider l'analyse transcriptomique en recherchant l'expression protéique par une approche de protéomique. Il reste à généraliser cette approche et à valider l'approche thérapeutique qui en découle. Des premiers résultats ont montré que l'on pouvait utiliser des agonistes ou antagonistes des RCPG telle la prasozine, un antagoniste des récepteurs adrénergiques α1, pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses (travail réalisé dans le laboratoire du Dr Chneiweiss en collaboration avec notre équipe). Toutefois pour la prazosine il ne semble pas que cet effet passe nécessairement par le récepteur α1.

Les thérapies anti-EGFR ou anti-VEGFR permettent d'interférer avec la signalisation des cellules tumorales soit au niveau de l'équilibre prolifération /apoptose pour l'EGFR soit pour perturber l'angiogenèse pour le VEGFR. Il est connu que les réseaux de signalisation partant de ces récepteurs peuvent être modulés par l'activation de certains RCPG ou par la signalisation calcique. On pourrait ainsi à terme coupler les thérapies anti-EGFRs ou anti-VEGFR avec des agonistes ou antagonistes spécifiques de certains RCPG ou avec des perturbateurs du signal calcique (antagonistes de la calmoduline par exemple).

⇒ Intervenir spécifiquement sur les cellules cancéreuses en ciblant leurs spécificités métaboliques.

A l'intérieur de la tumeur et dans un microenvironnement à la fois hypoxique et acide, les cellules cancéreuses doivent optimiser, à partir des nutriments disponibles, la production d'énergie et la production des macromolécules nécessaires à la prolifération cellulaire. Cette optimisation va conduire les différentes cellules de la tumeur à modifier les équilibres métaboliques présents classiquement dans une cellule normale. Le glioblastome a la particularité de développer un cœur nécrotique qui pourrait être la niche des cellules souches cancéreuses. Cet environnement nécrotique à la fois acide et hypoxique favorise la mise en quiescence des cellules souches et la résistance de ces cellules aux traitements chimiques et à la radiothérapie. Partant de cette hypothèse de travail, nous avons criblé les cellules souches cancéreuses, soit en condition de prolifération, soit en condition de quiescence pour rechercher des molécules induisant dans les cellules en quiescences une diminution de l'ATP intracellulaire, ce qui entraine à terme une mort cellulaire. Nous avons ainsi trouvé une seule molécule, le bisacodyl, qui présente une remarquable spécificité pour les cellules souches cancéreuses en quiescence (**chapitre 4 de cette thèse**). Cette molécule a été étudiée et les conditions d'acidité semblent nécessaires pour son activité. De manière remarquable, l'étude de relation structure-activité n'a pas permis de découvrir de molécules ayant une meilleure efficacité sur les cellules souches cancéreuses de glioblastomes TG1, TG16 et OB1 que nous avons testées, mais a permis de déterminer les fonctions essentielles à l'activité de la molécule. Un grand travail reste a réaliser sur cette molécule, notamment pour déterminer son mécanisme d'action, la cible cellulaire de cette molécule et son efficacité sur des cellules souches cancéreuses issues d'autres tumeurs.

Actuellement, nous pensons que le bisacodyl présente les caractéristiques potentielles pour être un adjuvant des traitements standards des glioblastomes (témozolomide et radiothérapie) à condition de pouvoir délivrer le composé au plus près de la tumeur.

Par ailleurs, le bisacodyl doit perturber spécifiquement un réseau métabolique qui est spécifiquement mis en œuvre lorsque la cellule souche cancéreuse se met en quiescence et se trouve dans un environnement acide. Cette molécule sera un outil remarquable pour aller déchiffrer ce réseau de régulation et ainsi ouvrir de nouvelles possibilités thérapeutiques pour se débarrasser des cellules souches cancéreuses en quiescence, probablement à l'origine d'une partie des récurrences cancéreuses.

⇒ Eliminer la tumeur nécessitera une polythérapie.

De manière générale, la tumeur s'adapte aux contraintes imposées par l'environnement extratumoral. Le glioblastome a la capacité de développer une résistance aux monothérapies utilisées. Des polythérapies « rationnelles » devraient se développer pour déjouer les mécanismes mis en place par les cellules cancéreuses et lutter plus efficacement contre le cancer.

En suivant notre raisonnement, cette polythérapie devrait être constituée par :

- Un perturbateur des ***réseaux de signalisation qui contrôlent la prolifération et la mort cellulaire*** de la cellule cancéreuse souche et différenciée. Des combinaisons d'agonistes de calmoduline, de composés anti-EGFR ou antiangiogénique utilisées comme adjuvant du TMZ pourraient être envisagées.

- Une combinaison de molécules agissant sur ***le métabolisme et la production énergétique*** des différentes cellules de la tumeur. Le bisacodyl pourrait être associé à des inhibiteurs des enzymes impliquées dans le maintien du pH intracellulaire (anhydrase carbonique IX (CAIX), par exemple).

- Une ***immunothérapie active ou passive*** qui pourrait être développée à partir d'antigènes tumoraux membranaires. Une telle étude fait l'objet d'une collaboration entre TRANSGENE et la Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC). En analysant les données transcriptomiques collectées par la LNCC dans le cadre du programme « carte d'identité tumorale » (CIT), il est possible de rechercher des protéines membranaires spécifiquement exprimées dans les cellules tumorales, en particulier les cellules souches cancéreuses.

MATERIELS ET METHODES

6. MATERIELS ET METHODES

6.1. Culture cellulaire

6.1.1. Les cellules TG1, TG16 et OB1

Les cellules TG1, TG16 et OB1 sont des cellules isolées de tumeurs glioneuronales malignes (TGNM) dans le laboratoire du Dr Hervé Chneiweiss (UMR894, Université Paris Descartes, France). Ces cellules ont les caractéristiques morphologiques de pousser en suspension dans un milieu sans sérum et de former des neurosphères (figure 68).

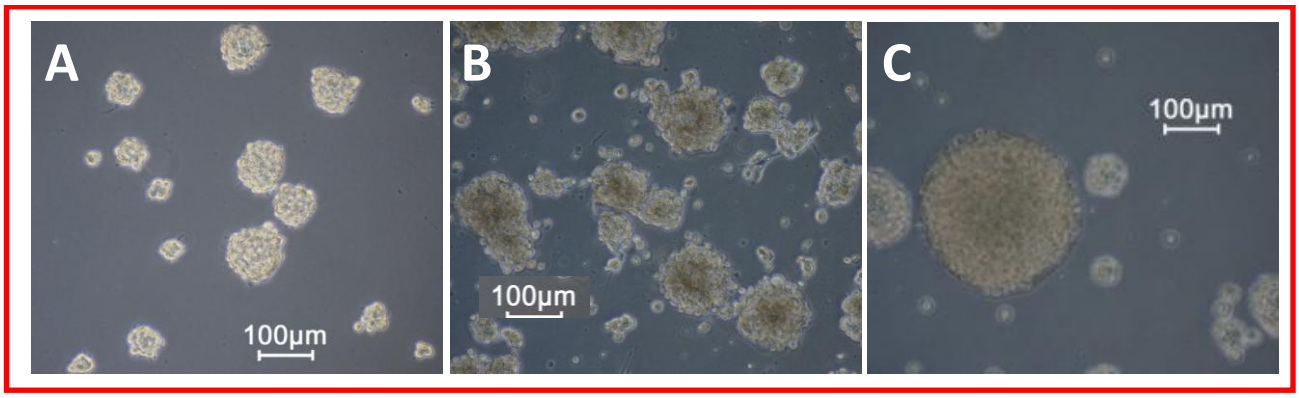


Figure 68 : Photographies des cellules souches cancéreuses en prolifération.
A : TG1 proliférantes
B : TG16 proliférantes
C : OB1 proliférantes

6.1.1.1. Conditions de culture des cellules

Les cellules sont cultivées dans du milieu NS34 composé de DMEM/F12 (Invitrogen™) 1:1 ; D-Glucose (Invitrogen™) 25mM ; GlutaMAX-I (Invitrogen™) 1× ; HEPES (Invitrogen™) 5mM ; Sodium Bicarbonate (Invitrogen™) 15mM ; Pénicilline/Streptomycine (Invitrogen™) 10 U/mL : 10 mg/mL, complété avec des suppléments N2 (1×), G5 (1×) et B27 (0,5×) fournis par Invitrogen™ également. Le supplément G5 contient les facteurs de croissance EGF et bFGF nécessaires pour le maintien des propriétés souches des cellules et classiquement utilisés dans la culture de cellules souches neurales.

Deux fois par semaine, les cellules sont récoltées et centrifugées 10 min à 115g. Le surnageant est conservé, il constitue le milieu conditionné des cellules. Le culot cellulaire est repris et dissocié mécaniquement par 100 allers-retours d'une micropipette P1000 réglée sur 400µL dans 1 mL de milieu conditionné. Les cellules sont diluées puis comptées dans une cellule « Quick read precision cell slide » (Globe Scientific inc.) en prélevant 20µL de cellules en en y ajoutant 4µL de bleu de Trypan. Les cellules blanches, c'est-à-dire les cellules vivantes sont comptées (N), puis les cellules qui ont incorporé le bleu de trypan, c'est-à-dire les cellules mortes (†) sont comptées à leur tour dans les 18 cercles de la cellule. La densité cellulaire est donnée par la formule :

$$Nb\ de\ cellules/mL = \frac{N * 1000}{18 * 0{,}011}$$

où N représente le nombre de cellules vivantes.

Le pourcentage de mortalité cellulaire est donné par la formule :

$$Mortalité = \frac{\dagger}{N+\dagger}$$

où N représente le nombre de cellules vivantes et † le nombre de cellules mortes.

Le milieu des cellules est renouvelé à 90% à chaque passage des cellules. Les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO_2 sous atmosphère humide et à l'obscurité.

6.1.1.2. Congélation des cellules

La congélation des cellules est nécessaire afin de constituer un stock de cellules. Un premier stock à un faible passage (autour de 10 passages) constitue la « Master Cell Bank ». Ce stock de cellules est utilisé afin de constituer un deuxième stock de cellules à passage plus élevé (autour de 15 passages) qui est la « Working Cell Bank ». Cette deuxième banque de cellules à passage plus élevé, permet d'arriver plus rapidement et plus facilement à des cellules entre 20 et 30 passages qui seront utilisées pour les expériences.

Les cellules sont congelées au minimum 24 heures après leur dernier passage. Les cellules sont récoltées et centrifugées à 4°C ; 10 min à 115g. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans un mélange 90% FBS (Invitrogen™) ; 10% DMSO (Sigma Aldrich®) stérile, à une concentration d'environ 3.10^6 cellules/mL. La suspension cellulaire ainsi préparée est aliquotée rapidement par 1mL dans des cryotubes annotés de 1,5mL. Les cellules sont ensuite placées à -80°C pendant 1 semaine et transférées dans un container d'azote liquide.

6.1.1.3. Décongélation des cellules

Les cellules sont décongelées rapidement et remises en suspension dans 30mL de milieu NS34 préalablement chauffé à 37°C. Les cellules sont ainsi peu à peu collectées dans le tube de centrifugation. Les cellules sont centrifugées 10min à 115g à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu sans dissociation dans 10mL de milieu NS34 et mis en culture dans une flasque T75. Les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO_2 sous atmosphère humide et à l'obscurité.

6.1.1.4. Mise en quiescence des cellules

Pour la mises en quiescence, les cellules sont préparées comme pour un passage normal et resuspendues à une concentration de 250000 cellules/mL dans du milieu NS34 renouvelé à 90%. Les cellules sont alors incubées à 37°C ; 5% CO_2 sous atmosphère humide à l'obscurité pendant 16 ou 9 jours sans changer le milieu des cellules. Le jour de l'ensemencement est le jour J0.

6.1.2. Les cellules souches neurales fœtales

Les cellules souches neurales fœtales ou f-NSC sont des cellules isolées du cerveau d'un fœtus humain entre les jours de vie embryonnaire 50 et 55. Les cellules ont été isolée par l'équipe du Dr M.-P. Junier (UMR894, Université Paris Descartes, Paris, France). Ces cellules ont la caractéristique de pousser en suspension dans un milieu sans sérum et de former des neurosphères (figure 69).

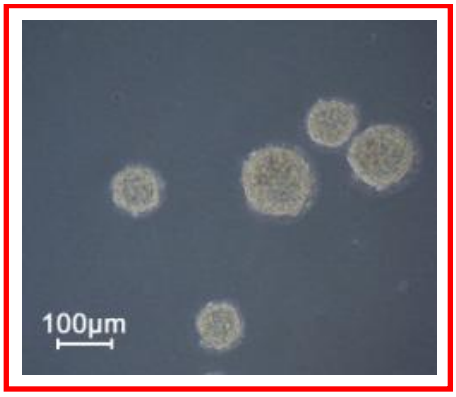


Figure 69 : Photographie des cellules f-NSC.

Les f-NSC sont cultivées dans du milieu NeuroCult® NSC Basal Medium supplémenté avec du NeuroCult® Proliferation Supplement (StemCell Technologies), human EGF 20 ng/mL (Peprotech®) et human basic-FGF 10 ng/mL (Peprotech®). Ce milieu est préparé extemporanément.

Toutes les deux semaines, les cellules sont récoltées et centrifugées 10min à 115g. Le surnageant des cellules est conservé et constitue le milieu conditionné des f-NSC. Le culot cellulaire est repris et dissocié mécaniquement par 30 allers-retours d'une micropipette P1000 réglée sur 400µL, dans 1mL de milieu conditionné des f-NSC. Les cellules sont diluées puis comptées dans une cellule « Quick read precision cell slide » (Globe Scientific inc.) comme indiqué au paragraphe 6.1.1.1 page 196.

Le milieu des cellules est renouvelé à 90% à chaque passage des cellules. Les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO_2 sous atmosphère humide et à l'obscurité.

La congélation et la décongélation des NSC s'effectuent dans les mêmes conditions que mentionné précédemment pour les cellules souches cancéreuses isolées de glioblastomes aux paragraphes 6.1.1.2 page 197 et 6.1.1.3 page 198.

Ces cellules ne sont jamais mises en quiescence.

6.1.3. Les astrocytes humains

Les astrocytes humains (HA) (réf. 1800 ScienCell Research Laboratories) sont des cellules primaires isolées de cerveau humain (figure 70). Les cellules sont délivrées au passage 1 et sont garanties pour plus de 15 doublements de population. Ces cellules adhèrent sur un support préalablement recouvert de poly-L-lysine à 2µg/cm² (réf. 0403 ScienCell) dans un milieu de culture Astrocyte Medium (réf. 1801 ScienCell) supplémenté en Astrocyte Supplement, FBS et pénicilline/streptomycine également fournis avec le milieu.

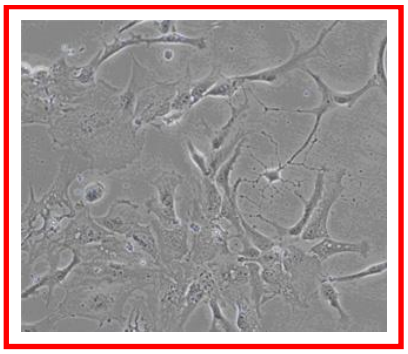


Figure 70 : Photographie des astrocytes humains primaire.
Photographie provenant du site www.sciencellonline.com qui commercialise les cellules.

Le passage s'effectue lorsque les cellules sont à 80% de confluence. Les HA sont rincés au PBS, décollés à la Trypsine-EDTA 0,05% (réf. 15400054 Invitrogen™), récoltés puis centrifugés 5 min à 115g. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans du milieu de culture à température ambiante. Les cellules sont comptées comme indiqué précédemment et ensemencées à une densité de 5000 cellules/cm². Les cellules sont incubées à 37°C ; 5% CO_2 sous atmosphère humide et à l'obscurité. Le milieu de culture est changé tous les deux jours jusqu'à ce que les cellules soient à 50% de confluence, puis tous les jours jusqu'à 80% de confluence.

La congélation s'effectue dans les conditions indiquées pour les CSC, mais les cellules sont récoltées à l'aide de la trypsine-EDTA (voir paragraphe 6.1.1.2). La décongélation s'effectue comme indiqué pour les CSC (paragraphe 6.1.1.3 page 198).

Les HA ne sont jamais mis en quiescence.

6.1.4. La lignée cellulaire U-87 MG

Les U-87 MG (catalogue n° HTB-14, lot n° 58374283, ATCC®) sont une lignée cellulaire issue d'un glioblastome de grade IV (figure 71). Elles ont les caractéristiques de pousser en adhérant sur un support et de pouvoir former quelques amas adhérents dans un milieu EMEM (réf. 30-2003 ATCC®) supplémenté en FBS (réf. 10270-106 Invitrogen™) et en Pénicilline/Streptomycine (réf. 15070-063 Invitrogen™).

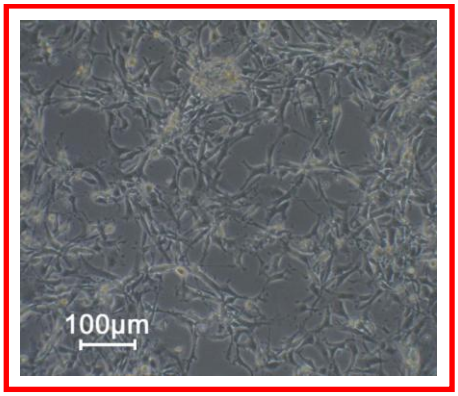


Figure 71 : Photographie des cellules de la lignée U-87 MG.

Les cellules sont passées 1 à 2 fois par semaine lorsque la culture arrive à 90% de confluence. Les cellules sont rincées au PBS, décollées à l'aide de Trypsine-EDTA (réf. 15400054 Invitrogen™), récoltées puis centrifugées 5 min à 180g. Elles sont ensuite diluées 2 à 5× en fonction des besoins et incubées à 37°C ; 5% CO_2 sous atmosphère humide et à l'obscurité.

Les cellules sont congelées et décongelées selon le même protocole que les astrocytes humains (voir paragraphe 6.1.3 page 199).

Ces cellules ne sont jamais mises en quiescence.

6.1.5. La lignée cellulaire HEK 293

Les cellules HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293) sont une lignée cellulaire issue d'un rein d'embryon humain. Elles ont la caractéristique de pousser en adhérant sur un support dans un milieu MEM (réf. 32561-037 Invitrogen™) supplémenté avec 2mM de L-Glutamine (réf. 25030-081 Invitrogen™) et 50U/mL : 50mg/mL de Pénicilline/Streptomycine (réf. 15070-063 Invitrogen™).

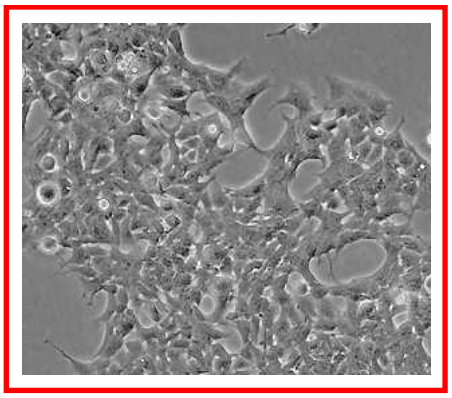


Figure 72 : Photographie de la lignée cellulaire HEK 293.
Photographie provenant du site www.atcc.org qui commercialise les cellules.

La culture, la congélation et la décongélation des cellules se fait dans les mêmes conditions que les astrocytes humains (voir paragraphe 6.1.3 page 199).

Ces cellules ne sont jamais mises en quiescence.

6.2. Contrôle de la stabilité génomique

6.2.1. Extraction de l'ADN

La méthode consiste à extraire l'ADN total à partir d'un culot cellulaire de 5 à 10.10^6 cellules à l'aide du kit QIAamp DNA mini (QIAGEN) selon les instructions données par le fabriquant.

6.2.2. Contrôle de la qualité de l'ADN

La pureté et la concentration de l'ADN est évaluée à l'aide du NanoDrop ND-1000 (Labtech™). La concentration en ADN est évaluée par conversion de l'intensité d'absorption à 260nm selon la formule : 1 unité de DO représente 50 µg/ml d'ADN pur.

6.2.3. Analyse du génome

L'analyse du génome des cellules TG1 à passages 8, 13, 22, 38 et 48 et des cellules f-NSC à passages 10, 20 et 30 a été réalisé à l'aide de puces Affymetrix Genome Wide SNP_6 sur la plate-forme Biopuce et Séquençage de l'IGBMC (Illkirch, France).

6.3. Extraction et contrôle des ARN

6.3.1. Extraction des ARN totaux

La méthode consiste à extraire les ARN totaux à partir d'un culot cellulaire de 5 à 10.10^6 cellules par phénol chloroforme et thiocyanate de guanidine.

Le culot cellulaire est repris dans 1mL de TRI Reagent® (réf. TR-118-200 Euromedex) et incubé 5 min à température ambiante. La séparation des ADN, ARN et protéine se fait par ajout de 120µL de bromochloropropane, mélange et incubation de 15 min à température ambiante puis centrifugation 15 min à 4°C à 12000g. Les ARN, contenus dans la phase aqueuse, sont précipités en ajoutant 500µL d'isopropanol. Après une centrifugation de 8 min à 4°C à 12000g, le surnageant est éliminé et les ARN sont lavés par ajout d'1mL d'éthanol 75%. Une dernière centrifugation de 5 min à 4°C à 7500g permet de récupérer le culot d'ARN qui est séché sous vide (Speed Vac) et repris dans 50µL d'eau traitée au DEPC

(pyrocarbonate d'éthyle) (réf. AM9920 Ambion, Inc.). Les ARN sont ensuite aliquotés et conservés à -80°C.

6.3.2. Contrôle de la qualité des ARN

La pureté des ARN est vérifiée grâce à l'appareil NanoDrop ND-1000 (Labtech™) qui effectue, avec seulement 1µL d'échantillon d'ARN, le spectre d'absorption pour toutes les longueurs d'onde d'excitation de 220nm à 350nm. L'allure générale de la courbe ainsi que le calcul des ratios des absorptions 260/230 (comprise entre 1,8 et 2,2 pour des ARN purs) et 260/280 (environ 2,0 pour des ARN purs) donnent la pureté des ARN testés. La concentration en ARN est évaluée par conversion de l'intensité d'absorption à 260nm selon la formule : 1 unité de DO représente 40 µg/ml d'ARN pur.

L'intégrité des ARN est vérifié grâce au Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies) et au kit RNA Nano LabChip kit série 2 (réf 5067-1511 Agilent Technologies). Les ARN sont dilués à 100ng/µL dans de l'eau traitée au DEPC (réf. AM9920 Ambion, Inc.). Le kit se présente sous forme d'une puce pouvant analyser 12 échantillons d'ARN à la fois. La puce est chargée avec un gel servant de matrice pour la migration, un marqueur de taille, un marqueur de la migration et les ARN à tester. Le Bioanalyser réalise un électrophorégramme présentant 4 pics majeurs, le premier est le marqueur indiquant le début de migration de chaque échantillon, le 2ème correspond aux pics des ARN de transfert, le 3ème correspond à l'ARN ribosomique 18s et le dernier à l'ARN ribosomique 28s. Pour des ARN non dégradés, le rapport de l'aire sous les pics 28s/18s doit être proche de 2 et le *RNA Integrity Number* (RIN) doit être proche de 10.

6.4. RT-PCR Quantitatives

6.4.1. Rétrotranscription

La transcription inverse permet de transcrire tous les ARN en ADN complémentaires (ADNc). Pour une réaction de transcription inverse, 1µg d'échantillon d'ARN de qualité optimale est utilisé. Les ARN sont dilués dans de l'eau traitée au DEPC (réf. AM9920 Ambion, Inc.) pour un volume final de 50µL. Les réactifs provenant du kit « High capacity cDNA Archive Kit® » d'Applied Biosystems™ sont utilisés comme indiqué par le fabriquant et ajoutés aux ARN dilués à raison de 50µL par réaction. Le mélange réactionnel (100µL) est

ensuite incubé 10min à 25°C puis 2h à 37°C. Les ADNc ainsi obtenus sont conservés à -20°C.

6.4.2. PCR quantitative

Les PCR (réaction de la polymérase en chaine) quantitatives que nous utilisons permettent d'effectuer une quantification relative par comparaison de l'expression du gène étudié avec celui d'un gène de référence. Il s'agit donc en réalité de PCR semi-quantitatives.

Les réactions de PCR que nous utilisons sont basées sur les essais TaqMan®. Ces essais contiennent des amorces et une sonde spécifiques du fragment de gène à amplifier. La sonde est conçue pour s'hybrider au fragment de gène amplifié et contient un fluorophore à une extrémité et un « quencheur » à l'autre extrémité, empêchant le fluorophore d'émettre de la fluorescence. Lorsque l'amplification à lieu, la polymérase Taq dégrade la sonde hybridée, libérant le fluorophore de son quencheur. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle de PCR.

6.4.2.1. PCR quantitative à partir des cartes TaqMan®

Les cartes TaqMan® Array Card d'Applied Biosystem™ sont formées de 384 puits contenant chacun un essai TaqMan® lyophilisé utilisé pour l'amplification d'un fragment de gène. Les cartes TaqMan® Human GPCR Array d'Applied Biosystem™ ont été utilisées pour l'étude du transcriptome des récepteurs couplés aux protéines G. Ces cartes contiennent 356 essais pour des gènes codant pour des RCPG, principalement des endoRCPG, 15 essais pour des gènes pouvant servir de contrôle, dont le 18s présent dans 4 puits de la carte et 10 autres gènes que nous ne considérons pas comme des RCPG. Les tests ont été réalisés 2 fois pour chaque condition de quiescence testés (2, 6, 7, 10, 11, 14, 15, 18, 19 et 23 jours) et pour chaque type cellulaire testé (OB1, TG16, U-87 MG, HA et f-NSC)

Les cartes TaqMan® Stem Cell Pluripotency Array d'Applied Biosystem™ ont été utilisées pour l'étude de l'expression des marqueurs de cellules souches ou pluripotentes. Ces cartes sont également formées de 384 puits et permettent de faire 4 fois l'analyse de la transcription de 7 gènes exprimés dans des cellules non différenciées, 33 gènes corrélés avec le caractère souches des cellules, 50 gènes impliqués dans différentes voies de différenciation des cellules, et 6 gènes de contrôle. Dans nos expériences, nous avons réalisé les tests 4 fois pour chaque type cellulaire (TG1, OB1, HA, U-87 MG et f-NSC).

Pour la préparation du mix de PCR, 85µL d'ADNc (à 10ng/µL voir le paragraphe 6.4.1) à analyser sont déposés dans 425µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix d'Applied Biosystem™ et 85µL d'eau traitée au DEPC (réf. AM9920 Ambion, Inc.). Pour charger les puits de la carte, 105µL de mix sont déposés dans chacun des 8 réservoirs prévus à cet effet. La carte est ensuite centrifugée 2 fois 1 minute à 1200rpm dans la centrifugeuse de plaque Heraeus Multifuge3s et rapidement scellée après la centrifugation. Le thermocycleur ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System permet l'amplification des fragments de gène en réalisant les incubations de 2 minutes à 50°C et de 10 minutes à 95°C suivi des 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C. A la fin de chaque cycle, la fluorescence de chaque puits de réaction est mesurée par le thermocycleur. Les résultats sont donnés en cycle seuil (Ct), c'est-à-dire le premier cycle pour lequel la fluorescence observée est proportionnelle à l'amplification du fragment de gène étudié.

6.4.2.2. PCR quantitative à partir des essais TaqMan®

Cette réaction de PCR est basée sur les essais TaqMan®. Ces essais contiennent des amorces et une sonde spécifiques du fragment de gène à amplifier. La sonde est conçue pour s'hybrider au fragment de gène amplifié et contient un fluorophore

Une réaction de PCR quantitative nécessite 50ng d'ADNc (soit 5µL d'ADNc , en considérant que 1µg d'ARN donne 1µg d'ADNc après rétrotranscription), 12,5µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem™) 1,25µL de TaqMan ® Pre-developed assay reagent d'Applied Biosystem™ et 6,25µL d'eau traitée au DEPC (réf. AM9920 Ambion, Inc.). Le mélange réactionnel (25µL) est déposé dans le puits d'une plaque 96 puits à PCR « MicroAmp® Optical 96-Well Reaction » (Applied Biosystems™) qui est scellée avec un film adhésif « Optical Adhesive Covers » (Applied Biosystems™).

La plaque est placée dans le thermocycleur ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems™) qui réalise les amplifications en effectuant d'abord une incubation de 2 minutes à 50°C et un autre de 10 minutes à 95°C. Il réalise ensuite 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C. A la fin de chaque cycle, la fluorescence de chaque puits de réaction est mesurée par le thermocycleur. Les résultats sont donnés en cycle seuil (Ct), c'est-à-dire le premier cycle pour lequel la fluorescence observée est proportionnelle à l'amplification du fragment de gène étudié.

6.4.2.3. Analyse des résultats de qPCR

Les données en Ct sont analysées avec le logiciel Excel 2007 (Microsoft® Office). Un graphique dit de « boîte à moustaches » est réalisé à l'aide du logiciel Minitab® pour déterminer le meilleur contrôle à utiliser pour l'analyse des données. Le meilleur contrôle est celui qui varie le moins en fonction des cellules testées. Les données de chaque carte sont normalisées pour que les Ct du gène contrôle (RPLP0 pour les cartes TaqMan® Human GPCR Array d'Applied Biosystem™ et GAPDH pour les cartes TaqMan® Stem Cell Pluripotency Array d'Applied Biosystem™) soient au même niveau pour chaque plaque de l'analyse.

Un clustering est effectué à l'aide du logiciel dChip à partir des données normalisées. L'expression relative est calculée par rapport au cycle pour lequel les Ct sortent du bruit de fond de la plaque. Dans nos expériences, l'analyse montre que la valeur de ce cycle est de 31,5 pour l'étude du transcriptome RCPG et de 35 pour l'étude de l'expression des marqueurs des cellules souches.

L'expression des gènes est calculée selon la formule :

$$Expression\ Relative = 2^{(\text{Cycle seuil fixé} - \Delta\text{Ct})}$$

où ΔCt représente la normalisation des cycles seuils pour chaque RCPG, par rapport au contrôle RPLP0.
et cycle seuil fixé est de 31,5 pour les RCPG et 35 pour les marqueurs de cellules souches.

6.5. Analyse de la quiescence des cellules

L'analyse de la quiescence des cellules souches cancéreuses TG1, TG16 et OB1 se fait à l'aide du kit Click-iT EdU Flow Cytometry Alexa Fluor® 488 Azide d'Invitrogen™. Ce kit contient tous les réactifs nécessaires à l'expérience, hormis le PBS (tampon phosphate salin) et la BSA (albumine de sérum bovin) (réf. A9418 de Sigma-Aldrich®). Ce test est basé sur l'incorporation d'EdU (5-ethynyl-2'deoxyuridine), un analogue du BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine). Comme le BrdU, l'EdU va s'incorporer à la place de la thymidine pendant la synthèse de l'ADN lors du cycle cellulaire. La détection ne fait pas intervenir d'anticorps. Elle est basée sur une réaction click qui est une réaction covalente entre un azide et un alcyne catalysée par du cuivre (figure 73).

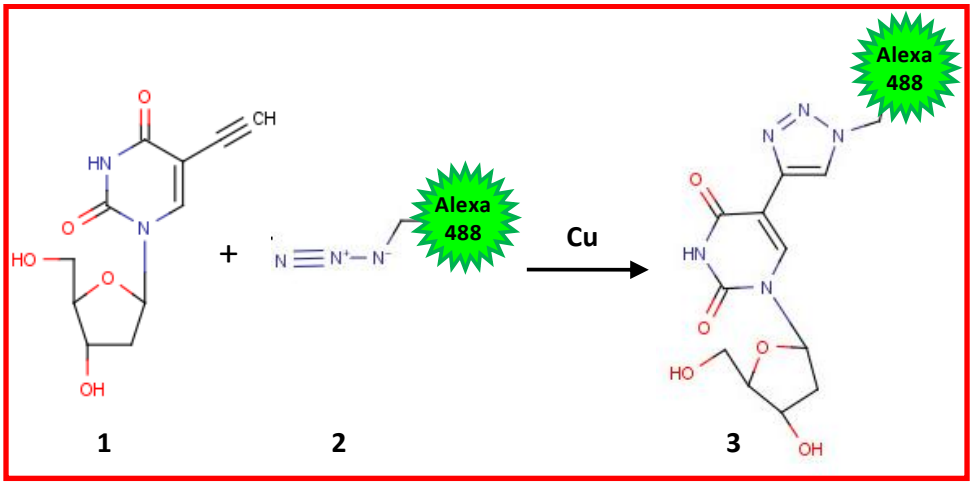


Figure 73 : Réaction Click du kit Click-iT EdU Flow Cytometry Alexa Fluor® 488 Azide d'Invitrogen™.
Le composé 1 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)) réagit avec le composé 2 (azide couplé à l'Alexa 488) en présence de cuivre (Cu) pour donner le composé 3 (déoxyuridine couplée à l'Alexa 488).

Pour la vérification de la quiescence des cellules souches cancéreuses, un prélèvement de 3mL de suspension de cellules proliférantes et 3mL de suspension de cellules quiescentes est effectué. Les cellules proliférantes qui servent de contrôle, ont été passées la veille de ce prélèvement. Les cellules prélevées sont incubées en présence de 10µM d'EdU pendant 24 heures. En parallèle, un prélèvement de 3mL de suspension de cellules proliférantes et 3mL de suspension de cellules quiescentes est effectué et incubé sans EdU, mais en présence de DMSO pendant 24h afin de constituer le témoin négatif.

Les cellules sont ensuite traitées comme indiqué par le fabriquant et déposées dans une plaque 96 puits à raison de 200µL par puits et marquées avec 2µL de 7-AAD (7 amino-actinomycine D) dans chaque puits. Les cellules sont analysées avec un cytomètre capillaire Guava easyCyte 6HT/2L System (Millipore™) à l'aide du programme ExpressPro du logiciel Cytosoft 5.3 qui donne les résultats en pourcentage de cellules par rapport à la population totale.

6.6. Criblage de la chimiothèque Prestwick®

La chimiothèque Prestwick est une collection composée de 1120 petites molécules. Toutes ces molécules sont des médicaments déjà commercialisés qui présentent une diversité pharmacologique et chimique importante afin d'augmenter la probabilité d'avoir des touches lors du criblage. Les molécules sont également choisies en fonction de leur biodisponibilité et du fait qu'elles ont peu d'effets secondaires chez l'Homme. L'objectif de cette chimiothèque est ainsi de réduire le temps et les tests nécessaires avant la mise sur le marché d'un médicament, permettant ainsi, dans certains cas, de passer directement des tests *in vitro* aux essais cliniques de phase I sur l'Homme.

La chimiothèque se présente sous forme de 14 plaques contenant chacune 80 composés dissous dans 100% de DMSO (Sigma-Aldrich® Réf : 154938-1L). La stratégie de criblage repose sur une stratégie de chimie-biologie (figure 74) qui consiste à cribler la chimiothèque une première fois à 50µM à partir des plaques de la chimiothèque réservées pour le criblage primaire. Une autre série de plaques contenant les composés de la chimiothèque Prestwick® est réservée pour le criblage secondaire. Les composés sont testés en duplicata à deux concentrations (50µM et 5µM) lors du criblage secondaire. Enfin, pour les touches confirmées et sélectionnées, les composés sont commandés en poudre, pesés et dissous dans 100% de DMSO à une concentration de 10mM pour réaliser les courbes dose-réponse à 1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM.

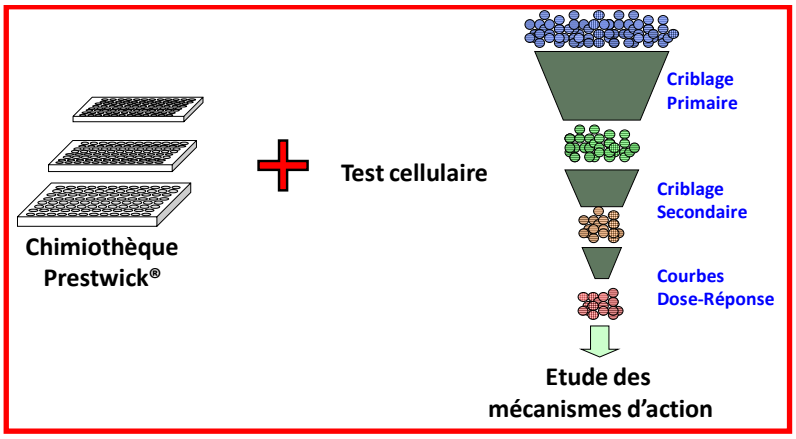


Figure 74 : Stratégie de chimie-biologie.
La chimiothèque est criblée sur des cellules en utilisant un test cellulaire. Lors du criblage primaire, les composés sont testés une seule fois à 50µM. Au criblage secondaire, les composés sont testés en duplicata à 5µM et 50µM. Lors des courbes dose-réponse, les composés sont testés à 1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM en triplicata. Chaque expérience de courbe dose-réponse est réalisée trois fois. Les molécules actives sur les cellules peuvent alors être optimisées et leur mécanisme d'action peut être étudié.

Le test cellulaire repose sur la présence d'ATP (adénosine triphosphate) dans les puits contenant les cellules. En effet, les cellules produisent de l'ATP, nécessaire au maintien de leurs fonctions essentielles. Les cellules ne contenant plus d'ATP sont considérées comme mortes ou ayant un métabolisme arrêté, résultant à terme, en la mort de la cellule. Le test Cell Titer-Glo® de Promega (réf. G7570) permet la mesure du taux d'ATP contenu dans les puits où sont incubées les cellules en présence d'une molécule. Ce test est basé sur la réaction présentée figure 75. Le kit Cell Titer-Glo® de Promega contient un substrat lyophilisé (*Beetle Luciferine*), et un tampon contenant l'enzyme (*Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase*), du magnésium, et un détergeant. Le détergeant lyse les cellules permettant ainsi la libération de l'ATP utilisé dans la réaction. La réaction enzymatique produit l'oxyluciférine, de l'adénosine monophosphate (AMP), du pyrophosphate (PPi), du dioxyde de carbone (CO_2) et de la lumière. La lumière émise par la réaction est détectée par le luminomètre Victor3 (Perkin-Elmer Inc.).

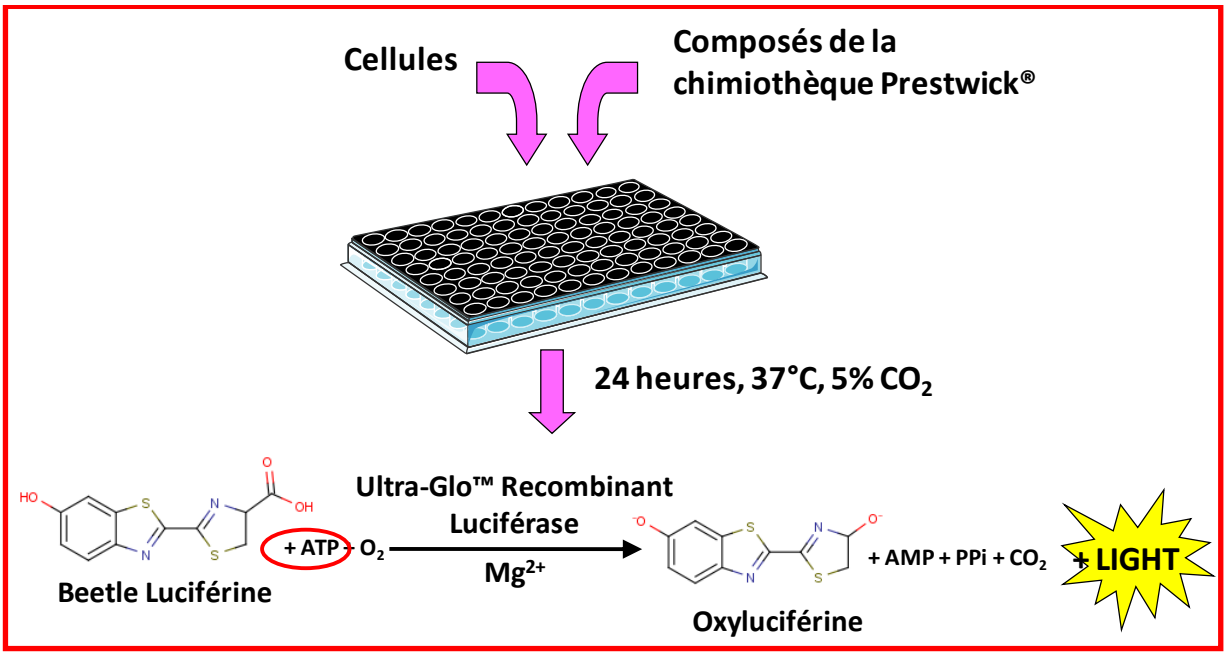


Figure 75 : Principe du test basé sur l'ATP, Cell Titer-Glo® de Promega.
Les cellules sont déposées dans des plaques noires à fond transparent et sont traitées avec les composés de la chimiothèque Prestwick®. Les cellules sont incubées 24 heures à 37°C, 5% de CO_2 et 95% humidité. A la fin de l'incubation, l'ATP contenu dans les puits est mesuré à l'aide du test Cell Titer-Glo® (Promega) contenant le substrat (Beetle Luciférine) ainsi qu'une enzyme (Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase) et du magnésium (Mg^{2+}). La réaction utilise l'ATP contenu dans les cellules et l'oxygène (O_2) de l'air pour produire l'oxyluciférine, de l'adénosine monophosphate (AMP), du dioxyde de carbone (CO_2), du pyrophosphate (PPi) et de la lumière qui est alors détectée par un luminomètre.

6.6.1. La mise au point du criblage

La mise au point est nécessaire afin de déterminer le nombre de cellules nécessaires par puits pour que le test fonctionne, mais également pour déterminer le contrôle positif à utiliser pour vérifier le bon fonctionnement du test.

Pour chaque type cellulaire, nous avons testé dans des plaques Greiner® (réf. 655090) différentes quantités de cellules par puits (5000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 80000, 100000, 200000 et 400000 cellules par puits) en triplicata. Une gamme d'ATP (0,1µM ; 0,5µM ; 1µM ; 2µM ; 4µM ; 6µM ; 8µM et 10µM par puits) a été réalisée afin de vérifier la linéarité du test dans le milieu de chaque type cellulaire.

Le contrôle négatif est constitué par les cellules à tester, incubées dans leur milieu de culture habituel supplémenté d'1% de DMSO. Pour le choix du contrôle positif, différents composés antagonistes de la calmoduline (ophioboline A, trifluopérazine et W13) ont été testés à 50µM et 100µM, 1% de DMSO (Sigma-Aldrich® Réf : 154938-1L) final, sur 50000 et 100000 cellules TG1 en prolifération et en quiescence. Pour la mise au point sur les autres types cellulaires, des molécules issues du criblage sur les cellules TG1 ont été testées en tant que témoin positif (terfénadine, prazosine, astémizole, sertraline) à 50µM et 100µM, 1% de DMSO final, sur 50000 et 100000 cellules.

6.6.2. Le criblage primaire

Le criblage primaire est effectué sur les cellules TG1 proliférantes à passage 14 d'une part et sur les cellules TG1 quiescentes à passage 10 d'autre part. Ces expériences ont été réalisées à la plateforme de criblage PCBIS (plateforme de chimie biologie intégrative de Strasbourg) (UMS 3786) avec l'aide d'Adeline Obrecht et du Dr Maria Zeniou.

6.6.2.1. Préparation des cellules

Les cellules sont prélevées, centrifugées 10min à 115g. Le surnageant des cellules TG1 proliférantes est éliminé, celui des cellules TG1 quiescentes est conservé pour la dilution des composés et l'incubation des cellules quiescentes. Le surnageant des cellules quiescentes est appelé milieu conditionné des cellules quiescentes. Les cellules proliférantes sont dissociées mécaniquement dans du milieu NS34 fraichement préparé. Les cellules TG1 quiescentes sont dissociées mécaniquement dans leur milieu conditionné. Les cellules sont diluées dans leur milieux respectifs (NS34 fraichement préparé pour les cellules TG1 proliférantes et milieu conditionné des cellules quiescentes pour les TG1 quiescentes) et

comptées selon le protocole donné paragraphe 6.1.1.1 page 196. Les cellules proliférantes et quiescentes sont déposées dans des plaques Greiner® (réf. 655090) noires à fond transparent à l'aide du robot Biomek® Fx (Beckman Coulter's) à raison de 30000 cellules proliférantes et 40000 cellules quiescentes dans 50µL par puits.

6.6.2.2. Préparation des composés et traitement des cellules

Les 14 plaques de la chimiothèque Prestwick® destinées au criblage primaire sont décongelées. Les composés sont dilués dans le milieu respectif des cellules TG1 proliférantes et des cellules quiescentes à l'aide du robot Biomek® 2000 (Beckman Coulter's) à une concentration finale de 100µM. Les cellules sont ensuite traitées avec les composés de la chimiothèque lorsque le robot Biomek® Fx dépose 50µL de composés à 100µM dans les 50µL de suspension cellulaire. Les plaques contenant les cellules traitées sont ensuite incubées 24 heures à 37°C, 5% CO_2.

Les cellules sont donc traitées avec 50µM de chaque composé de la chimiothèque Prestwick et 1% de DMSO final. Les cellules du contrôle positif sont traitées avec l'ophioboline A à 50µM et 1% de DMSO final. Les cellules du contrôle négatif sont traitées avec 1% de DMSO final.

6.6.2.3. Lecture des résultats

Après 24 heures d'incubation, les plaques sont sorties de l'incubateur et l'absence de contaminations est vérifiée sous microscope.

Le kit Cell Titer-Glo® de Promega est préparé en versant dans le contenu du flacon « buffer » dans le flacon « substrate ». Le robot Biomek® 2000 (Beckman Coulter's) dépose 100µL de ce réactif dans chaque puits de la plaque contenant les cellules traitées. La plaque est ensuite analysée à l'aide du luminomètre Victor3 (Perkin-Elmer Inc.) La luminescence de chaque puits est mesurée pendant 1 seconde, les résultats obtenus sont donnés en coups par seconde (cps).

6.6.2.4. Analyse des résultats

Avant d'analyser les plaques, il faut les valider. La validation des plaques se fait en calculant la variabilité des plaques par rapport aux témoins positifs et négatifs. La variabilité (z') est calculée en appliquant la formule :

$$z' = 1 - \frac{3 \times (Sstdv_{DMSO} + Sstdv_{Oph})}{Smoy_{DMSO} - Smoy_{Oph}}$$

où : $Sstdv_{DMSO}$ représente la déviation standard du contrôle négatif,
$Sstdv_{Oph}$ représente la déviation standard du contrôle positif,
$Smoy_{DMSO}$ représent la moyenne du contrôle négatif,
$Smoy_{Oph}$ représente la moyenne du contrôle positif.

La valeur idéale pour le z' est de 1. Cependant, la variabilité de la plaque est acceptable si le z' est supérieur à 0,5.

L'analyse des plaques se fait par rapport aux valeurs des témoins négatifs. Les données brutes des contrôles négatifs d'une plaque sont moyennées. Le pourcentage de survie des cellules dans chaque puits est calculé en fonction de la moyenne des contrôles négatifs selon la formule suivante :

$$Survie = \frac{100 \times Spuits}{Smoy_{DMSO}}$$

où : *Spuits* représente la valeur brute d'un puits,
$Smoy_{DMSO}$ représente la moyenne des contrôles négatifs.

Sont considérées comme des « hits » ou « touches », les molécules qui sont capables d'induire dans un puits, un pourcentage de survie inférieur à 5% et/ou une valeur brute (en cps) inférieure à la moyenne des contrôles négatifs (en cps) moins 5× la déviation standard.

A l'inverse, les molécules capables d'induire dans un puits une valeur brute (en cps) supérieure à la moyenne des contrôles négatifs (en cps) plus 5× la déviation standard, sont considérée comme des molécules hyperproliférative qui seront retestées en criblage secondaire.

6.6.3. Le criblage secondaire

Le criblage primaire est effectué sur les cellules TG1 proliférantes à passage 30 d'une part et sur les cellules TG1 quiescentes à passage 25 d'autre part. Toutes les touches du criblage primaire ont été testées sur les cellules TG1 en prolifération et en quiescence. Ces expériences ont été réalisées à la plateforme de criblage PCBIS (plateforme de chimie biologie intégrative de Strasbourg) (UMS 3786) avec l'aide d'Adeline Obrecht et du Dr Maria Zeniou.

6.6.3.1. Préparation des cellules

Les cellules sont préparées comme pour le criblage primaire (voir paragraphe 6.6.2.1 page 210).

6.6.3.2. Préparation des composés et traitement des cellules

Les plaques de la chimiothèque Prestwick® destinées au criblage secondaires sont décongelées. Les plaques sont reformatées en prélevant manuellement dans les puits des plaques de la chimiothèque 5µL des composés à retester et en les déposant dans une nouvelle plaque Greiner (réf. 650201). Deux plaques sont reformatées pour diluer les composés dans les deux milieux (NS34 fraichement préparé et milieu conditionné des cellules quiescentes) à l'aide du robot Biomek 2000® (Bekman Coulter's). Les concentrations finales des composés dans les plaques Greiner (réf. 650201) sont de 100µM et 10µM ; 2% de DMSO.

Les cellules sont traitées comme au paragraphe 6.6.2.2 page 211, avec les composés de la chimiothèque Prestwick® à 50µM en duplicata et à 5µM en duplicata ; 1% DMSO final. Le contrôle positif est constitué de cellules traitées avec 50µM d'ophioboline A ; 1% de DMSO final. Le contrôle négatif est constitué de cellules traitées avec 1% de DMSO final.

6.6.3.3. Lecture et analyse des résultats

La lecture des résultats se fait comme indiqué paragraphe 6.6.2.3 page 211. L'analyse et la validation des résultats se font comme indiqué paragraphe 6.6.2.4 page 212. Cependant, les z' plaques du criblage secondaire étant un peu plus variables que pour le

criblage primaire, les molécules sont définies comme étant des « touches » confirmées si elles sont capables d'induire dans un puits, un pourcentage de survie inférieur à 5% et/ou une valeur brute (en cps) inférieure à la moyenne des contrôles négatifs (en cps) moins 3× la déviation standard.

A l'inverse, les molécules capables d'induire dans un puits une valeur brute (en cps) supérieure à la moyenne des contrôles négatifs (en cps) plus 3× la déviation standard, sont considérée comme des molécules hyperprolifératives qui seront retestées en criblage secondaire.

6.6.4. Courbes dose-réponse

Certaines des touches issues du criblage secondaire ne sont pas sélectionnées si elles sont actives à la fois sur les cellules TG1 proliférantes et les cellules TG1 quiescentes et qu'elles sont connues pour être des molécules cytotoxiques, antibactériennes, antifongiques ou antiparasitaires. Ces expériences ont été réalisées à la plateforme de criblage PCBIS (plateforme de chimie biologie intégrative de Strasbourg) (UMS 3786).

6.6.4.1. Préparation des cellules

6.6.4.1.1. Préparation des cellules souches cancéreuses

Les cellules TG1, TG16 et OB1 en prolifération et en quiescence sont préparées comme indiqué précédemment (paragraphe 6.6.2.1 page 210).

6.6.4.1.2. Préparation des cellules f-NSC

Les cellules f-NSC sont récupérées à partir de la culture cellulaire, centrifugées 5 min à 180g, et leur surnageant est éliminé. Les cellules sont dissociées chimiquement à l'aide du kit NeuroCult® Chemical Dissociation Kit (Mouse) (réf. 05707 Stem Cell Technologies) et sont ensuite passées au tamis cellulaire (réf. 352340 BD Falcon™) afin d'éliminer les amas cellulaire pour obtenir une suspension cellulaire homogène.

Les cellules sont comptées selon la méthode indiquée paragraphe 6.1.1.1 page 196, puis diluées à 2.10^6cellules/mL. La suspension cellulaire ainsi préparée est déposée dans

les puits d'une plaque Greiner (réf. 6550990) noire à fond transparent selon la méthode indiquée (paragraphe 6.6.2.1 page 210) à raison de 100000 cellules pour 50µL par puits.

6.6.4.1.3. Préparation des cellules HEK, HA, et U-87 MG

Le milieu de culture des cellules HEK, HA et U-87 MG est éliminé et les cellules sont rincées au PBS avant d'être décollées à l'aide de trypsine. Les cellules sont comptées selon la méthode indiquée paragraphe 6.1.1.1 page 196, puis diluées à 10^6 cellules/mL. La suspension cellulaire ainsi préparée est déposée dans les puits d'une plaque Greiner (réf. 6550990) noire à fond transparent selon la méthode indiquée (paragraphe 6.6.2.1 page 210) à raison de 50000 cellules pour 50µL par puits.

6.6.4.2. Préparation des composés

Les composés sont pesés à partir des poudres, et dissous dans du DMSO 100% (réf : 154938-1L Sigma-Aldrich®) à une concentration de 10mM. Les composés sont ensuite dilués dans des plaques Greiner (réf. 650201), dans le milieu respectif des cellules testées. Chaque molécule à chaque concentration est testée 3 fois sur la même plaque.

Les plaques contenant les cellules sont ensuite traitées avec les composés ainsi préparés à l'aide du robot Biomek® Fx (Beckman Coulter's) incubées 24 heures à 37°C et 5% CO_2.

Les cellules sont donc traitées avec 1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM de composés ; 1% de DMSO final dans chaque puits ou si l'EC_{50} du composé est petit, les concentrations testées sont de 250nM, 500nM, 750nM, 1000nM, 1250nM, 1500nM et 1750nM ; 1% de DMSO final dans chaque puits.

6.6.4.3. Lecture et analyse des résultats

La lecture des résultats se fait comme indiqué paragraphe 6.6.2.3 page 211. L'analyse est effectuée en calculant les moyennes des pourcentages de survie cellulaire pour les triplicatas en fonction de la survie cellulaire du contrôle négatif. Le graphique de la survie cellulaire en fonction de la concentration en composé est tracé et les données sont ajustées par une courbe théorique permettant le calcul de l'EC_{50}.

Les courbes ont été ajustées en utilisant l'équation de Hill :

$$S_{Théo} = \frac{S_{max} + S_{min} \times ([composé] \times \frac{1}{EC_{50}})^n}{1 + ([composé] \times \frac{1}{EC_{50}})^n}$$

Avec :

$S_{Théo}$: le signal théorique calculé d'après l'équation

S_{max} : le signal maximum obtenu (en théorie : 100%)

S_{min} : le signal minimum obtenu (0% dans la majorité des cas, mais toujours positif)

[composé] : la concentration du composé testé

EC_{50} : concentration a laquelle, le composé testé produit 50% de la réponse maximale

n : coefficient de Hill

6.7. Etude de l'apoptose des cellules TG en réponse à une molécule

L'apoptose est étudiée afin de déterminer si la toxicité de certaines molécules issues du criblage passe par la voie apoptotique ou par un autre mécanisme (nécrose, autophagie). Cette expérience a été réalisée par Jihu Dong, doctorant en 1ère année au laboratoire.

L'apoptose est mesurée à l'aide du kit Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega). Ce test permet de mesurer l'activité des caspases 3 et 7. Il combine un substrat non-fluorescent des caspases 3/7, la rhodamine 110 bis-(N-CBZ-l-aspartyl-l-glutamyl-l-valyl-aspartic acid amide) (Z-DEVD-R110), et un tampon permettant la lyse les cellules et la mesure de l'activité enzymatique optimale des caspases 3/7. La coupure de la liaison du substrat synthétique entre l'acide aspartique dans la partie carboxy-terminale et la rhodamine permet la libération de la rhodamine110 qui devient fluorescente. L'activité caspase est mesurée par l'émission de fluorescence à 521 nm, après excitation du fluorophore à 498 nm.

Les cellules sont traitées par le composé à étudier pendant 24h. Les réactifs sont ensuite ajoutés dans les puits en accord avec les instructions du fabriquant. Après 4h d'incubation, la fluorescence (498 / 521nm) est mesurée dans chaque puits à l'aide du fluorimètre Victor3 (Perkin-Elmer Inc.).

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

Adams DJ. The impact of tumor physiology on camptothecin-based drug development. Curr Med Chem Anticancer Agents 2005; 5: 1-13.

Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, et al. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. J Immunol 2000; 165: 5269-77.

Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. Nat Biotechnol 2007; 25: 803-16.

Ahmed S. The culture of neural stem cells. J Cell Biochem 2009; 106: 1-6.

Aisen P. Transferrin receptor 1. Int J Biochem Cell Biol 2004; 36: 2137-43.

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

Al Saleh S, Sharaf LH, Luqmani YA. Signalling pathways involved in endocrine resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition (Review). Int J Oncol 2011; 38: 1197-217.

Aslanian R, Piwinski JJ, Zhu X, Priestley T, Sorota S, Du XY, et al. Structural determinants for histamine H(1) affinity, hERG affinity and QTc prolongation in a series of terfenadine analogs. Bioorg Med Chem Lett 2009; 19: 5043-7.

Bagci T, Wu JK, Pfannl R, Ilag LL, Jay DG. Autocrine semaphorin 3A signaling promotes glioblastoma dispersal. Oncogene 2009; 28: 3537-50.

Baldi I, Huchet A, Bauchet L, Loiseau H. [Epidemiology of glioblastoma]. Neurochirurgie 2010; 56: 433-40.

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

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: 2524-33.

Barbieri F, Bajetto A, Porcile C, Pattarozzi A, Schettini G, Florio T. Role of stromal cell-derived factor 1 (SDF1/CXCL12) in regulating anterior pituitary function. J Mol Endocrinol 2007; 38: 383-9.

Barker N. The canonical Wnt/beta-catenin signalling pathway. Methods Mol Biol 2008; 468: 5-15.

Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. Physiol Rev 2001; 81: 871-927.

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

Bhola NE, Freilino ML, Joyce SC, Sen M, Thomas SM, Sahu A, et al. Anti-tumor mechanisms of targeting the PDK1 pathway in head and neck cancer. Mol Cancer Ther 2012.

Biliran H, Jr., Wang Y, Banerjee S, Xu H, Heng H, Thakur A, et al. Overexpression of cyclin D1 promotes tumor cell growth and confers resistance to cisplatin-mediated apoptosis in an elastase-myc transgene-expressing pancreatic tumor cell line. Clin Cancer Res 2005; 11: 6075-86.

Blank U, Karlsson G, Karlsson S. Signaling pathways governing stem-cell fate. Blood 2008; 111: 492-503.

Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. Curr Opin Cell Biol 2003; 15: 725-31.

Bonavia R, Inda MD, Cavenee WK, Furnari FB. Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network. Cancer Res 2011; 71: 4055-60.

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

Bossa R, Benvenuti C, Cantoni V, Galatulas I. H2 antagonists and therapy of rodent tumours. Cancer Lett 1983; 20: 231-4.

Brandenberger R, Wei H, Zhang S, Lei S, Murage J, Fisk GJ, et al. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. Nat Biotechnol 2004; 22: 707-16.

Burglin TR. The Hedgehog protein family. Genome Biol 2008; 9: 241.

Calderon P, van Dorsser W, Geocze von Szendroi K, De Mey JG, Roba J. In vitro vasorelaxing activity of suloctidil. Arch Int Pharmacodyn Ther 1986; 284: 101-13.

Callihan P, Mumaw J, Machacek DW, Stice SL, Hooks SB. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation by G protein coupled receptors. Pharmacol Ther 2011; 129: 290-306.

Carracedo A, Lorente M, Egia A, Blazquez C, Garcia S, Giroux V, et al. The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. Cancer Cell 2006; 9: 301-12.

Carujo S, Estanyol JM, Ejarque A, Agell N, Bachs O, Pujol MJ. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is a SET-binding protein and regulates cyclin B-cdk1 activity. Oncogene 2006; 25: 4033-42.

Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106: 14016-21.

Chen Y, Deng J, Fujimoto J, Kadara H, Men T, Lotan D, et al. Gprc5a deletion enhances the transformed phenotype in normal and malignant lung epithelial cells by eliciting persistent Stat3 signaling induced by autocrine leukemia inhibitory factor. Cancer Res 2012; 70: 8917-26.

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

Chien JM, Chou CT, Pan CC, Kuo CC, Tsai JY, Liao WC, et al. The mechanism of sertraline-induced [Ca2+]i rise in human OC2 oral cancer cells. Hum Exp Toxicol 2011.

Chu EC, Tarnawski AS. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. Med Sci Monit 2004; 10: RA235-41.

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Res 2006; 66: 9339-44.

Cohen MH, Shen YL, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. Oncologist 2009; 14: 1131-8.

Coller HA. Cell biology. The essence of quiescence. Science 2011; 334: 1074-5.

Coller HA, Sang L, Roberts JM. A new description of cellular quiescence. PLoS Biol 2006; 4: e83.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. Cancer Res 2005; 65: 10946-51.

Cosse JP, Michiels C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. Anticancer Agents Med Chem 2008; 8: 790-7.

Costa BM, Ferreira P, Costa S, Canedo P, Oliveira P, Silva A, et al. Association between functional EGF+61 polymorphism and glioma risk. Clin Cancer Res 2007; 13: 2621-6.

Couldwell WT, Hinton DR, He S, Chen TC, Sebat I, Weiss MH, et al. Protein kinase C inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cell lines. FEBS Lett 1994; 345: 43-6.

Dahmane N, Sanchez P, Gitton Y, Palma V, Sun T, Beyna M, et al. The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. Development 2001; 128: 5201-12.

Daumas-Duport C, Beuvon F, Varlet P, Fallet-Bianco C. [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. Ann Pathol 2000; 20: 413-28.

Davies JQ, Lin HH, Stacey M, Yona S, Chang GW, Gordon S, et al. Leukocyte adhesion-GPCR EMR2 is aberrantly expressed in human breast carcinomas and is associated with patient survival. Oncol Rep 2011; 25: 619-27.

de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. Lancet Oncol 2012.

Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2009; 14: 3-9.

Del Bigio MR. Ependymal cells: biology and pathology. Acta Neuropathol 2009; 119: 55-73.

Dell'Albani P. Stem cell markers in gliomas. Neurochem Res 2008; 33: 2407-15.

Diamandis P, Wildenhain J, Clarke ID, Sacher AG, Graham J, Bellows DS, et al. Chemical genetics reveals a complex functional ground state of neural stem cells. Nat Chem Biol 2007; 3: 268-73.

Ding S, Chen F, Klitzner TS, Wetzel GT. Inhibition of L-type Ca2+ channel current in Xenopus oocytes by amiodarone. J Investig Med 2001; 49: 346-52.

Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. Nat Rev Cancer 2007; 7: 79-94.

Doyle SE, Scholz MJ, Greer KA, Hubbard AD, Darnell DK, Antin PB, et al. Latrophilin-2 is a novel component of the epithelial-mesenchymal transition within the atrioventricular canal of the embryonic chicken heart. Dev Dyn 2006; 235: 3213-21.

Doyonnas R, Nielsen JS, Chelliah S, Drew E, Hara T, Miyajima A, et al. Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. Blood 2005; 105: 4170-8.

Egidy G, Eberl LP, Valdenaire O, Irmler M, Majdi R, Diserens AC, et al. The endothelin system in human glioblastoma. Lab Invest 2000; 80: 1681-9.

Ehtesham M, Yuan X, Kabos P, Chung NH, Liu G, Akasaki Y, et al. Glioma tropic neural stem cells consist of astrocytic precursors and their migratory capacity is mediated by CXCR4. Neoplasia 2004; 6: 287-93.

Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. Brain Res 1971; 28: 351-4.

Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. Cell Death Differ 2008; 15: 504-14.

Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, et al. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. Stem Cells 2010; 28: 5-16.

Farack UM, Gruber E, Loeschke K. The influence of bisacodyl and deacetylbisacodyl on mucus secretion, mucus synthesis and electrolyte movements in the rat colon in vivo. Eur J Pharmacol 1985; 117: 215-22.

Fareh M, Turchi L, Virolle V, Debruyne D, Almairac F, de-la-Forest Divonne S, et al. The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. Cell Death Differ 2011.

Feng Y, Huang J, Ding Y, Xie F, Shen X. Tamoxifen-induced apoptosis of rat C6 glioma cells via PI3K/Akt, JNK and ERK activation. Oncol Rep 2010; 24: 1561-7.

Figarella-Branger D, Colin C, Tchoghandjian A, Baeza N, Bouvier C. [Glioblastomas: gliomagenesis, genetics, angiogenesis, and microenvironment]. Neurochirurgie 2010; 56: 441-8.

Fischer U, Wullich B, Sattler HP, Gottert E, Zang KD, Meese E. DNA amplifications on chromosomes 7, 9 and 12 in glioblastoma detected by reverse chromosome painting. Eur J Cancer 1994; 30A: 1124-7.

Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. Neurol Clin 2007; 25: 867-90, vii.

Flordellis CS. The plasticity of the 7TMR signaling machinery and the search for pharmacological selectivity. Curr Pharm Des 2012; 18: 145-60.

Francesconi AB, Dupre S, Matos M, Martin D, Hughes BG, Wyld DK, et al. Carboplatin and etoposide combined with bevacizumab for the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. J Clin Neurosci 2010; 17: 970-4.

Friemel A, Zunkler BJ. Interactions at human ether-a-go-go-related gene channels. Toxicol Sci 2010; 114: 346-55.

Fromtling RA. Overview of medically important antifungal azole derivatives. Clin Microbiol Rev 1988; 1: 187-217.

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

Gaginella TS, Mascolo N, Izzo AA, Autore G, Capasso F. Nitric oxide as a mediator of bisacodyl and phenolphthalein laxative action: induction of nitric oxide synthase. J Pharmacol Exp Ther 1994; 270: 1239-45.

Gal H, Makovitzki A, Amariglio N, Rechavi G, Ram Z, Givol D. A rapid assay for drug sensitivity of glioblastoma stem cells. Biochem Biophys Res Commun 2007; 358: 908-13.

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

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer Res 2004; 64: 7011-21.

Garcia-Quiroz J, Camacho J. Astemizole: an old anti-histamine as a new promising anti-cancer drug. Anticancer Agents Med Chem 2011; 11: 307-14.

Ghosh AK, Hirasawa N, Ohuchi K. Enhancement by histamine of vascular endothelial growth factor production in granulation tissue via H(2) receptors. Br J Pharmacol 2001; 134: 1419-28.

Giannoni E, Bianchini F, Calorini L, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts exploit reactive oxygen species through a proinflammatory signature leading to epithelial mesenchymal transition and stemness. Antioxid Redox Signal 2011; 14: 2361-71.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. Cell Stem Cell 2007; 1: 555-67.

Gomez-Lopez S, Wiskow O, Favaro R, Nicolis SK, Price DJ, Pollard SM, et al. Sox2 and Pax6 maintain the proliferative and developmental potential of gliogenic neural stem cells In vitro. Glia 2011; 59: 1588-99.

Gresner SM, Golanska E, Kulczycka-Wojdala D, Jaskolski DJ, Papierz W, Liberski PP. Selection of reference genes for gene expression studies in astrocytomas. Anal Biochem 2011; 408: 163-5.

Grindley JC, Davidson DR, Hill RE. The role of Pax-6 in eye and nasal development. Development 1995; 121: 1433-42.

Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Dougherty JD, Le Belle J, Zack JA, et al. PTEN negatively regulates neural stem cell self-renewal by modulating G0-G1 cell cycle entry. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 111-6.

Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. Cell 2009; 138: 645-59.

Gupta R, Webb-Myers R, Flanagan S, Buckland ME. Isocitrate dehydrogenase mutations in diffuse gliomas: clinical and aetiological implications. J Clin Pathol 2011; 64: 835-44.

Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, et al. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. Dev Cell 2005; 9: 617-28.

Haberer S, Assouline A, Mazeron JJ. [Malignant gliomas]. Cancer Radiother 2010; 14 Suppl 1: S14-22.

Hait WN, Gesmonde JF, Lazo JS. Effect of anti-calmodulin drugs on the growth and sensitivity of C6 rat glioma cells to bleomycin. Anticancer Res 1994; 14: 1711-21.

Han W, Sun J, Feng L, Wang K, Li D, Pan Q, et al. Autophagy inhibition enhances daunorubicin-induced apoptosis in K562 cells. PLoS One 2011; 6: e28491.

Hatakeyama M. System properties of ErbB receptor signaling for the understanding of cancer progression. Mol Biosyst 2007; 3: 111-6.

Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. Neoplasia 2010; 12: 675-84.

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

Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. Cell Stem Cell 2007; 1: 313-23.

Holdhoff M, Grossman SA. Controversies in the adjuvant therapy of high-grade gliomas. Oncologist 2011; 16: 351-8.

Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. Nat Genet 2000; 25: 55-7.

Howard BM, Gursel DB, Bleau AM, Beyene RT, Holland EC, Boockvar JA. EGFR signaling is differentially activated in patient-derived glioblastoma stem cells. J Exp Ther Oncol 2010; 8: 247-60.

Hu YY, Zheng MH, Cheng G, Li L, Liang L, Gao F, et al. Notch signaling contributes to the maintenance of both normal neural stem cells and patient-derived glioma stem cells. BMC Cancer 2011; 11: 82.

Huang C, Cheng J, Liu S, Chen I, Tsai J, Chou C, et al. Fendiline-evoked [Ca2+]i rises and non-Ca2+-triggered cell death in human oral cancer cells. Hum Exp Toxicol 2009; 28: 41-8.

Huang JK, Chang HT, Chou CT, Shu SS, Kuo CC, Tsai JY, et al. The Mechanism of Sertraline-induced [Ca(2+)](i) Rise in Human PC3 Prostate Cancer Cells. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2011; 109: 103-110.

Hwang TL, Liang Y, Chien KY, Yu JS. Overexpression and elevated serum levels of phosphoglycerate kinase 1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. Proteomics 2006; 6: 2259-72.

Ide T, Ninomiya-Tsuji J, Ferrari S, Philiponis V, Baserga R. Expression of growth-regulated genes in tsJT60 cells, a temperature-sensitive mutant of the cell cycle. Biochemistry 1986; 25: 7041-6.

Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, et al. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 18117-22.

Ishikawa M, Fujita R, Takayanagi M, Takayanagi Y, Sasaki K. Reversal of acquired resistance to doxorubicin in K562 human leukemia cells by astemizole. Biol Pharm Bull 2000; 23: 112-5.

Jan CR, Lee KC, Chou KJ, Cheng JS, Wang JL, Lo YK, et al. Fendiline, an anti-anginal drug, increases intracellular Ca2+ in PC3 human prostate cancer cells. Cancer Chemother Pharmacol 2001; 48: 37-41.

Jangi SM, Ruiz-Larrea MB, Nicolau-Galmes F, Andollo N, Arroyo-Berdugo Y, Ortega-Martinez I, et al. Terfenadine-induced apoptosis in human melanoma cells is mediated through Ca2+ homeostasis modulation and tyrosine kinase activity, independently of H1 histamine receptors. Carcinogenesis 2008; 29: 500-9.

Jiang G, Wei ZP, Pei DS, Xin Y, Liu YQ, Zheng JN. A novel approach to overcome temozolomide resistance in glioma and melanoma: Inactivation of MGMT by gene therapy. Biochem Biophys Res Commun 2011; 406: 311-4.

Jiang H, Xia Q, Wang X, Song J, Bruce IC. Luteolin induces vasorelaxion in rat thoracic aorta via calcium and potassium channels. Pharmazie 2005; 60: 444-7.

Jin K, Galvan V. Endogenous neural stem cells in the adult brain. J Neuroimmune Pharmacol 2007; 2: 236-42.

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

Kania G, Corbeil D, Fuchs J, Tarasov KV, Blyszczuk P, Huttner WB, et al. Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors. Stem Cells 2005; 23: 791-804.

Katchman AN, Koerner J, Tosaka T, Woosley RL, Ebert SN. Comparative evaluation of HERG currents and QT intervals following challenge with suspected torsadogenic and nontorsadogenic drugs. J Pharmacol Exp Ther 2006; 316: 1098-106.

Kemp CR, Willems E, Wawrzak D, Hendrickx M, Agbor Agbor T, Leyns L. Expression of Frizzled5, Frizzled7, and Frizzled10 during early mouse development and interactions with canonical Wnt signaling. Dev Dyn 2007; 236: 2011-9.

Kiehn J, Thomas D, Karle CA, Schols W, Kubler W. Inhibitory effects of the class III antiarrhythmic drug amiodarone on cloned HERG potassium channels. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1999; 359: 212-9.

Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. Cell 2005; 121: 823-35.

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. Cell Metab 2006; 3: 177-85.

Kim KE, Kim KU, Kim DC, Park JI, Han JY. Cytogenetic characterizations of central nervous system tumors: the first comprehensive report from a single institution in Korea. J Korean Med Sci 2009; 24: 453-60.

King TD, Zhang W, Suto MJ, Li Y. Frizzled7 as an emerging target for cancer therapy. Cell Signal 2012; 24: 846-51.

Kobilka BK. Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. Trends Pharmacol Sci 2011; 32: 213-8.

Kobilka BK, Deupi X. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. Trends Pharmacol Sci 2007; 28: 397-406.

Koch LK, Zhou H, Ellinger J, Biermann K, Holler T, von Rucker A, et al. Stem cell marker expression in small cell lung carcinoma and developing lung tissue. Hum Pathol 2008; 39: 1597-605.

Kraljevic Pavelic S, Sedic M, Bosnjak H, Spaventi S, Pavelic K. Metastasis: new perspectives on an old problem. Mol Cancer 2011; 10: 22.

Krantz SB, Shields MA, Dangi-Garimella S, Munshi HG, Bentrem DJ. Contribution of Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells to Pancreatic Cancer Progression. J Surg Res 2011.

Krathwohl MD, Kaiser JL. Chemokines promote quiescence and survival of human neural progenitor cells. Stem Cells 2004; 22: 109-18.

Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. Annu Rev Neurosci 2009; 32: 149-84.

Kukalev A, Nord Y, Palmberg C, Bergman T, Percipalle P. Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II. Nat Struct Mol Biol 2005; 12: 238-44.

Kumar S, Sheokand N, Mhadeshwar MA, Raje CI, Raje M. Characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel transferrin receptor. Int J Biochem Cell Biol 2012; 44: 189-99.

Lai A, Tran A, Nghiemphu PL, Pope WB, Solis OE, Selch M, et al. Phase II study of bevacizumab plus temozolomide during and after radiation therapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. J Clin Oncol 2011; 29: 142-8.

Laihia JK, Kallio JP, Taimen P, Kujari H, Kahari VM, Leino L. Protodynamic intracellular acidification by cis-urocanic acid promotes apoptosis of melanoma cells in vitro and in vivo. J Invest Dermatol 2010; 130: 2431-9.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature 1994; 367: 645-8.

Lappano R, Maggiolini M. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. Nat Rev Drug Discov 2011; 10: 47-60.

Le Foll B, Gallo A, Le Strat Y, Lu L, Gorwood P. Genetics of dopamine receptors and drug addiction: a comprehensive review. Behav Pharmacol 2009; 20: 1-17.

Leclerc GJ, Leclerc GM, Barredo JC. Real-time RT-PCR analysis of mRNA decay: half-life of Beta-actin mRNA in human leukemia CCRF-CEM and Nalm-6 cell lines. Cancer Cell Int 2002; 2: 1.

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell 1990; 60: 585-95.

Lin SC, Chueh SC, Hsiao CJ, Li TK, Chen TH, Liao CH, et al. Prazosin displays anticancer activity against human prostate cancers: targeting DNA and cell cycle. Neoplasia 2007; 9: 830-9.

Lindeman GJ, Visvader JE. Insights into the cell of origin in breast cancer and breast cancer stem cells. Asia Pac J Clin Oncol 2011; 6: 89-97.

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

Liu H, Adler AS, Segal E, Chang HY. A transcriptional program mediating entry into cellular quiescence. PLoS Genet 2007; 3: e91.

Liu X, Wang L, Zhao S, Ji X, Luo Y, Ling F. beta-Catenin overexpression in malignant glioma and its role in proliferation and apoptosis in glioblastoma cells. Med Oncol 2011; 28: 608-14.

Liu Y, Zhou K, Zhang H, Shugart YY, Chen L, Xu Z, et al. Polymorphisms of LIG4 and XRCC4 involved in the NHEJ pathway interact to modify risk of glioma. Hum Mutat 2008; 29: 381-9.

Lottaz C, Beier D, Meyer K, Kumar P, Hermann A, Schwarz J, et al. Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. Cancer Res 2010; 70: 2030-40.

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

Lu QR, Park JK, Noll E, Chan JA, Alberta J, Yuk D, et al. Oligodendrocyte lineage genes (OLIG) as molecular markers for human glial brain tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 10851-6.

Lu Z, Cao Y, Wang Y, Zhang Q, Zhang X, Wang S, et al. Polymorphisms in the matrix metalloproteinase-1, 3, and 9 promoters and susceptibility to adult astrocytoma in northern China. J Neurooncol 2007; 85: 65-73.

Lublin H, Gerlach J, Hagert U, Meidahl B, Molbjerg C, Pedersen V, et al. Zuclopenthixol, a combined dopamine D1/D2 antagonist, versus haloperidol, a dopamine D2 antagonist, in tardive dyskinesia. Eur Neuropsychopharmacol 1991; 1: 541-8.

Luo F, Liu X, Yan N, Li S, Cao G, Cheng Q, et al. Hypoxia-inducible transcription factor-1alpha promotes hypoxia-induced A549 apoptosis via a mechanism that involves the glycolysis pathway. BMC Cancer 2006; 6: 26.

Luo R, Jeong SJ, Jin Z, Strokes N, Li S, Piao X. G protein-coupled receptor 56 and collagen III, a receptor-ligand pair, regulates cortical development and lamination. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108: 12925-30.

Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. Oncogene 2008; 27: 1749-58.

Maertens C, Droogmans G, Verbesselt R, Nilius B. Block of volume-regulated anion channels by selective serotonin reuptake inhibitors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2002; 366: 158-65.

Magalhaes AC, Dunn H, Ferguson SS. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. Br J Pharmacol 2012; 165: 1717-36.

Mandelzweig L, Novikov I, Sadetzki S. Smoking and risk of glioma: a meta-analysis. Cancer Causes Control 2009; 20: 1927-38.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell 2008; 133: 704-15.

Marazziti D, Di Pietro C, Golini E, Mandillo S, Matteoni R, Tocchini-Valentini GP. Macroautophagy of the GPR37 orphan receptor and Parkinson disease-associated neurodegeneration. Autophagy 2009; 5: 741-2.

Marie SK, Shinjo SM. Metabolism and brain cancer. Clinics (Sao Paulo) 2011; 66 Suppl 1: 33-43.

Marin-Hernandez A, Gallardo-Perez JC, Ralph SJ, Rodriguez-Enriquez S, Moreno-Sanchez R. HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. Mini Rev Med Chem 2009; 9: 1084-101.

Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. Trends Pharmacol Sci 2001; 22: 368-76.

Martinkova E, Maglott A, Leger DY, Bonnet D, Stiborova M, Takeda K, et al. alpha5beta1 integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells. Int J Cancer 2011; 127: 1240-8.

Matsumoto M, Beltaifa S, Weickert CS, Herman MM, Hyde TM, Saunders RC, et al. A conserved mRNA expression profile of SREB2 (GPR85) in adult human, monkey, and rat forebrain. Brain Res Mol Brain Res 2005; 138: 58-69.

Matsushita H, Lelianova VG, Ushkaryov YA. The latrophilin family: multiply spliced G protein-coupled receptors with differential tissue distribution. FEBS Lett 1999; 443: 348-52.

McCarty MF, Whitaker J. Manipulating tumor acidification as a cancer treatment strategy. Altern Med Rev 2010; 15: 264-72.

Medina VA, Rivera ES. Histamine receptors and cancer pharmacology. Br J Pharmacol 2010; 161: 755-67.

Mitsuzawa H, Kimura M, Kanda E, Ishihama A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and actin associate with RNA polymerase II and interact with its Rpb7 subunit. FEBS Lett 2005; 579: 48-52.

Moore N, Lyle S. Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: a review of the evidence and discussion of significance. J Oncol 2010; 2011.

Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. PLoS One 2008; 3: e2888.

Morris JC, Chiche J, Grellier C, Lopez M, Bornaghi LF, Maresca A, et al. Targeting hypoxic tumor cell viability with carbohydrate-based carbonic anhydrase IX and XII inhibitors. J Med Chem 2011; 54: 6905-18.

Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. Nature 2006; 441: 1068-74.

Nag S. Morphology and properties of astrocytes. Methods Mol Biol 2011; 686: 69-100.

Nakai E, Park K, Yawata T, Chihara T, Kumazawa A, Nakabayashi H, et al. Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma. Cancer Invest 2009; 27: 901-8.

Nambotin SB, Lefrancois L, Sainsily X, Berthillon P, Kim M, Wands JR, et al. Pharmacological inhibition of Frizzled-7 displays anti-tumor properties in hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2011; 54: 288-99.

Narbonne P, Roy R. Genes that affect both cell growth and polarity mediate stem cell quiescence. Front Biosci 2008; 13: 995-1002.

Nazarenko I, Hedren A, Sjodin H, Orrego A, Andrae J, Afink GB, et al. Brain abnormalities and glioma-like lesions in mice overexpressing the long isoform of PDGF-A in astrocytic cells. PLoS One 2011; 6: e18303.

Nobusawa S, Lachuer J, Wierinckx A, Kim YH, Huang J, Legras C, et al. Intratumoral patterns of genomic imbalance in glioblastomas. Brain Pathol 2010; 20: 936-44.

Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Kriegstein AR. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. J Comp Neurol 2008; 508: 28-44.

Noel G, Schott R, Froelich S, Gaub MP, Boyer P, Fischer-Lokou D, et al. Retrospective Comparison of Chemoradiotherapy Followed by Adjuvant Chemotherapy, With or Without Prior Gliadel Implantation (Carmustine) After Initial Surgery in Patients With Newly Diagnosed High-Grade Gliomas. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2011.

Novgorodov AS, El-Alwani M, Bielawski J, Obeid LM, Gudz TI. Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration. FASEB J 2007; 21: 1503-14.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. Nature 2007; 445: 106-10.

Oehler MK, Norbury C, Hague S, Rees MC, Bicknell R. Adrenomedullin inhibits hypoxic cell death by upregulation of Bcl-2 in endometrial cancer cells: a possible promotion mechanism for tumour growth. Oncogene 2001; 20: 2937-45.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. Am J Pathol 2007; 170: 1445-53.

Ono K, Takebayashi H, Ikenaka K. Olig2 transcription factor in the developing and injured forebrain; cell lineage and glial development. Mol Cells 2009; 27: 397-401.

Paillasse MR, de Medina P, Amouroux G, Mhamdi L, Poirot M, Silvente-Poirot S. Signaling through cholesterol esterification: a new pathway for the cholecystokinin 2 receptor involved in cell growth and invasion. J Lipid Res 2009; 50: 2203-11.

Panchision DM. The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. J Cell Physiol 2009; 220: 562-8.

Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. pH control mechanisms of tumor survival and growth. J Cell Physiol 2010; 226: 299-308.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science 2008; 321: 1807-12.

Patel S, Dibiase S, Meisenberg B, Flannery T, Patel A, Dhople A, et al. Phase I Clinical Trial Assessing Temozolomide and Tamoxifen With Concomitant Radiotherapy for Treatment of High-Grade Glioma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2011.

Patru C, Romao L, Varlet P, Coulombel L, Raponi E, Cadusseau J, et al. CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. BMC Cancer 2010; 10: 66.

Peereboom DM, Shepard DR, Ahluwalia MS, Brewer CJ, Agarwal N, Stevens GH, et al. Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. J Neurooncol 2011; 98: 93-9.

Perrin MJ, Kuchel PW, Campbell TJ, Vandenberg JI. Drug binding to the inactivated state is necessary but not sufficient for high-affinity binding to human ether-a-go-go-related gene channels. Mol Pharmacol 2008; 74: 1443-52.

Ping YF, Yao XH, Jiang JY, Zhao LT, Yu SC, Jiang T, et al. The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 promote glioma stem cell-mediated VEGF production and tumour angiogenesis via PI3K/AKT signalling. J Pathol 2011; 224: 344-54.

Pode-Shakked N, Harari-Steinberg O, Haberman-Ziv Y, Rom-Gross E, Bahar S, Omer D, et al. Resistance or sensitivity of Wilms' tumor to anti-FZD7 antibody highlights the Wnt pathway as a possible therapeutic target. Oncogene 2011; 30: 1664-80.

Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, et al. Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. Cell Stem Cell 2009; 4: 568-80.

Popper LD, Batra SC. Release of intracellular calcium by prenylamine in human ovarian tumour cells. Cancer Lett 1993; 71: 5-10.

Premont RT, Gainetdinov RR. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. Annu Rev Physiol 2007; 69: 511-34.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104: 973-8.

Prudent R, Moucadel V, Nguyen CH, Barette C, Schmidt F, Florent JC, et al. Antitumor activity of pyridocarbazole and benzopyridoindole derivatives that inhibit protein kinase CK2. Cancer Res 2010; 70: 9865-74.

Purow BW, Haque RM, Noel MW, Su Q, Burdick MJ, Lee J, et al. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. Cancer Res 2005; 65: 2353-63.

Qiang L, Wu T, Zhang HW, Lu N, Hu R, Wang YJ, et al. HIF-1alpha is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway. Cell Death Differ 2011.

Raghunand N, Mahoney BP, Gillies RJ. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents. Biochem Pharmacol 2003; 66: 1219-29.

Raizer JJ, Abrey LE, Lassman AB, Chang SM, Lamborn KR, Kuhn JG, et al. A phase II trial of erlotinib in patients with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy. Neuro Oncol 2011; 12: 95-103.

Raymond E. PDGFR inhibition in brain tumours--oft expectation fails where most it promises. Eur J Cancer 2009; 45: 2236-8.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001; 414: 105-11.

Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science 1992; 255: 1707-10.

Riddle VG, Dubrow R, Pardee AB. Changes in the synthesis of actin and other cell proteins after stimulation of serum-arrested cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1979; 76: 1298-302.

Riddle VG, Pardee AB. Quiescent cells but not cycling cells exhibit enhanced actin synthesis before they synthesize DNA. J Cell Physiol 1980; 103: 11-5.

Robishaw JD, Berlot CH. Translating G protein subunit diversity into functional specificity. Curr Opin Cell Biol 2004; 16: 206-9.

Rohwer N, Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. Drug Resist Updat 2011; 14: 191-201.

Ruan SQ, Wang SW, Wang ZH, Zhang SZ. Regulation of HRG-beta1-induced proliferation, migration and invasion of MCF-7 cells by upregulation of GPR30 expression. Mol Med Report 2012; 6: 131-8.

Rutka JT, Murakami M, Dirks PB, Hubbard SL, Becker LE, Fukuyama K, et al. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. J Neurosurg 1997; 87: 420-30.

Safa AR, Glover CJ, Sewell JL, Meyers MB, Biedler JL, Felsted RL. Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. J Biol Chem 1987; 262: 7884-8.

Salmaggi A, Gelati M, Pollo B, Frigerio S, Eoli M, Silvani A, et al. CXCL12 in malignant glial tumors: a possible role in angiogenesis and cross-talk between endothelial and tumoral cells. J Neurooncol 2004; 67: 305-17.

Sampson JH, Heimberger AB, Archer GE, Aldape KD, Friedman AH, Friedman HS, et al. Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. J Clin Oncol 2010; 28: 4722-9.

Sathornsumetee S, Desjardins A, Vredenburgh JJ, McLendon RE, Marcello J, Herndon JE, et al. Phase II trial of bevacizumab and erlotinib in patients with recurrent malignant glioma. Neuro Oncol 2011; 12: 1300-10.

Savoia C, Burger D, Nishigaki N, Montezano A, Touyz RM. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. Expert Rev Mol Med 2011; 13: e11.

Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, et al. Identification of cells initiating human melanomas. Nature 2008; 451: 345-9.

Schauf CL, Wilson KJ. Properties of Single K and Cl Channels in Asclepias tuberosa Protoplasts. Plant Physiol 1987; 85: 413-8.

Scholz H. Pharmacological aspects of calcium channel blockers. Cardiovasc Drugs Ther 1997; 10 Suppl 3: 869-72.

Schulte A, Gunther HS, Phillips HS, Kemming D, Martens T, Kharbanda S, et al. A distinct subset of glioma cell lines with stem cell-like properties reflects the transcriptional

phenotype of glioblastomas and overexpresses CXCR4 as therapeutic target. Glia 2011; 59: 590-602.

Sharov AA, Masui S, Sharova LV, Piao Y, Aiba K, Matoba R, et al. Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. BMC Genomics 2008; 9: 269.

Shashidhar S, Lorente G, Nagavarapu U, Nelson A, Kuo J, Cummins J, et al. GPR56 is a GPCR that is overexpressed in gliomas and functions in tumor cell adhesion. Oncogene 2005; 24: 1673-82.

Silvestre DC, Pineda JR, Hoffschir F, Studler JM, Mouthon MA, Pflumio F, et al. Alternative lengthening of telomeres in human glioma stem cells. Stem Cells 2011; 29: 440-51.

Singec I, Knoth R, Meyer RP, Maciaczyk J, Volk B, Nikkhah G, et al. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. Nat Methods 2006; 3: 801-6.

Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. Oncogene 2010; 29: 4741-51.

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

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

Sirover MA. Subcellular dynamics of multifunctional protein regulation: Mechanisms of GAPDH intracellular translocation. J Cell Biochem 2012; 113: 2193-200.

Spencer VA, Costes S, Inman JL, Xu R, Chen J, Hendzel MJ, et al. Depletion of nuclear actin is a key mediator of quiescence in epithelial cells. J Cell Sci 2011; 124: 123-32.

Stiles CD, Rowitch DH. Glioma stem cells: a midterm exam. Neuron 2008; 58: 832-46.

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: 987-96.

Suessbrich H, Waldegger S, Lang F, Busch AE. Blockade of HERG channels expressed in Xenopus oocytes by the histamine receptor antagonists terfenadine and astemizole. FEBS Lett 1996; 385: 77-80.

Sunmonu NA, Li K, Guo Q, Li JY. Gbx2 and Fgf8 are sequentially required for formation of the midbrain-hindbrain compartment boundary. Development 2011; 138: 725-34.

Suter DM, Tirefort D, Julien S, Krause KH. A Sox1 to Pax6 switch drives neuroectoderm to radial glia progression during differentiation of mouse embryonic stem cells. Stem Cells 2009; 27: 49-58.

Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, Dinulescu DM, Connolly D, Foster R, et al. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 11154-9.

Szuwart U, Bennefeld H, Behr H. Classification of gliomas and medulloblastomas using the new TNM system for cerebral tumors. Neurosurg Rev 1989; 12: 233-8.

Takara K, Sakaeda T, Kakumoto M, Tanigawara Y, Kobayashi H, Okumura K, et al. Effects of alpha-adrenoceptor antagonist doxazosin on MDR1-mediated multidrug resistance and transcellular transport. Oncol Res 2009; 17: 527-33.

Takayasu S, Sakurai T, Iwasaki S, Teranishi H, Yamanaka A, Williams SC, et al. A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 7438-43.

Tang XL, Wang Y, Li DL, Luo J, Liu MY. Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets. Acta Pharmacol Sin 2012; 33: 363-71.

Taylor MA, Parvani JG, Schiemann WP. The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta in normal and malignant mammary epithelial cells. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2010; 15: 169-90.

Teft WA, Mansell SE, Kim RB. Endoxifen, the active metabolite of tamoxifen, is a substrate of the efflux transporter P-glycoprotein (multidrug resistance 1). Drug Metab Dispos 2011; 39: 558-62.

Terasaki M, Sugita Y, Arakawa F, Okada Y, Ohshima K, Shigemori M. CXCL12/CXCR4 signaling in malignant brain tumors: a potential pharmacological therapeutic target. Brain Tumor Pathol 2011; 28: 89-97.

Thathiah A, De Strooper B. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci 2011; 12: 73-87.

The INTERPHONE Study Group. Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. Int J Epidemiol 2010; 39: 675-94.

Theodossiou TA, Galanou MC, Paleos CM. Novel amiodarone-doxorubicin cocktail liposomes enhance doxorubicin retention and cytotoxicity in DU145 human prostate carcinoma cells. J Med Chem 2008; 51: 6067-74.

Thirant C, Bessette B, Varlet P, Puget S, Cadusseau J, Tavares Sdos R, et al. Clinical relevance of tumor cells with stem-like properties in pediatric brain tumors. PLoS One 2011; 6: e16375.

Thomas D, Gut B, Karsai S, Wimmer AB, Wu K, Wendt-Nordahl G, et al. Inhibition of cloned HERG potassium channels by the antiestrogen tamoxifen. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2003; 368: 41-8.

Thomas D, Wimmer AB, Wu K, Hammerling BC, Ficker EK, Kuryshev YA, et al. Inhibition of human ether-a-go-go-related gene potassium channels by alpha 1-adrenoceptor antagonists prazosin, doxazosin, and terazosin. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2004; 369: 462-72.

Tripathi O, Schreibmayer W, Tritthart HA. Fendiline inhibits L-type calcium channels in guinea-pig ventricular myocytes: a whole-cell patch-clamp study. Br J Pharmacol 1993; 108: 865-9.

Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, Sawa A. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. Cell Signal 2011; 23: 317-23.

Tseng D, Vasquez-Medrano DA, Brown JM. Targeting SDF-1/CXCR4 to inhibit tumour vasculature for treatment of glioblastomas. Br J Cancer 2011.

Uchida H, Arita K, Yunoue S, Yonezawa H, Shinsato Y, Kawano H, et al. Role of sonic hedgehog signaling in migration of cell lines established from CD133-positive malignant glioma cells. J Neurooncol 2011.

Ueno K, Hazama S, Mitomori S, Nishioka M, Suehiro Y, Hirata H, et al. Down-regulation of frizzled-7 expression decreases survival, invasion and metastatic capabilities of colon cancer cells. Br J Cancer 2009; 101: 1374-81.

Unal H, Karnik SS. Domain coupling in GPCRs: the engine for induced conformational changes. Trends Pharmacol Sci 2012; 33: 79-88.

van Dartel M, Leenstra S, Troost D, Hulsebos TJ. Infrequent but high-level amplification of 17p11.2 approximately p12 in human glioma. Cancer Genet Cytogenet 2003; 140: 162-6.

van der Graaf WT, de Vries EG, Uges DR, Nanninga AG, Meijer C, Vellenga E, et al. In vitro and in vivo modulation of multi-drug resistance with amiodarone. Int J Cancer 1991; 48: 616-22.

Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, et al. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 4903-8.

Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. Cancer Res 1989; 49: 6449-65.

Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. Nat Rev Cancer 2006; 6: 425-36.

Veselska R, Kuglik P, Cejpek P, Svachova H, Neradil J, Loja T, et al. Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme. BMC Cancer 2006; 6: 32.

Virchow R. Editoral Archiv fuer pathologische Anatomie und Physiologie und fuer klinische Medizin. pathologische Anatomie und Physiologie und fuer klinische Medizin 1858; 8: 23.

Visnyei K, Onodera H, Damoiseaux R, Saigusa K, Petrosyan S, De Vries D, et al. A molecular screening approach to identify and characterize inhibitors of glioblastoma multiforme stem cells. Mol Cancer Ther 2011.

Visvader JE. Cells of origin in cancer. Nature 2011; 469: 314-22.

Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. Nat Rev Neurosci 2005; 6: 626-40.

Wang J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Boe SO, Svendsen A, et al. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. Int J Cancer 2008a; 122: 761-8.

Wang J, Wang C, Meng Q, Li S, Sun X, Bo Y, et al. siRNA targeting Notch-1 decreases glioma stem cell proliferation and tumor growth. Mol Biol Rep 2011a.

Wang J, Ying G, Jung Y, Lu J, Zhu J, Pienta KJ, et al. Characterization of phosphoglycerate kinase-1 expression of stromal cells derived from tumor microenvironment in prostate cancer progression. Cancer Res 2010a; 70: 471-80.

Wang JS, Zhu HJ, Gibson BB, Markowitz JS, Donovan JL, DeVane CL. Sertraline and its metabolite desmethylsertraline, but not bupropion or its three major metabolites, have high affinity for P-glycoprotein. Biol Pharm Bull 2008b; 31: 231-4.

Wang KY, Tanimoto A, Yamada S, Guo X, Ding Y, Watanabe T, et al. Histamine regulation in glucose and lipid metabolism via histamine receptors: model for nonalcoholic steatohepatitis in mice. Am J Pathol 2010b; 177: 713-23.

Wang LD, Wang M, Todisco A, Grand E, del Valle J. The human histamine H(2) receptor regulates c-jun and c-fos in a differential manner. Am J Physiol Cell Physiol 2000; 278: C1246-55.

Wang QZ, Lu YH, Jiang N, Diao Y, Xu RA. The asymmetric division and tumorigenesis of stem cells. Chin J Cancer 2011b; 29: 248-53.

Wang X, Kruithof-de Julio M, Economides KD, Walker D, Yu H, Halili MV, et al. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. Nature 2009; 461: 495-500.

Wang Y, Liu Y, Malek SN, Zheng P. Targeting HIF1alpha eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. Cell Stem Cell 2011c; 8: 399-411.

Warburg O. On the origin of cancer cells. Science 1956; 123: 309-14.

Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. Clin Cancer Res 2008; 14: 6735-41.

Weber RG, Sabel M, Reifenberger J, Sommer C, Oberstrass J, Reifenberger G, et al. Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization. Oncogene 1996; 13: 983-94.

Wermuth CG. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. J Med Chem 2004; 47: 1303-14.

Wermuth CG. The Practice of Medical Chemistry. Academic Press Third Edition 2008.

White GR, Varley JM, Heighway J. Genomic structure and expression profile of LPHH1, a 7TM gene variably expressed in breast cancer cell lines. Biochim Biophys Acta 2000; 1491: 75-92.

Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, et al. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? Cell Mol Life Sci 2004; 61: 2510-22.

Wolstenholme AJ. Recent progress in understanding the interaction between avermectins and ligand-gated ion channels: putting the pests to sleep. Invert Neurosci 2011; 10: 5-10.

Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104: 618-23.

Wu J, Xie N, Zhao X, Nice EC, Huang C. Dissection of aberrant GPCR signaling in tumorigenesis--a systems biology approach. Cancer Genomics Proteomics 2012; 9: 37-50.

Wu ZY, Yu DJ, Soong TW, Dawe GS, Bian JS. Progesterone impairs herg trafficking by disruption of intracellular cholesterol homeostasis. J Biol Chem 2011.

Xu L, Begum S, Hearn JD, Hynes RO. GPR56, an atypical G protein-coupled receptor, binds tissue transglutaminase, TG2, and inhibits melanoma tumor growth and metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 9023-8.

Xu LL, Stackhouse BG, Florence K, Zhang W, Shanmugam N, Sesterhenn IA, et al. PSGR, a novel prostate-specific gene with homology to a G protein-coupled receptor, is overexpressed in prostate cancer. Cancer Res 2000; 60: 6568-72.

Yamada K, Kasama M, Kondo T, Shinoura N, Yoshioka M. Chromosome studies in 70 brain tumors with special attention to sex chromosome loss and single autosomal trisomy. Cancer Genet Cytogenet 1994; 73: 46-52.

Yang L, Chen G, Mohanty S, Scott G, Fazal F, Rahman A, et al. GPR56 Regulates VEGF production and angiogenesis during melanoma progression. Cancer Res 2011a; 71: 5558-68.

Yang L, Wu X, Wang Y, Zhang K, Wu J, Yuan YC, et al. FZD7 has a critical role in cell proliferation in triple negative breast cancer. Oncogene 2011b.

Yang L, Xu L. GPR56 in cancer progression: current status and future perspective. Future Oncol 2012; 8: 431-40.

Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. Cancer Cell 2008; 13: 153-66.

Yin T, Wei H, Gou S, Shi P, Yang Z, Zhao G, et al. Cancer stem-like cells enriched in panc-1 spheres possess increased migration ability and resistance to gemcitabine. Int J Mol Sci 2011; 12: 1595-604.

Zajac M, Law J, Cvetkovic DD, Pampillo M, McColl L, Pape C, et al. GPR54 (KISS1R) transactivates EGFR to promote breast cancer cell invasiveness. PLoS One 2011; 6: e21599.

Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. Cancer Res 2008; 68: 4311-20.

Zhang Y, Wang L, Zhang M, Jin M, Bai C, Wang X. Potential mechanism of interleukin-8 production from lung cancer cells: an involvement of EGF-EGFR-PI3K-Akt-Erk pathway. J Cell Physiol 2012; 227: 35-43.

Zheng B, Han M, Bernier M, Wen JK. Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. FEBS J 2009; 276: 2669-85.

Zhuang M, Yang Y, Cao F, Lu M, Wang X, Zhang J, et al. Associations of variants of CNR1 with obesity and obesity-related traits in Chinese women. Gene 2012; 495: 194-8.

ANNEXES

ANNEXE I : Liste des gènes des cartes TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array Card d'Applied Biosystems

Gènes	Nom	Catégorie	Chromosome	Non exprimé	Contrôle
ACTB	actin, beta	Cytoskeletal protein	7p22		X
ACTC	actin, alpha	Cytoskeletal protein	15q14		
AFP	alpha-fetoprotein	Transfer/carrier protein	4q13.3	X	
BRIX	brix domain containing 2	Unclassified	5p13.2		
CD34	CD34 molecule	Cell adhesion molecule	1q32		
CD9	CD9 molecule	Cell adhesion molecule	12p13		
CDH5	cadherin 5, type 2, VE-cadherin	Cell adhesion molecule	16q22.1		
CDX2	caudal type homeobox transcription factor 2	Transcription factor	13q12.2	X	
CGB	chorionic gonadotropin, beta polypeptide	Signaling molecule	19q13.33		
COL1A1	collagen, type I, alpha 1	Extracellular matrix	17q21.33		
18S	Eukaryotic 18S rRNA	Unclassified	22p12		X
COL2A1	collagen, type II, alpha 1	Extracellular matrix	6q22.1		
COMMD3	COMM domain containing 3	Unclassified	10p12.2		
CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2	Transfer/carrier protein	1q23.1		
CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1	Cytoskeletal protein	3p22.1		X
DDX4	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4	Nucleic acid binding	5q11.2	X	
DES	desmin	Cytoskeletal protein	2q35		
DNMT3B	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	Transferase	20q11.21		
EBAF	left-right determination factor 2	Signaling molecule	1q42.12		
EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	Unclassified	6q13		X
EOMES	eomesodermin homolog	Transcription factor	3p24.1		
FGF4	fibroblast growth factor 4	Signaling molecule	11q13.3	X	
FGF5	fibroblast growth factor 5	Signaling molecule	4q21.21		
FLT1	fms-related tyrosine kinase 1	Receptor	13q12.2-q12.3		
FN1	fibronectin 1	Extracellular matrix	2q35		
FOXA2	forkhead box A2	Transcription factor	20p11.21	X	
FOXD3	forkhead box D3	Transcription factor	1p31.3		
GABRB3	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 3	Ion channel	15q12		
GAL	galanin	Signaling molecule	11q13.3		
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Oxidoreductase	12p13.31		X
GATA4	GATA binding protein 4	Transcription factor	8p23.1	X	
GATA6	GATA binding protein 6	Transcription factor	18q11.2		

Gènes	Nom	Catégorie	Chromosome	Non exprimé	Contrôle
GBX2	gastrulation brain homeobox 2	Transcription factor	2q37.2		
GCG	glucagon	Signaling molecule	2q24.2	X	
GCM1	glial cells missing homolog 1	Transcription factor	6p12.1		
GDF3	growth differentiation factor 3	Signaling molecule	12p13.31	X	
GFAP	glial fibrillary acidic protein	Cytoskeletal protein	17q21.31		
GRB7	growth factor receptor-bound protein 7	Miscellaneous function	17q12		
HBB	hemoglobin, beta	Transfer/carrier protein	11p15.4	X	
HBZ	hemoglobin, zeta	Transfer/carrier protein	16p13.3	X	
HLXB9	homeobox HB9	Transcription factor	7q36.3		
IAPP	islet amyloid polypeptide	Signaling molecule	12p12.1		
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	Unclassified	11p15.5		
IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2	Miscellaneous function	11p15.5		
IL6ST	interleukin 6 signal transducer	Receptor	5q11.2		
IMP2	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	Nucleic acid binding	3q27.2		
INS	insulin	Signaling molecule	11p15.5	X	
IPF1	insulin promoter factor 1	Transcription factor	13q12.2	X	
ISL1	islet-1 transcription factor	Transcription factor	5q11.1		
KIT	v-kit sarcoma viral oncogene homolog	Receptor	4q12		
KRT1	keratin 1	Cytoskeletal protein	12q13.13	X	
LAMA1	laminin, alpha 1	Extracellular matrix	18p13.31-p11.23		
LAMB1	laminin, beta 1	Extracellular matrix	7q31.1		
LAMC1	laminin, gamma 1	Extracellular matrix	1q25.3		
LEFTB	left-right determination factor 1	Signaling molecule	1q42.12		
LIFR	leukemia inhibitory factor receptor alpha	Receptor	5p13.1		
LIN28A	lin-28 homolog	Nucleic acid binding	1p36.11		
MYF5	myogenic factor 5	Transcription factor	12q21.31	X	
MYOD1	myogenic differentiation 1	Transcription factor	11p15.1	X	
NANOG	Nanog homeobox	Transcription factor	12p13.31		
NES	nestin	Cytoskeletal protein	1q23.1		
NEUROD1	neurogenic differentiation 1	Transcription factor	2q31.3		
NOG	noggin	Signaling molecule	17q22		
NPPA	natriuretic peptide precursor A	Signaling molecule	1p36.22		

Gènes	Nom	Catégorie	Chromosome	Non exprimé	Contrôle
NR5A2	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2	Transcription factor	1q32.1		
NR6A1	nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1	Transcription factor	9q33.3		
OLIG2	oligodendrocyte lineage transcription factor 2	Transcription factor	21q22.11		
PAX4	paired box gene 4	Transcription factor	7q32.1	X	
PAX6	paired box gene 6	Transcription factor	11p13		
PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule	Cell adhesion molecule	17q23.3		
PODXL	podocalyxin-like	Extracellular matrix	7q32.3		
POU5F1	POU domain, class 5, transcription factor 1	Transcription factor	6p21.33		
PTEN	phosphatase and tensin homolog	Phosphatase	10q23.31		
PTF1A	pancreas specific transcription factor, 1a	Transcription factor	10p12.2	X	
RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	Kinase	3p25.2		X
REST	RE1-silencing transcription factor	Unclassified	4q12		
RUNX2	runt-related transcription factor 2	Transcription factor	6p21.1		
SEMA3A	semaphorin 3A	Signaling molecule	7q21.11		
SERPINA1	serpin peptidase inhibitor, member 1	Select regulatory molecule	14q32.13		
SFRP2	secreted frizzled-related protein 2	Signaling molecule	4q31.3		
SOX17	SRY (sex determining region Y)-box 17	Transcription factor	8q11.23		
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	Transcription factor	3q26.33		
SST	somatostatin	Signaling molecule	3q27.3	X	
SYCP3	synaptonemal complex protein 3	Unclassified	12q23.2		
SYP	synaptophysin	Membrane traffic protein	Xp11.23		
T	tyrosine aminotransferase	Synthase and synthetase	6q27	X	
TAT	teratocarcinoma-derived growth factor 1	Signaling molecule	16q22.2		
TDGF1	telomerase reverse transcriptase	Nucleic acid binding	3p21.31		
TERT	transcription factor CP2-like 1	Transcription factor	5p15.33		
TFCP2L1	tyrosine hydroxylase	Oxidoreductase	2q14.2		
TH	T, brachyury homolog	Transcription factor	11p15.5		
UTF1	undifferentiated embryonic cell transcription factor 1	Transcription factor	10q26.3		
WT1	Wilms tumor 1	Transcription factor	11p13	X	
Xist	X (inactive)-specific transcript	Unclassified	Xq13.2		
ZFP42	zinc finger protein 42 homolog	Transcription factor	4q35.2		

Dans ces tableaux, la colonne "non exprimé » indique les gènes qui ne sont exprimés dans aucun des types cellulaires testés. La colonne « contrôle » indique les gènes qui sont présents sur la carte en tant que gènes de contrôle pour normaliser les données.

ANNEXE II : Liste des gènes des cartes RCPG TaqMan® Array Card d'Applied Biosystem.

Gène	Nom	Chromosome	Non Exprimé	Classe	Autres
ADCYAP1R1	adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor type I	7p14		B	
ADMR	adrenomedullin receptor	12q13.3	X	A	
ADORA1	adenosine A1 receptor	1q32.1		A	
ADORA2A	adenosine A2a receptor	22q11.23		A	
ADORA2B	adenosine A2b receptor	17p12		A	
ADORA3	adenosine A3 receptor	1p13.2	X	A	
ADRA1A	adrenergic, alpha-1A-, receptor	8p21.2	X	A	
ADRA1B	adrenergic, alpha-1B-, receptor	5q33.3		A	
ADRA1D	adrenergic, alpha-1D-, receptor	20p13	X	A	
ADRA2A	adrenergic, alpha-2A-, receptor	10q25.2		A	
18S	18s	22p12			X
18S	18s	22p12			X
ADRA2B	adrenergic, alpha-2B-, receptor	2q11.1	X	A	
ADRB1	adrenergic, beta-1-, receptor	10q25.3		A	
ADRB2	adrenergic, beta-2-, receptor	5q31-q32		A	
ADRB3	adrenergic, beta-3-, receptor	8p12	X	A	
AGTR1	angiotensin II receptor, type 1	3q24	X	A	
AGTR2	angiotensin II receptor, type 2	Xq22-q23		A	
AGTRL1	angiotensin II receptor-like 1	11q12	X	A	
AVPR1A	arginine vasopressin receptor 1A	12q14-q15	X	A	
AVPR1B	arginine vasopressin receptor 1B	1q32	X	A	
AVPR2	arginine vasopressin receptor 2	Xq28	X	A	
BAI1	brain-specific angiogenesis inhibitor 1	8q24.3		B	
BAI2	brain-specific angiogenesis inhibitor 2	1p35		B	
BAI3	brain-specific angiogenesis inhibitor 3	6q12		B	
BDKRB1	bradykinin receptor B1	14q32.1-q32.2		A	
BDKRB2	bradykinin receptor B2	14q32.1-q32.2		A	
BLR1	Burkitt lymphoma receptor 1	11q23.3	X	A	
BRS3	bombesin-like receptor 3	Xq26.3	X	A	
C11ORF4	chromosome 11 hypothetical protein ORF4	11cen-q22.3		A	
C3AR1	complement component 3a receptor 1	12p13.31		A	
C5R1	complement component 5 receptor 1	19q13.3-q13.4		A	

Gène	Nom	Chromosome	Non Exprimé	Classe	Autres
CALCR	calcitonin receptor	7q21.3	X	B	
CALCRL	calcitonin receptor-like	2q32.1		B	
18S	18s	22p12			X
18S	18s	22p12			X
CASR	calcium-sensing receptor	3q13	X	C	
CCBP2	chemokine binding protein 2	3p21.3	X	A	
CCKAR	cholecystokinin A receptor	4p15.1-p15.2	X	A	
CCKBR	cholecystokinin B receptor	11p15.4		A	
CCR1	chemokine (C-C motif) receptor 1	3p21		A	
CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2	3p21.31	X	A	
CCR3	chemokine (C-C motif) receptor 3	3p21.3	X	A	
CCR4	chemokine (C-C motif) receptor 4	3p24	X	A	
CCR5	chemokine (C-C motif) receptor 5	3p21.31	X	A	
CCR6	chemokine (C-C motif) receptor 6	6q27	X	A	
CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7	17q12-q21.2	X	A	
CCR8	chemokine (C-C motif) receptor 8	3p22	X	A	
CCR9	chemokine (C-C motif) receptor 9	3p21.3	X	A	
CCRL1	chemokine (C-C motif) receptor-like 1	3q22		A	
CCRL2	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	3p21		A	
CD97	CD97 antigen	19p13		B	
CELSR1	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1	22q13.3		B	
CELSR2	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2	1p21		B	
CELSR3	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	3p21.31		B	
CHRM1	cholinergic receptor, muscarinic 1	11q13	X	A	
CHRM2	cholinergic receptor, muscarinic 2	7q31-q35	X	A	
CHRM3	cholinergic receptor, muscarinic 3	1q43		A	
CHRM4	cholinergic receptor, muscarinic 4	11p12-p11.2		A	
CHRM5	cholinergic receptor, muscarinic 5	15q26	X	A	
CMKLR1	chemokine-like receptor 1	12q24.1		A	
CNR1	cannabinoid receptor 1	6q14-q15		A	
CNR2	cannabinoid receptor 2	1p36.11	X	A	
CRHR1	corticotropin releasing hormone receptor 1	17q12-q22	X	B	

Dans ces tableaux, la colonne « non exprimé » indique les gènes qui ne sont exprimés dans aucun des 5 types cellulaires testés (TG1, OB1, f-NSC, U87-MG et HA). La colonne « Autre » indique les gènes qui ne codent pas des RCPG. Il peut s'agit de gènes de ménages ou de gène codant d'autres protéines.

Gène	Nom	Chromosome	Non Exprimé	Classe	Autres
CRHR2	corticotropin releasing hormone receptor 2	7p14.3	X	B	
CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	3p21.3		A	
CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	Xq13	X	A	
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2q21		A	
CXCR6	chemokine (C-X-C motif) receptor 6	3p21	X	A	
CYSLTR1	cysteinyl leukotriene receptor 1	Xq13.2-q21.1	X	A	
CYSLTR2	cysteinyl leukotriene receptor 2	13q14.2	X	A	
DRD1	dopamine receptor D1	5q35.1	X	A	
DRD2	dopamine receptor D2	11q23		A	
DRD3	dopamine receptor D3	3q13.3	X	A	
DRD4	dopamine receptor D4	11p15.5		A	
DRD5	dopamine receptor D5	4p16.1	X	A	
EBI2	Epstein-Barr virus induced gene 2	13q32.3		A	
EDG1	endothelial differentiation 1	1p21		A	
EDG2	endothelial differentiation 2	9q31.3		A	
EDG3	endothelial differentiation 3	9q22.1-q22.2		A	
EDG4	endothelial differentiation 4	19p12		A	
EDG5	endothelial differentiation 5	19p13.2		A	
EDG6	endothelial differentiation 6	19p13.3	X	A	
EDG7	endothelial differentiation 7	1p22.3	X	A	
EDG8	endothelial differentiation 8	19p13.2		A	
EDNRA	endothelin receptor type A	4q31.22		A	
EDNRB	endothelin receptor type B	13q22		A	
ELTD1	EGF, latrophilin and seven transmembrane domain containing 1	1p33-p32		B	
EMR1	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1	19p13.3	X	B	
EMR2	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 2	19p13.1	X	B	
EMR3	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 3	19p13.1	X	B	
GPR37L1	G-protein coupled receptor 37 like 1	1q32.1		A	
F2R	coagulation factor II (thrombin) receptor	5q13		A	
F2RL1	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	5q13		A	
F2RL2	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	5q13		A	
F2RL3	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 3	19p12	X	A	

Gène	Nom	Chromosome	Non Exprimé	Classe	Autres
GPR174	G protein-coupled receptor 174	Xq21.1	X	A	
FKSG83	vomeronasal 1 receptor 10 pseudogene	6p22.1	X		
OR7E5P	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 5 pseudogene	11q11-q12	X		
FPR1	formyl peptide receptor 1	19q13.4		A	
FPRL1	formyl peptide receptor-like 1	19q13.3-q13.4	X	A	
FPRL2	formyl peptide receptor-like 2	19q13.3-q13.4	X	A	
FSHR	follicle stimulating hormone receptor	2p21-p16	X	A	
FY	Duffy blood group	1q21-q22	X	A	
FZD1	frizzled homolog 1	7q21		F	
FZD10	frizzled homolog 10	12q24.33	X	F	
FZD2	frizzled homolog 2	17q21.1		F	
FZD3	frizzled homolog 3	8p21		F	
FZD4	frizzled homolog 4	11q14.2		F	
FZD5	frizzled homolog 5	2q33.3		F	
FZD6	frizzled homolog 6	8q22.3-q23.1		F	
FZD7	frizzled homolog 7	2q33		F	
FZD8	frizzled homolog 8	10p11.21		F	
FZD9	frizzled homolog 9	7q11.23		F	
GABBR1	gamma-aminobutyric acid B receptor, 1	6p21.31		C	
GALR1	galanin receptor 1	18q23	X	A	
GALR2	galanin receptor 2	17q25.3	X	A	
GALR3	galanin receptor 3	22q13.1	X	A	
GCGR	glucagon receptor	17q25		B	
GHRHR	growth hormone releasing hormone receptor	7p14	X	B	
GHSR	growth hormone secretagogue receptor	3q26.31	X	A	
GIPR	gastric inhibitory polypeptide receptor	19q13.3		B	
GLP1R	glucagon-like peptide 1 receptor	6p21	X	B	
GLP2R	glucagon-like peptide 2 receptor	17p13.3	X	B	
GNRHR	gonadotropin-releasing hormone receptor	4q21.2	X	A	
GNRHR2	gonadotropin-releasing hormone receptor 2	1q12	X	A	
GPBAR1	G protein-coupled bile acid receptor 1	2q35	X	A	
GPR	putative G protein coupled receptor (= GPR176)	15q14-q15.1		A	

Dans ces tableaux, la colonne « non exprimé » indique les gènes qui ne sont exprimés dans aucun des 5 types cellulaires testés (TG1, OB1, f-NSC, U87-MG et HA). La colonne « Autre » indique les gènes qui ne codent pas des RCPG. Il peut s'agit de gènes de ménages ou de gène codant d'autres protéines.

Gène	Nom	Chromosome	Non Exprimé	Classe	Autres
GPR1	G protein-coupled receptor 1	2q33.3		A	
GPR10	G protein-coupled receptor 10	10q26.13	X	A	
GPR101	G protein-coupled receptor 101	Xq26.3	X	A	
GPR103	G protein-coupled receptor 103	4q27		A	
P2RY14	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	3q24-q25.1	X	A	
GPR110	G protein-coupled receptor 110	6p12.3	X	B	
GPR111	G protein-coupled receptor 111	6p12.3	X	B	
GPR112	G protein-coupled receptor 112	Xq26.3	X	B	
GPR113	G protein-coupled receptor 113	2p23.3	X	B	
GPR114	G protein-coupled receptor 114	16q21	X	B	
GPR115	G protein-coupled receptor 115	6p12.3		B	
GPR116	G protein-coupled receptor 116	6p12.3	X	B	
GPR12	G protein-coupled receptor 12	13q12	X	A	
GPR120	G protein-coupled receptor 120	10q23.33	X	A	
GPR123	G protein-coupled receptor 123	10q26		B	
GPR124	G protein-coupled receptor 124	8p11.23		B	
GPR125	G protein-coupled receptor 125	4p15.2		B	
GPR126	G protein-coupled receptor 126	6q24.1	X	B	
GPR128	G protein-coupled receptor 128	3q12.2		B	
GPR133	G protein-coupled receptor 133	12q24.33	X	B	
GPR135	G protein-coupled receptor 135	14q23.1		A	
UTS2R	urotensin 2 receptor	17q25.3	X	A	
GPR141	G protein-coupled receptor 141	7p14.1		A	
GPR142	G protein-coupled receptor 142	17q25.1	X	A	
GPR143	G protein-coupled receptor 143	Xp22.3		B	
GPR145	G protein-coupled receptor 145	6q16	X	A	
GPR146	G protein-coupled receptor 146	7p22.3		A	
GPR148	G protein-coupled receptor 148	2q21.1	X	A	
GPR15	G protein-coupled receptor 15	3q11.2-q13.1	X	A	
GPR150	G protein-coupled receptor 150	5q15	X	A	
GPR152	G protein-coupled receptor 152	11q13.2	X	A	
GPR153	G protein-coupled receptor 153	1p36.31		A	

Gène	Nom	Chromosome	Non Exprimé	Classe	Autres
GPR160	G protein-coupled receptor 160	3q23.2-q27		A	
GPR161	G protein-coupled receptor 161	1q24.2		A	
GPR17	G protein-coupled receptor 17	2q21	X	A	
GPR18	G protein-coupled receptor 18	13q32	X	A	
GPR19	G protein-coupled receptor 19	12p12.3		A	
CCR10	chemokine (C-C motif) receptor 10	17q21.1-q21.3	X	A	
GPR20	G protein-coupled receptor 20	8q24.3		A	
GPR21	G protein-coupled receptor 21	9q33		A	
GPR22	G protein-coupled receptor 22	7q22-q31.1		A	
GPR23	G protein-coupled receptor 23	Xq21.1		A	
GPR24	G protein-coupled receptor 24	22q13.2		A	
GPR25	G protein-coupled receptor 25	1q32.1	X	A	
GPR26	G protein-coupled receptor 26	10q26.13	X	A	
GPR27	G protein-coupled receptor 27	3p21-p14	X	A	
GPR3	G protein-coupled receptor 3	1p36.1-p35		A	
GPR30	G protein-coupled receptor 30	7p22.3		A	
GPR31	G protein-coupled receptor 31	6q27	X	A	
GPR32	G protein-coupled receptor 32	19q13.33		A	
TRBV5	T cell receptor beta variable 5	7q34	X		X
GPR34	G protein-coupled receptor 34	Xp11.4		A	
GPR35	G protein-coupled receptor 35	2q37.3	X	A	
GPR37	G protein-coupled receptor 37	7q31		A	
MLNR	motilin receptor	13q14-q21	X	A	
GPR39	G protein-coupled receptor 39	2q21-q22	X	A	
GPR4	G protein-coupled receptor 4	19q13.3		A	
GPR40	G protein-coupled receptor 40	19q13.1	X	A	
GPR43	G protein-coupled receptor 43	19q13.1	X	A	
GPR44	G protein-coupled receptor 44	11q12-q13.3	X	A	
GPR45	G protein-coupled receptor 45	2q11.1-q12	X	A	
LGR4	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4	11p14-p13		A	
LGR5	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	12q22-q23		A	
GPR50	G protein-coupled receptor 50	Xq28	X	A	

Dans ces tableaux, la colonne « non exprimé » indique les gènes qui ne sont exprimés dans aucun des 5 types cellulaires testés (TG1, OB1, f-NSC, U87-MG et HA). La colonne « Autre » indique les gènes qui ne codent pas des RCPG. Il peut s'agit de gènes de ménages ou de gène codant d'autres protéines.

Gène	Nom	Chromosome	Non Exprimé	Classe	Autres
GPR51	G protein-coupled receptor 51	9q22.1-q22.3		C	
GPR52	G protein-coupled receptor 52	1q24		A	
GPR54	G protein-coupled receptor 54	19p13.3	X	A	
GPR55	G protein-coupled receptor 55	2q37	X	A	
GPR56	G protein-coupled receptor 56	16q13		B	
TAAR2	trace amine associated receptor 2	6q24	X	A	
GPR6	G protein-coupled receptor 6	6q21	X	A	
GPR61	G protein-coupled receptor 61	1p13.3		A	
GPR62	G protein-coupled receptor 62	3p21.1		A	
GPR63	G protein-coupled receptor 63	6q16.1-q16.3		A	
GPR64	G protein-coupled receptor 64	Xp22.13	X	B	
GPR65	G protein-coupled receptor 65	14q31-q31.1	X	A	
NMUR1	neuromedin U receptor 1	2q37.1	X	A	
GPR68	G protein-coupled receptor 68	14q31		A	
GPR7	G protein-coupled receptor 7	8p22-q21.13	X	A	
GPR73	G protein-coupled receptor 73	2p13.1		A	
GPR73L1	G protein-coupled receptor 73-like 1	20p12.3	X	A	
GPR74	G protein-coupled receptor 74	4q21	X	A	
GPR75	G protein-coupled receptor 75	2p16		A	
GPR77	G protein-coupled receptor 77	19q13.33	X	A	
GPR78	G protein-coupled receptor 78	4p16.1	X	A	
GPR8	G protein-coupled receptor 8	20q13.3	X	A	
OXGR1	oxoglutarate receptor 1	13q32.1	X	A	
GPR81	G protein-coupled receptor 81	12q24.31		A	
GPR82	G protein-coupled receptor 82	Xp11.4		A	
GPR83	G protein-coupled receptor 83	11q21	X	A	
GPR84	G protein-coupled receptor 84	12q13.31		A	
GPR85	G protein-coupled receptor 85	7q31		A	
P2RY13	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 13	3q24		A	
GPR87	G protein-coupled receptor 87	3q24		A	
GPR88	G-protein coupled receptor 88	1p21.3		A	
SUCNR1	succinate receptor 1	3q25.1	X	A	

Gène	Nom	Chromosome	Non Exprimé	Classe	Autres
GPR92	G protein-coupled receptor 92	12p13.31	X	A	
GPR97	G protein-coupled receptor 97	16q21	X	B	
GPRC5B	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	16p12		C	
GPRC5C	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member C	17q25	X	C	
GPRC5D	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member D	12p13.3	X	C	
GPRC6A	G protein-coupled receptor, family C, group 6, member A	6q22.1	X	C	
GRM1	glutamate receptor, metabotropic 1	6q24		C	
GRM2	glutamate receptor, metabotropic 2	3p21.2	X	C	
GRM3	glutamate receptor, metabotropic 3	7q21.1-q21.2	X	C	
GRM4	glutamate receptor, metabotropic 4	6p21.3	X	C	
GRM5	glutamate receptor, metabotropic 5	11q14.3	X	C	
GRM6	glutamate receptor, metabotropic 6	5q35	X	C	
GRM7	glutamate receptor, metabotropic 7	3p26.1-p25.1	X	C	
GRM8	glutamate receptor, metabotropic 8	7q31.3-q32.1		C	
GRPR	gastrin-releasing peptide receptor	Xp22.2		A	
GPR171	G protein-coupled receptor 171	3q25.1		A	
HCRTR1	hypocretin receptor 1	1p33	X	A	
HCRTR2	hypocretin receptor 2	6p12	X	A	
HDAC3	histone deacetylase 3	5q31			X
HRH1	histamine receptor H1	3p25	X	A	
HRH2	histamine receptor H2	5q35.2		A	
HRH3	histamine receptor H3	20q13.33	X	A	
HRH4	histamine receptor H4	18q11.2	X	A	
HTR1A	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A	5q11.2-q13	X	A	
HTR1B	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B	6q13	X	A	
HTR1D	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D	1p36.3-p34.3		A	
HTR1E	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1E	6q14-q15	X	A	
HTR1F	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1F	3p12	X	A	
HTR2A	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	13q14-q21	X	A	
HTR2B	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	2q36.3-q37.1	X	A	
HTR2C	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C	Xq24	X	A	
HTR4	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4	5q31-q33	X	A	

Dans ces tableaux, la colonne « non exprimé » indique les gènes qui ne sont exprimés dans aucun des 5 types cellulaires testés (TG1, OB1, f-NSC, U87-MG et HA). La colonne « Autre » indique les gènes qui ne codent pas des RCPG. Il peut s'agit de gènes de ménages ou de gène codant d'autres protéines.

Gène	Nom	Chromosome	Non Exprimé	Classe	Autres
HTR5A	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A	7q36.1	X	A	
HTR6	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6	1p36-p35	X	A	
HTR7	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7	10q21-q24	X	A	
IL8RA	interleukin 8 receptor, alpha	2q35	X	A	
IL8RB	interleukin 8 receptor, beta	2q35	X	A	
LANCL1	LanC lantibiotic synthetase component C-like 1	2q33-q35			X
LANCL2	LanC lantibiotic synthetase component C-like 2	7q31.1-q31.33			X
LGR6	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6	1q32.1		A	
LGR7	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 7	4q32.1	X	A	
LHCGR	luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor	2p21	X	A	
SLC26A7	solute carrier family 26, member 7	8q23			X
LPHN1	latrophilin 1	19p13.2		B	
LPHN2	latrophilin 2	1p31.1		B	
LPHN3	latrophilin 3	4q13.1		B	
LTB4R	leukotriene B4 receptor	14q11.2-q12		A	
LTB4R2	leukotriene B4 receptor 2	14q11.2-q12		A	
MAS1	MAS1 oncogene	6q25.3-q26	X	A	
MAS1L	MAS1 oncogene-like	6p21	X	A	
MASS1	monogenic, audiogenic seizure susceptibility 1 homolog	5q13		B	
MATK	megakaryocyte-associated tyrosine kinase	19p13.3	X		X
MC1R	melanocortin 1 receptor	16q24.3		A	
MC2R	melanocortin 2 receptor	18p11.2	X	A	
MC3R	melanocortin 3 receptor	20q13.2-q13.3	X	A	
MC4R	melanocortin 4 receptor	18q22	X	A	
MC5R	melanocortin 5 receptor	18p11.2	X	A	
MRGPRF	MAS-related GPR, member F	11q13.3		A	
MRGPRD	MAS-related GPR, member D	11q13.3	X	A	
MRGPRX1	MAS-related GPR, member X1	11p15.1	X	A	
MRGPRX2	MAS-related GPR, member X2	11p15.1	X	A	
MRGPRX3	MAS-related GPR, member X3	11p15.1	X	A	
MRGPRX4	MAS-related GPR, member X4	11p15.1	X	A	
MTNR1A	melatonin receptor 1A	4q35.1	X	A	

Gène	Nom	Chromosome	Non Exprimé	Classe	Autres
MTNR1B	melatonin receptor 1B	11q21-q22	X	A	
NMBR	neuromedin B receptor	6q21-qter	X	A	
NMUR2	neuromedin U receptor 2	5q33.1	X	A	
NPY1R	neuropeptide Y receptor Y1	4q31.3-q32	X	A	
NPY2R	neuropeptide Y receptor Y2	4q31	X	A	
NPY5R	neuropeptide Y receptor Y5	6q31-q32	X	A	
NPY6R	neuropeptide Y receptor Y6	5q31.2	X	A	
NTSR1	neurotensin receptor 1	20q13	X	A	
NTSR2	neurotensin receptor 2	2p25.1	X	A	
RARS	arginyl-tRNA synthetase	5q35.1			X
GCNT2	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme	6p24.2			X
OPN1SW	opsin 1 short-wave-sensitive	7q32.1	X	A	
OPN3	opsin 3	1q43		A	
OPN4	opsin 4	10q22	X		
OPRD1	opioid receptor, delta 1	1p36.1-p34.3		A	
OPRK1	opioid receptor, kappa 1	8q11.2	X	A	
OPRL1	opiate receptor-like 1	20q13.33		A	
OPRM1	opioid receptor, mu 1	6q24-q25	X	A	
SENP3	SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 3	17p13			X
OR2A4	olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 4	6q23	X		
OR2C3	olfactory receptor, family 2, subfamily C, member 3	1q44	X		
PTPN22	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22	1p13.2	X		X
MELL1	mel transforming oncogene-like 1	1p36			X
PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase	1p12			X
OR7C2	olfactory receptor, family 7, subfamily C, member 2	19p13.1	X		
GPR147	G protein-coupled receptor 147	10q21-q22	X	A	
OXTR	oxytocin receptor	3p25		A	
P2RY1	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 1	3q25.2		A	
P2RY10	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 10	Xq21.1	X	A	
P2RY11	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 11	19p13.2		A	
P2RY12	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12	3q24-q25	X	A	
P2RY2	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2	11q13.5-q14.1		A	

Dans ces tableaux, la colonne « non exprimé » indique les gènes qui ne sont exprimés dans aucun des 5 types cellulaires testés (TG1, OB1, f-NSC, U87-MG et HA). La colonne « Autre » indique les gènes qui ne codent pas des RCPG. Il peut s'agit de gènes de ménages ou de gène codant d'autres protéines.

Gène	Nom	Chromosome	Non Exprimé	Classe	Autres
P2RY4	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 4	Xq13	X	A	
P2RY5	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 5	13q14		A	
P2RY6	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	11q13.5	X	A	
P2RY8	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8	Xp22.33 ; Yp11.3	X	A	
PCDH15	protocadherin 15	10q21.1			X
TAAR5	trace amine associated receptor 5	6q23	X	A	
PPYR1	pancreatic polypeptide receptor 1	10q11.2		A	
PTAFR	platelet-activating factor receptor	1p35-p34.3	X	A	
PTGDR	prostaglandin D2 receptor	14q22.1	X	A	
PTGER1	prostaglandin E receptor 1	19p13.1		A	
PTGER2	prostaglandin E receptor 2	14q22.1		A	
PTGER3	prostaglandin E receptor 3	1p31.2	X	A	
PTGER4	prostaglandin E receptor 4	5p13.1	X	A	
PTGFR	prostaglandin F receptor	1p31.1	X	A	
PTGIR	prostaglandin I2 receptor	19q13.3	X	A	
PTHR1	parathyroid hormone receptor 1	3p22-p21.1		B	
PTHR2	parathyroid hormone receptor 2	2q33	X	B	
GPRC5A	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	12p13-p12.3		C	
RGR	retinal G protein coupled receptor	10q23		A	
RHO	rhodopsin	3q23-q24	X	A	
RRH	retinal pigment epithelium-derived rhodopsin homolog	4q25	X	A	
RLN3R1	relaxin 3 receptor 1	5p15.1-p14	X	A	
SCTR	secretin receptor	2q14.1	X	B	
SMO	smoothened homolog	7q32.3		F	
GPR173	G-protein coupled receptor 173	Xp11		A	
SSTR1	somatostatin receptor 1	14q13	X	A	
SSTR2	somatostatin receptor 2	17q24	X	A	
SSTR3	somatostatin receptor 3	22q13.1	X	A	
SSTR4	somatostatin receptor 4	20p11.2	X	A	
SSTR5	somatostatin receptor 5	16p13.3	X	A	
TAAR6	trace amine associated receptor 6	6q23.2	X	A	
TACR1	tachykinin receptor 1	2p12	X	A	

Gène	Nom	Chromosome	Non Exprimé	Classe	Autres
TACR2	tachykinin receptor 2	10q11-q21	X	A	
TACR3	tachykinin receptor 3	4q25	X	A	
TAAR1	trace amine associated receptor 1	6q23.2	X	A	
TAAR9	trace amine associated receptor 9	6q23.2	X	A	
TAS1R1	taste receptor, type 1, member 1	1p36.23	X	C	
LONPL	peroxisomal LON protease like	16q12.1			X
TBXA2R	thromboxane A2 receptor	19p13.3		A	
OXER1	oxoeicosanoid receptor 1	2p21		A	
TM7SF1	transmembrane 7 superfamily member 1	1q42-q43		A	
TAAR8	trace amine associated receptor 8	6q23.2	X	A	
TRHR	thyrotropin-releasing hormone receptor	8q23	X	A	
TSHR	thyroid stimulating hormone receptor	14q31		A	
VIPR1	vasoactive intestinal peptide receptor 1	3p22	X	B	
VIPR2	vasoactive intestinal peptide receptor 2	7q36.3	X	B	
VN1R1	vomeronasal 1 receptor 1	19q13.4	X		
VN1R2	vomeronasal 1 receptor 2	19q13.42			
VN1R5	vomeronasal 1 receptor 5	1q44	X		
XCR1	chemokine (C motif) receptor 1	3p21.3	X	A	
MRGPRE	MAS-related GPR, member E	11p15.4	X	A	
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	12p13			X
RPLP0	ribosomal protein, large, P0	12q24.2			X
ACTB	actin, beta	7p22			X
PPIA	peptidylprolyl isomerase A	7p13			X
PGK1	phosphoglycerate kinase 1	Xq13.3			X
B2M	beta-2-microglobulin	15q21-q22.2			X
GUSB	glucuronidase, beta	7q21.11			X
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Xq26.1			X
TBP	TATA box binding protein	6q27			X
TFRC	transferrin receptor	3q29			X
HMBS	hydroxymethylbilane synthase	11q23.3			X
IPO8	importin 8	12p11.21			X
POLR2A	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A	17p13.1			X

Dans ces tableaux, la colonne « non exprimé » indique les gènes qui ne sont exprimés dans aucun des 5 types cellulaires testés (TG1, OB1, f-NSC, U87-MG et HA). La colonne « Autre » indique les gènes qui ne codent pas des RCPG. Il peut s'agit de gènes de ménages ou de gène codant d'autres protéines.

ANNEXE III : Expression des gènes des cartesTaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array Card d'Applied Biosystems

Détecteur	TG1	OB1	f-NSC	U-87 MG	HA
18S	8,12±0,08	9,86±0,1	8,41±0,03	9,41±0,12	9,84±0,05
ACTB	18,34±0,09	20,8±0,14	19,18±0,15	19,69±0,15	19,21±0,14
CTNNB1	22,45±0,08	24,76±0,16	22,65±0,11	24,57±0,17	24,41±0,14
EEF1A1	26,02±0,15	29,77±0,15	27,31±0,13	29,55±0,28	28,97±0,2
GAPD	18,26±0,11	19,93±0,02	21,12±0,12	19,68±0,12	21,21±0,06
RAF1	26,23±0,23	28,63±0,24	26,5±0,91	27,67±0,19	27,64±0,24
ACTC				34,32±0,9	26,85±0,38
AFP					
BRIX	26,59±0,1	25,97±0,09	26,8±0,1	26,01±0,12	27,09±0,13
CD34					32,67±0,69
CD9	22,29±0,08	21,84±0,23	23,99±0,15	24,03±0,15	24,99±0,2
CDH5	32,43±0,36	32,53±0,49			33,43±0,75
CDX2					
CGB	34,48±0,49			29,55±0,15	29,06±0,33
COL1A1	33,58±0,22	33,9±0,17		24,03±0,1	16,81±0,25
COL2A1			28,76±0,18		
COMMD3	27,85±0,14	28±0,09	27,3±0,09	26,33±0,17	26,74±0,14
CRABP2	28,86±0,1	30,41±0,23	30,96±0,31	27,51±0,2	25,82±0,16
DDX4					
DES	35,39±0,74		31,88±0,17	33,87±1,22	26,69±0,1
DNMT3B	29,37±0,21	29,81±0,19	28,53±0,13	29,28±0,18	29,96±0,19
EBAF					
EOMES				33,03±0,44	
FGF4					
FGF5	32,11±0,3	30,53±0,37		29,93±0,28	27,84±0,18
FLT1					30,89±0,56
FN1	24,81±0,08	25,88±0,14	24,05±0,18	18,64±0,09	17,24±0,09
FOXA2					
FOXD3	33,89±0,18	31±0,17		34,37±1,42	
GABRB3	35,75±1,09		26,19±0,23		31,62±0,69
GAL					32,77±0,36
GATA4					
GATA6		33,54±0,61		28,23±0,14	28,13±0,14
GBX2	31,22±0,21	30,86±0,28	32,02±0,11		
GCG					
GCM1		33,64±0,62			
GDF3					
GFAP	26,38±0,03	31,8±0,33	32,89±0,31	34,42±0,34	26,34±0,18
GRB7				30,54±0,26	31,53±0,28
HBB					
HBZ					
HLXB9			33,76±0,19		
IAPP	31,01±0,06	28,96±0,09			
IFITM1	28,34±0,2	27,06±0,04	32,09±0,15	29,61±0,15	26,44±0,1
IFITM2	22,69±0,13	20,94±0,15	31,86±0,38	25,49±0,06	23,47±0,16
IL6ST	26,07±0,08	25,49±0,12	26,73±0,17	24,87±0,2	24,99±0,13
IMP2	25,56±0,14	29,25±6,59	25,88±0,22	27,52±0,02	27,98±0,17
INS					
IPF1					

Détecteur	TG1	OB1	f-NSC	U-87 MG	HA
ISL1			34,04±0,56	33,91±0,64	
KIT					29,51±0,4
KRT1					
LAMA1			27,18±0,08	30,42±0,24	27,95±0,21
LAMB1	25,36±0,06	23,68±0,38	26,14±0,12	24,66±0,1	22,8±0,15
LAMC1	21,48±0,12	21,82±0,27	24,95±0,16	24,2±0,15	22,93±0,17
LEFTB	32,74±0,25	32,77±0,27	32,59±0,34	33,24±1	
LIFR				34,06±0,51	
LIN28	35,37±0,51		32,76±0,42		
MYF5					
MYOD1					
Nanog*	33,94±0,14	33,51±1,4	33,29±0,35		32,35±0,61
NES	22,89±0,1	22,04±0,06	22,22±0,15	28,23±0,11	28,13±0,02
NEUROD1	35,53±0,42	29,89±0,38			
NODAL					
NOG			29,33±0,04		30,58±0,14
NPPA		32,18±0,35			
NR5A2		33,66±1,74			
NR6A1	31,73±0,26	30,16±0,05	29,41±0,09	30,54±0,27	33,05±0,55
OLIG2	24,18±0,05	24,65±0,07	25,3±0,08	29,28±0,23	
PAX4					
PAX6	29,53±0,18		25,03±0,05	28,16±0,07	26,08±0,07
PECAM1	33,78±0,4	32,3±0,67		31,87±0,15	
PODXL	21,57±0,11	20,82±0,04	29,2±0,13	28,34±0,12	29,09±0,05
POU5F1	30,83±0,2	30,47±0,44	31,51±0,48	31,2±0,59	33,32±2,03
PTEN	27,26±0,31	25,83±0,16	27,64±0,12	25,12±0,12	25,39±0,11
PTF1A					
REST	33,05±0,36		33,47±0,4	31,3±0,31	31,08±0,36
RUNX2	28,73±0,16	29,43±0,19	31,43±0,42	27,56±0,2	27,58±0,28
SEMA3A	24,22±0,1	22,95±0,06	26,72±0,13	28,67±0,15	29,71±0,37
SERPINA1	35±0,17	33,75±0,6		29,37±0,15	30,67±0,46
SFRP2				28,42±0,11	21,68±0,25
SOX17				34,04±1,03	
SOX2	27,72±0,53	21,96±0,14	26,91±0,61		29,03±0,19
SST					
SYCP3			35,18±0,81		
SYP	32,31±0,5	29,7±0,27	28,18±0,06	30,04±0,27	33,1±0,23
TAT			33,25±0,4		
TDGF1			32,71±0,48	33,55±1	
TERT	33,78±0,23	32,22±0,49		33,37±1,01	
TFCP2L1					32,07±0,41
TH			31,88±0,19		
T					
UTF1				33,81±0,99	
WT1					
Xist			22,76±0,15		24,27±0,21
ZFP42					32,58±0,6

Les expressions des gènes de la carte TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array Card d'Applied Biosystems sont données en cycle seuil, normalisés par rapport au 18s et moyennés. Chaque type cellulaire a été testé 4 fois, sauf les f-NSC qui ont été testées 8 fois. Seuls les gènes exprimés (Ct<35) sont inscrits.

ANNEXE IV : Expression des gènes des RCPG TaqMan® Array Card d'Applied Biosystem pour tous les types cellulaires

Détecteur	TG1	OB1	f-NSC	U-87 MG	HA
ADCYAP1R1	29,32±1,53	38,12±2,15	29,09±1,74	32,24±0,42	35,65±1
ADORA1	26,48±1,18	30,4±0,05	29,87±1,72	31,99±0,11	29,61±0,23
ADORA2A	31,84±1,43	30,93±0,04	31,79±0,36	26,92±0,14	34,09±0,05
ADORA2B	28,18±1,33	28,21±0,13	27,85±0,68	28,81±0,13	31,2±0
ADRA1B	40±0	35,61±0	40±0	31,25±0,01	29,98±0,15
ADRA2A	37,81±0,11	38,67±0,1	37,86±0,16	36,46±0,63	30,16±0,06
ADRB1	31,07±0,53	32,4±0,26	34,03±1,2	40±0	32,64±0,21
ADRB2	33,43±0,09	28,73±0,23	34,81±0,84	35,13±0,13	31,52±0,11
BAI1	40±0	31,22±0,45	26,44±0,7	37,47±0,83	31,61±0,27
BAI2	25,97±0,61	25,59±0	25,03±0,15	27,44±0	27,56±0,03
BAI3	29,64±0,57	30,06±0,26	28,23±0,11	36,53±1,53	33,87±0,23
BDKRB1	40±0	38,12±2,16	37,48±2,27	25,1±0,03	33,94±0,71
BDKRB2	40±0	36,11±4,99	40±0	24,51±0,4	29,17±0,03
C11ORF4	25,51±0,27	26,45±0,11	26,42±0,47	27,1±0,15	27,53±0,08
C3AR1	26,98±0,89	32,35±0,41	34,9±0,2	28,89±0,02	36,49±0,62
C5R1	30,02±1,64	28,56±0,29	36,87±0,87	29,39±0,19	32,33±0,08
CALCRL	26,65±0,81	26,48±0,07	30,02±1,02	35,13±0,44	31,2±0
CCKBR	32,21±0,54	30,98±0,01	36,05±1,69	40±0	38,53±2,07
CCR1	31,74±0,9	35,03±0,71	32,17±0,73	29,01±0,05	40±0
CCRL1	32,88±1,14	29,46±0,17	30,69±2,58	30,92±0,31	33,27±1,59
CCRL2	40±0	39,65±0	40±0	30,96±0,14	36,84±0,24
CD97	25,26±0,22	26,03±0,06	31,22±0,26	27,51±0,03	29,79±0,14
CELSR1	27,44±0,65	28,98±0,17	27,91±0,5	29,87±0,37	30,09±0,03
CELSR2	29,08±0,19	26,98±0,12	28,3±1,05	32,99±0,13	30,64±0,26
CELSR3	28,93±0,7	29,54±0,07	28,49±0,29	29,5±0,33	32,69±0,55
CHRM3	28,53±0,61	28,8±0,14	30,74±0,24	34,78±0,11	38,56±2,04
CHRM4	30,77±0,49	30,74±0,38	29,12±0,73	35,6±0,27	35,38±0,91
CMKLR1	40±0	38,12±2,17	40±0	34,61±0,83	30,4±0
CNR1	28,24±0,15	25,55±0	26,15±0,62	40±0	32,33±0,45
CXCR4	26,07±0	25,01±0,01	26,41±0,24	35,65±0,46	32,99±0,45
DRD2	31,24±0,29	31,45±0,21	34,03±0,1	40±0	31,91±0,11
DRD4	40±0	39,65±0	35,08±0,08	40±0	27,66±0,01
EBI2	30,59±0,67	31,65±0,35	31,14±0,28	32,24±0,04	34,39±0,85
EDG1	33,23±0,36	29,36±0,32	26,41±1,55	34,99±0,04	32,55±0,2
EDG2	37,14±1,63	29,72±0,19	29,01±0,66	27,88±0,16	28,14±0,06
EDG3	29,19±0,34	29,56±0,09	29,82±0,21	28,29±0,06	30,52±0,02
EDG4	29,79±0,57	29,06±0,17	29,94±1,31	31,75±0,11	30,38±0,02
EDG5	27,12±0,11	27,64±0,07	28,2±0,66	29,45±0,54	27,08±0,01
EDG8	29,88±1,22	31,09±0,01	34,36±1,29	35,82±0,87	34,88±0,38
EDNRA	32,26±0,16	39,65±0	40±0	31,59±0,03	29,97±0,15
EDNRB	29,68±0,23	27,47±0,13	25,52±0,12	32,61±0,1	34,07±0,01
ELTD1	35,02±0,05	39,65±0	28,74±0,6	37,74±0,15	29,31±0,16
F2R	25,16±0,05	24,31±0,01	25,67±0,2	29,58±0,29	26,97±0,29
F2RL1	25,81±0,39	25,53±0,12	29,81±0,38	31,53±0,13	27,72±0,05
F2RL2	30,65±0,08	30,48±0,16	34,66±0,09	33,93±0,58	32,46±0,04
FPR1	40±0	39,65±0	40±0	29,27±0,29	36,21±1,14
FZD1	26,5±0,02	27,46±0,05	28,71±0,34	28,71±0	24,97±0,14
FZD2	28,37±0,29	29,4±0,28	27,32±0,48	29,76±0,13	27,39±0,12
FZD3	27,99±0,01	27,47±0,17	24,76±0,22	32,29±0,33	30,38±0,07

Détecteur	TG1	OB1	f-NSC	U-87 MG	HA
FZD4	28,48±0,01	28,27±0,14	30,98±0,13	32,68±0,22	29,47±0,11
FZD5	26,9±0,16	28,41±0,07	29,05±0,18	31,15±0,08	27,97±0,1
FZD6	36,06±0,74	39,65±0	26,54±0,58	28,02±0,24	26,74±0,06
FZD7	26,56±0,24	24,59±0	26,17±0,9	27,89±0,02	24,95±0,12
FZD8	29,2±0,27	29,6±0,01	28,03±0,24	29,9±0,07	29,18±0,07
FZD9	33,63±0,21	30,55±0	30,5±1,02	40±0	32,94±0,03
GABBR1	27,35±0,56	27,08±0,13	25,35±0,34	29,68±0,08	30,01±0,13
GCGR	40±0	35,64±1,37	40±0	28,91±0,54	37,42±3,65
GIPR	32,25±0,28	30±0,25	32,22±0,55	35,58±0,15	37,54±0,7
GPR	28,6±0,35	29,47±0,05	30,51±1,28	27,98±0,23	28,24±0,01
GPR1	33,15±0,27	37,47±0,93	35,26±0,71	33,59±0,45	29,1±0,12
GPR103	31,58±0,37	31,3±0,14	40±0	39,01±1,41	38,54±2,06
GPR115	36,96±4,3	36,56±0,1	40±0	28,47±0,42	38,34±2,35
GPR123	40±0	39,65±0	30,01±0,29	40±0	40±0
GPR124	32,47±0,78	28,59±0,11	35,51±1	32,88±0,68	25,85±0
GPR125	27,45±0,22	29,21±0,14	26,61±0,45	28,9±0,13	29,04±0
GPR128	31,26±1,04	31,18±0,98	37,77±2	40±0	40±0
GPR135	29,87±0,11	29,51±0,14	30,24±0,59	31,5±0,01	31,9±0,09
GPR141	39,37±0,89	31,09±0,1	36,72±0,56	39,12±1,24	36,45±0,6
GPR143	40±0	39,65±0	31,47±1,66	36,59±1,38	36,09±0,1
GPR146	30,18±0,71	30,22±0,01	31,7±0,56	32,46±0,34	33,88±0,24
GPR153	25,19±0,02	26,88±0,05	26,97±0,32	31,45±0,12	28,61±0,11
GPR160	31,65±0,15	33,51±0,31	35,91±0,16	34,98±0,14	37,97±0,21
GPR161	28,26±0,07	29,45±0	27,6±0,24	29,86±0,05	28,13±0,03
GPR171	28,36±0,05	28,95±0,1	30,95±0,67	37,68±0,2	35,05±1,94
GPR173	28,52±0,15	28,52±0,12	27,16±0,27	30,25±0,03	30,6±0,1
GPR19	30,16±0,39	30,47±0,1	29,19±0,18	33,57±0,1	34,62±0,14
GPR20	35,44±0,74	31,01±0,06	35,28±1,78	38,69±1,85	35,84±1,03
GPR21	30,76±0,46	30,49±0,09	30,23±0,2	32,82±0,19	32,6±0,53
GPR22	31,34±0,92	29,41±0,25	30,47±1	31,74±0,2	34,82±2,31
GPR23	37,77±1,48	39,65±0	26,06±1,35	31,29±1,32	33,9±3,61
GPR24	30,23±0,69	32,35±0,65	33,29±0,57	30,14±0,16	35,36±0,33
GPR3	28,81±0,03	27,25±0,22	29,72±0,23	30,58±5,18	35,08±6,95
GPR30	30,6±0,4	31,42±0,26	30,66±0,04	31,27±0,3	33,63±0,69
GPR32	30,35±0,73	37,37±2,27	34,97±0,1	33,58±0,88	33,21±0,18
GPR34	31,2±0,65	31,77±0,02	33,65±0,62	34,97±2,96	36,83±0,05
GPR37	26,37±0,21	26,69±0,07	34,01±0,28	34,86±1,37	33,86±0,55
GPR37L1	37,38±0,01	39,64±0,01	26,65±0,15	36,49±0,42	40,04±0,2
GPR4	37,41±3,67	29,29±0,31	37,67±2,03	40±0	40±0
GPR51	30,27±0,53	27,81±0,26	27,77±0,02	34,84±1,41	38,03±2,79
GPR52	32,34±0,12	31,4±0,08	32,12±0,18	34,12±0,06	34,18±0,1
GPR56	24,19±0,07	24,48±0,02	22,62±0,1	24,89±0,19	30,58±0,23
GPR61	29,32±0,18	31,3±0,14	28,36±0,26	33,8±0,1	35,87±0,39
GPR62	32,6±0,86	30,15±0,02	32,02±1,26	33,73±0,72	34,49±0,61
GPR63	31,14±0,25	33,54±0,41	30,87±0,36	31,76±0,21	30,83±0,07
GPR68	33,46±0,46	31,72±0,15	33,09±0,24	27,1±0,08	34,21±0,73
GPR73	29,61±0,01	31,12±0,01	40±0	39,1±1,28	40±0
GPR75	32,76±0,5	35,71±1,23	30,34±0,3	31,48±0,06	32,02±0,21
GPR81	40±0	39,65±0	37,2±2,43	38,08±0,11	31,24±0,06

Détecteur	TG1	OB1	f-NSC	U-87 MG	HA
GPR82	30,65±0,94	31,51±0,08	29,4±0,6	33,29±0,14	37,34±3,76
GPR84	39,1±1,27	39,65±0	40±0	31,06±0,16	40±0
GPR85	31±0,16	31,82±0,37	35,36±0,48	29,33±0,13	31,63±0,4
GPR88	38,31±2,39	39,65±0	29,15±1,4	34,14±2,34	40±0
GPRC5A	29,81±0,02	39,65±0	37,53±2,3	28,48±0,26	31,04±0
GPRC5B	25,3±0,25	25,26±0,09	24,83±0,19	31,93±0,34	28,41±0,49
GRM1	35,54±0,36	31,46±0,55	40±0	37,39±3,69	40±0
GRM8	29,21±0,04	33,53±0,41	33,7±0,66	38,43±0,16	39,92±0,27
GRPR	33,82±0,06	30,82±0,13	34,44±2,1	36,61±0,19	35,66±0
HRH2	27,38±0,03	28,9±0,02	33,57±0,9	35,44±0,15	32,6±0,09
HTR1D	30,68±0,12	34,96±0,16	34,79±1,46	36,34±0,16	35,14±0,26
LGR4	27,86±0,2	25,4±0,18	25,61±0,08	34,2±0,04	29,38±1,43
LGR5	36,05±0,71	32,02±0,12	37,1±1,27	40,49±0,56	28,78±0,27
LGR6	34,44±1,62	35,12±0,72	33,31±1,71	38,52±2,09	30,79±0,17
LPHN1	27,98±0,36	27,19±0,27	27,92±0,17	30,48±0,14	29,53±0,13
LPHN2	23,97±0,49	24,65±0,06	28,67±0,03	28,09±0,02	27,33±0,02
LPHN3	29,18±0,41	28,32±0,16	32,6±2,56	36,88±1,18	29,94±0,15
LTB4R	30,8±0,36	28,43±0	33,48±1,3	32,01±0,02	35,72±0,58
LTB4R2	30,02±0,35	29,51±0,1	31,15±1,13	32,02±0,16	32,86±0,12
MASS1	32,67±0,46	30,64±0,26	31,28±0,35	34,3±0,37	36,2±0,16
MC1R	29,33±0,18	29,1±0	29,86±0,56	30,73±0,17	30,26±0,28
MRGPRF	39,88±0,24	39,65±0	37,53±0,13	30,86±0,06	29,21±0,07
OPN3	30,08±0,73	31,69±0,13	30,4±0,85	31,12±0,37	30,31±0,1
OPRD1	40±0	30,52±0,6	31,77±1,78	38,07±2,73	40±0
OPRL1	32,46±0,18	30,28±0,09	30,35±0,38	31,46±0,06	31,71±0,51
OXER1	31,59±0,3	31,35±0,37	30,75±0,38	34,61±0,56	31,85±0,01
OXTR	31,04±0,17	31,96±0,23	32,67±0,19	32,14±0,37	25,43±0,05
P2RY1	27,68±0,36	27,07±0,31	29,17±0,13	29,57±0,13	37,01±1,33
P2RY11	27,79±0,12	27,82±0,24	28,82±0,08	29,76±0,02	30,68±0,21
P2RY13	30,49±0,22	31,64±0,23	32,89±0,04	38,5±0,39	35,27±1,04
P2RY5	28,91±0,43	27,65±0,12	30,74±0,53	33,75±0,6	31,94±0,29
PPYR1	38,49±2,14	39,65±0	37,68±2,11	33,8±0,42	31,31±0,32
PTGER1	39,8±0,29	39,65±0	34,05±0,18	34,05±0,44	29,71±0,07
PTGER2	38,27±2,44	32,97±0,17	40,1±0,1	29,8±0,39	27,4±0,01
PTHR1	38,24±1,87	36,53±0,43	33,85±0,25	34,84±0,29	31,63±0,3
RGR	38,03±1,92	20,82±0,21	29,32±0,16	40,13±0	34,83±0,33
SMO	26,53±0,4	26,87±0,06	25,98±0,19	36,13±0,79	25,92±0,06
TBXA2R	30,81±0,01	30,5±0,03	35,5±1,42	30,6±0,01	30,08±0,03
TM7SF1	28,26±0,74	25,96±0,03	25,27±1,21	29,1±0,11	28,39±0,08
VN1R1	28,84±0,22	28,1±0,02	27,2±0,05	31,25±0,18	29,66±0,17
HDAC3	25,46±0,21	26,3±0,12	26,78±0,43	28,01±0,01	28±0,03
GAPDH	19,55±0,16	19,49±0,14	21,72±1,16	20,93±0,37	21,43±0,16
RPLP0	21,12±0	21,12±0	21,12±0	21,12±0	21,12±0
ACTB	19,71±0,08	20,67±0,03	20,06±0,05	21±0,08	19,36±0,02
PPIA	19,92±0,17	21,48±0,03	21,89±0,31	22,05±0,14	22,1±0,05
PGK1	22,16±0,21	22,49±0,13	24,21±1,01	23,03±0,03	24,28±0,07
B2M	21,59±0,03	21,43±0,11	23,05±0,2	21,14±0,1	22,49±0,1
GUSB	23,58±0,09	24,04±0,13	27,13±0,09	27,28±0,08	26,79±0,13
HPRT1	24,94±0,05	25,94±0,17	28,84±0,4	26,31±0,12	27,69±0,07

Détecteur	TG1	OB1	f-NSC	U-87 MG	HA
TBP	27,73±0,48	28,42±0,19	27,76±0,1	28,82±0,12	28,41±0,08
TFRC	24,43±0,01	25,56±0,09	25,81±0,02	25,06±0,17	27,42±0,13
HMBS	26,15±0,25	29,07±0,1	27,3±0,57	28,1±0,11	28,33±0,16
IPO8	26±0,16	26,52±0,05	26,49±0,38	27,1±0,15	28,07±0,1
POLR2A	23,71±0,08	26,12±0,19	25,78±0,3	27,99±0,37	26,77±0,02
18S	6,6±4,56	8,06±0,6	9,09±0,62	9,42±0,51	8,58±0,24
18S	6,67±4,66	8,09±0,23	9,05±0,68	9,25±0,39	8,38±0,04
18S	6,97±5,08	7,96±0,29	8,92±0,77	9,17±0,3	8,18±0,31
18S	6,6±4,56	7,92±0,37	8,93±0,75	9,32±0,37	8,19±0,2
PHGDH	25,33±0,79	27,63±0,02	27,51±0,94	26,66±0,21	26,18±0,06
PCDH15	40±0	39,65±0	31,73±1,21	33,73±0,11	38,56±2,03
RARS	25,56±0,18	25,35±0,04	26,3±0,32	25,42±0,3	26,03±0,02
SENP3	25,94±0,04	27,58±0,02	26,77±0,42	27,48±0,05	27,83±0,1
LONPL	26,52±0,18	25,54±0,1	26,32±0,29	26,42±0,13	27,03±0,1
LANCL2	28,42±0,61	29,42±0,01	28,35±0,34	29,59±0,27	29,4±0,06
GCNT2	30,25±0,62	26,59±0,23	30,42±1,12	38,32±2,37	38,04±2,77
MELL1	38,4±2,26	33,98±1,1	31,27±0,96	37,45±0,64	35,57±0,63
SLC26A7	34,66±0,07	34,15±0,33	31,51±0,52	37,69±0,5	33,7±0,26
LANCL1	26,29±0,01	26,65±0,13	26,54±0,19	26,67±0,08	27,54±0,09

Les expressions des gènes de la carte RCPG TaqMan® Array Card d'Applied Biosystems sont données en cycle seuil, normalisés par rapport au RPLP0 et moyennés. Chaque type cellulaire a été testé 2 fois, sauf les f-NSC qui ont été testées 3 fois.
Les gènes sont considérés comme exprimés si leur Ct est inférieur à 31,5.

ANNEXE V : Variation de l'expression des gènes des RCPG TaqMan® Array Card d'Applied Biosystem pour les cellules souches cancéreuses de glioblastome TG1 lors de leur mise en quiescence

Détecteur	J2	J6	J7	J10	J11	J14	J15	J18	J19	J21
18S	4,95±4,28	6,6±2,49	11,26±3,57	5,22±4,46	8,4±0,67	5,3±4,6	5,7±5,11	6,73±2,51	7,07±2,87	5,8±5,29
18S	4,95±4,28	6,56±2,44	11,58±3,11	5,2±4,44	8,45±0,74	5,33±4,64	5,74±5,18	6,69±2,46	6,91±2,64	5,97±5,52
18S	5,02±4,38	6,51±2,35	11,42±3,34	5,2±4,43	8,49±0,8	5,29±4,59	5,66±5,05	6,67±2,43	7,27±3,14	5,69±5,13
18S	5,32±4,8	6,53±2,39	11,32±3,47	5,16±4,39	8,41±0,69	5,2±4,46	5,64±5,02	6,73±2,51	6,99±2,75	5,77±5,24
ACTB	18,06±0,36	19,54±0,55	19,4±0,39	19,83±0,1	19,7±0,33	20,49±0,62	20,35±0,05	20,38±0,4	21,19±1,03	21,12±0,95
ADCYAP1R1	27,66±1,81	28,1±2,45	27,82±2,26	28,32±1,38	27,81±1,79	28,24±1,18	28,22±1,29	28±1,38	30,27±3,79	29,11±1,94
ADORA1	24,82±0,9	25,43±0,1	25,37±0,13	25,56±0,18	25,62±0,11	25,87±0,23	26,18±0,24	25,48±0,25	26,35±0,54	25,2±0,94
ADORA2A	30,19±1,15	29,17±0,69	29,31±0,26	29,64±0,27	29,5±0,44	29,39±0,02	29,59±0,03	29,55±0,09	29,34±0,18	28,76±0,67
ADORA2B	26,52±1,05	26,75±0,31	26,91±0,26	26,71±0,16	26,73±0,09	26,84±0,4	26,88±0,15	26,82±0,1	27,55±0,79	26,16±0,99
ADRB1	29,41±0,25	29,23±0,67	29,09±0,31	29,07±0,08	28,79±0,12	29,5±0,42	29,15±0,38	29,19±0,33	29,4±0,07	29,27±0,03
ADRB2	31,78±0,19	30,15±0,35	30,63±0,02	29,94±0,07	29,76±0,32	29,67±0,74	28,92±1,11	28,97±1,04	28,54±0,69	28,61±0,37
B2M	19,94±0,25	19,37±0,12	19,41±0,31	19,75±0,52	19,82±0,77	20,33±0,77	20,21±0,36	20,38±0,59	21,11±1,58	20,67±1
BAI2	24,32±0,33	24,4±0,13	24,18±0,14	24,53±0,01	24,37±0,4	24,59±0,27	24,58±0,25	24,7±0,27	25,34±0,9	24,59±0,29
BAI3	27,98±0,29	28,32±0,03	28,34±0,59	28,56±0,21	28,48±0,68	29,06±0,8	28,91±0,7	29,32±1,09	30,64±3,25	29,76±1,83
C11ORF4	23,86±0,55	24,2±0,29	24,26±0,42	24,2±0,42	23,98±0,42	24,36±0,68	24,25±0,3	24,07±0,44	24,63±0,8	23,75±0,2
C3AR1	25,32±0,61	26,97±0,65	26,49±1,31	26,31±0,23	25,86±0,91	26,92±0,84	26,94±0,54	27,35±1,28	28,72±1,97	28,51±0,92
C5R1	28,36±1,36	27,91±0,29	27,34±0,65	28,05±0,25	28,14±0,37	28,05±0,26	28,46±0,32	28,55±0,23	29,59±2,31	27,93±0,27
CALCRL	25±0,53	25,17±0,02	25,16±0,39	25,05±0,19	24,75±0,07	24,75±0,18	25,08±0,19	24,71±0,47	25,63±0,51	24,56±0,6
CCKBR	30,56±0,26	29,55±0,73	29±0,04	29,09±0,43	28,71±1,3	28,91±1,05	28,67±0,62	28,56±0,7	29,56±2,34	29,93±1,77
CCR1	30,09±1,18	31,33±1,19	31,02±1,92	31,27±1,04	30,65±2,1	31,58±2,02	30,93±1,46	31,55±2,59	32,95±2,69	32,68±4,08
CCR10	31,38±0,31	30,77±0,11	30,66±0,11	30,67±0,52	30,6±0,32	30,79±0,09	30,9±0,2	30,75±0,51	31,73±1,17	30,64±0,3
CCRL1	31,23±1,42	30,93±0,2	30,61±0,29	30,49±0,22	30,63±0,75	30,8±1,35	31,65±1,02	30,93±1,38	31,25±2,56	30,76±2,46
CD97	23,61±0,06	23,72±0,45	23,48±0,23	24,01±0,27	24,62±0,72	24,26±0,44	24,35±0,18	24,49±0,18	25,54±1,29	24,35±0,36
CELSR1	25,78±0,93	26±0,53	26±0,18	26,12±0,45	26,2±0,98	26,15±0,3	26,22±0,35	26,27±0,28	27,21±1,26	25,88±0,16
CELSR2	27,43±0,47	27,14±0,68	26,87±0,32	27,29±0,88	27,18±1,07	27,22±0,78	27,47±0,8	27,27±1,02	28,16±2,24	27,65±1,72
CELSR3	27,28±0,42	27,16±0,21	27,08±0,44	27,2±0,5	27,13±1,06	27,24±0,35	27,73±0,41	27,56±0,76	28,13±0,72	27,56±0,06
CHRM3	26,88±0,33	28,05±0,5	28,03±0,29	28,32±0,42	28,47±0,09	28,19±0,22	28,67±0,06	28,93±0,1	29,51±0,67	29,26±0,2
CHRM4	29,12±0,21	29,12±0,14	28,79±0,24	28,73±0,48	29,02±0,39	28,84±0,19	29,05±0,35	28,75±0,03	29,01±0,06	28,26±1,14
CNR1	26,59±0,13	25,87±0,68	25,4±0,23	26,27±0,59	26,07±0,51	26,24±0,42	26,39±0,24	26,29±0,02	26,64±1,27	26,24±0,59
CXCR4	23,95±0,43	24,68±0,75	24,11±0,6	24,15±0,24	24,18±0,68	24,55±1,1	24,36±0,83	24,79±0,95	26,14±3,45	24,72±1,81
DRD2	29,58±0,57	29,93±0,04	29,62±0,21	30,1±0,2	29,41±0,37	30,21±0,78	30,73±0,43	31,2±0,2	31,71±1,81	30,99±0,8
EBI2	28,93±0,39	29,84±0,1	29,05±0,01	29,84±0,7	30,24±0,81	29,36±0,68	30,29±0,14	30,02±0,93	30,51±2,2	29,79±1,32
EDG1	31,57±0,64	31,08±0,53	31,32±0,48	30,56±0,4	30,58±0,42	29,8±0,94	29,97±1,01	29,46±1,61	29,6±0,95	28,13±2,34
EDG3	27,53±0,06	28,83±0,26	28,64±0,45	29,22±1,08	28,71±0,6	28,87±0,43	29,41±0,5	28,76±0,65	29,56±0,21	27,37±1,84
EDG4	28,14±0,29	27,88±0,09	27,51±0,05	28,06±0,5	27,68±0,31	27,98±0,46	28,11±0,01	28±0,2	28,58±0,99	28,44±0,62
EDG5	25,46±0,17	25,75±0,28	25,47±0,59	25,93±0,34	25,56±0,6	26,09±0,57	26,17±0,59	26,06±0,41	26,62±1,23	26,46±0,44
EDG8	28,22±0,94	28,07±0,04	27,85±0,36	27,89±0,01	28±0,12	28,25±0	28,12±0,11	27,87±0,23	28,6±0,86	27,55±0,4
EDNRA	30,61±0,12	30,94±0,35	30,33±0,11	31,35±0,65	32,83±2,52	31,65±0,37	31,74±0,44	32,33±0,31	32,96±2,02	31,72±0,96
EDNRB	28,03±0,05	28,06±1,04	27,94±0,71	28,04±1,36	28,05±1,87	28,59±1,99	28,31±2,01	28,48±1,32	29,34±3,24	27,88±2,36
F2R	23,28±0,12	23,24±0,46	22,97±0,64	23,1±0,17	23,13±0,46	23,06±0,25	22,96±0,06	23,05±0,05	23,98±1,42	22,65±0,92
F2RL1	24,16±0,11	23,95±0,31	23,71±0,39	23,89±0,06	23,95±0,26	24,02±0,18	24,29±0,13	24,46±0,03	25,29±1,33	24,37±0,91
F2RL2	28,99±0,2	28,63±0,55	28,2±1,07	27,94±0,35	27,34±0,58	27,4±0,62	27,64±0,74	28,22±1,53	29,29±2,63	29,3±2,01
FZD1	24,84±0,26	25,14±0,04	25,13±0,21	25,22±0,13	25,08±0,34	24,94±0,05	25,1±0,01	24,9±0,08	25,27±0,27	24,52±0,6
FZD2	26,72±0,01	26,96±0,44	27,07±0,52	27,42±0,55	27,22±0,87	27,27±0,72	27,37±0,31	27,34±0,42	27,79±1,46	27,25±0,55
FZD3	26,33±0,29	26,2±0,2	26,26±0,17	26,41±0,47	26,41±0,29	26,65±0,52	26,69±0,03	26,75±0,28	27,13±1,1	26,52±0,49
FZD4	26,83±0,27	26,75±0,35	26,39±0,08	26,18±0,13	26,07±0,11	25,85±0,18	25,72±0,18	25,75±0,45	27,04±1,23	25,12±0,77
FZD5	25,24±0,44	25,63±0,25	25,53±0,66	25,93±0,57	25,81±0,54	25,9±0,52	26,24±0,16	25,98±0,47	26,28±0,71	25,7±0,14
FZD7	24,91±0,04	24,6±0,25	24,39±0,23	24,77±0,11	24,33±0,44	24,59±0,34	24,29±0,39	23,88±0,25	24,04±1,11	23,38±0,06
FZD8	27,55±0,01	27,16±0,18	27,17±0,09	27,29±0,25	27,98±0,75	27,86±0,89	27,75±0,3	28,16±0,06	28,76±0,78	28,38±0,14
FZD9	31,97±0,49	32,05±1,05	31,71±0,58	32,21±0,16	32,17±0,93	32,1±0,65	31,74±0,25	31,74±0	33,41±2,28	31,81±0,3
GABBR1	25,7±0,28	25,67±0,25	25,56±0,24	25,66±0,37	25,53±0,39	25,26±0,31	25,82±0,02	25,55±0,18	25,91±1,34	24,9±0,14
GAPDH	17,89±0,12		18,39±0,11	18,51±0,07	18,53±0,04	19,47±0,69	19,24±0,06	19,26±0,49	19,94±1,24	19,8±0,92
GCNT2	28,59±0,9	28,34±0,81	28,09±0,81	28,86±1,1	28,62±1,19	28,77±1,31	28,88±1,45	28,68±1,55	30,52±4,14	29,45±3,05
GIPR	31,42±0,8	30,41±0,14	29,95±0,08	30,18±0,85	29,61±1,01	29,34±0,9	29,88±0,38	29,28±0,82	30,42±2,25	29,26±0,7
GPR	26,95±0,07	27,13±0,07	26,92±0,16	26,88±0,28	26,77±0,14	26,89±0,07	26,74±0,16	26,55±0,04	26,97±0,8	25,93±0,06
GPR103	29,93±0,09	30,75±0,25	30,71±0,27	30,72±0,76	30,3±0,07	30,14±0,25	29,81±0,06	29,93±0,2	29,69±0,75	28,99±0,9
GPR124	30,82±0,5	29,32±0,18	29,33±0,52	29,48±0,36	29,45±0,37	29,32±0,04	29,54±0,44	29,58±0,23	30,75±1,4	29,87±0,2
GPR125	25,8±0,06	25,9±0,15	25,9±0,01	26,46±0,71	26,12±0,36	26,18±0,56	26,59±0,27	26,31±0,32	26,82±0,62	26,91±0,84
GPR126	30,88±0,99	30,64±0,25	31,22±0,7	30,98±0,19	30,67±0,52	29,98±0,44	31,02±0,45	30,82±0,04	32,04±0,92	31,75±0,71
GPR128	29,61±1,32	31,32±1,44	32,04±1,41	32,27±1,57	31,06±1,05	33,01±2,91	31,81±0,98	31,81±1,61	32,85±3,47	33,12±4,03

Détecteur	J2	J6	J7	J10	J11	J14	J15	J18	J19	J21
GPR55	32,25±0,77	33,77±1,54	33,58±0,43	34,58±1,52	33,13±0,55	36,24±5,31	34,48±0,98	32,73±0,25	34,13±1,53	32,32±2,44
GPR56	23,03±0,03	22,46±0,73	21,81±0,16	22,1±0,33	22,16±0,42	22,29±0,61	22,53±0,46	22,5±0,45	23,57±1,89	22,55±0,2
GPR61	30,25±0,39	30±0,52	29,8±0,23	30,02±0,4	29,95±0,65	29,99±0,3	30,36±0,32	30,04±0,63	30,44±0,97	30,46±0,88
GPR62	30,95±0,58	30,43±0,13	30,11±0,94	30,33±0,32	30,27±0,87	30,36±0,37	31,29±0,04	30,47±0,97	33,99±5,16	30,41±0,33
GPR63	29,48±0,53	29,33±0,72	29,33±1,11	29,04±0,39	28,98±1,05	29,52±0,76	28,85±0,74	28,79±1	28,55±0,58	28,45±0,94
GPR68	31,81±0,18	30,14±0,75	30±0,54	30,73±0,39	30,14±0,48	30,07±0,42	30,61±0,06	30,57±0,29	30,89±1,04	29,51±0,48
GPR73	27,96±0,29	28,15±1,33	27,72±1,42	28,01±0,49	27,84±0,92	28,59±1,08	28,33±0,31	28,58±1,33	29,02±1,27	30,29±1,88
GPR75	31,1±0,22	32,19±0,32	32,07±1,28	33,73±0,87	32,64±0,51	33,95±1,48	33,08±0,46	33,58±2,16	31,27±1,61	31,28±3,77
GPR82	29±0,66	30±0,55	29,89±0,18	29,84±0,35	29,97±0,74	29,58±0,71	30,21±0,36	29,62±0,88	31,04±2,6	29,83±1,19
GPR85	29,34±0,12	29,18±0,89	28,66±0,39	29,15±1,15	28,55±0,54	28,35±0,18	28,8±0,29	28,77±0,36	29,01±1,24	29,19±1,82
GPRC5A	28,15±0,26	27,44±0,78	27,07±0,98	26,92±0,45	26,67±0,47	27,49±0,98	27,76±0,17	27,35±0,89	28,23±1,05	28,23±0,13
GPRC5B	24,24±0,14	24,21±0,13	23,98±0,11	24,5±0,08	24,46±0,64	24,51±0,1	24,37±0,45	24,6±0,07	25,1±1,1	24,29±0,57
GRM8	27,18±0,52	27,77±0,4	27,65±0,73	27,82±0,41	27,71±0,58	27,8±0,51	27,82±0,05	27,27±0,09	28,09±1,24	26,53±0,62
GRPR	31,77±0,37	32,81±0,19	32,97±0,23	33,6±1,31	33,38±0,22	33,85±2,07	35,13±0,13	34,04±1,3	36,33±5,19	37,31±3,81
GUSB	21,93±0,37	22±0,13	22,01±0,48	22,1±0,26	22,09±0,63	22,33±0,71	22,23±0,36	22,07±0,66	22,79±1,59	22,38±1,17
HDAC3	23,8±0,49	24,16±0,61	23,95±0,1	24,47±0,41	24,55±0,62	24,72±0,64	24,84±0,19	24,75±0,19	25,41±1,04	24,69±0,35
HMBS	24,49±0,53	25,22±0,42	25,06±0,35	25,54±0,63	25,23±0,4	25,55±0,52	25,78±0,19	25,5±0,11	26,26±0,85	26,05±0,86
HPRT1	23,29±0,33	24,13±0,22	24,35±0,66	24,47±0,27	24,31±0,35	24,93±0,57	24,85±0,22	24,78±0,58	25,29±0,97	25,08±0,88
HRH1	33,48±2,43	33,38±1,85	32,68±1,56	32,93±0,37	33,2±1,2	34,3±2,35	36,49±4,97	33,1±2,18	33,4±0,6	33,26±1,58
HRH2	26,33±0,32	25,67±0,43	25,48±0,35	26,42±0,71	26,52±0,73	26,76±0,65	27,16±0,86	27,16±0,07	28,6±1,88	26,77±0,64
HTR1D	29,03±0,4	27,91±0,58	27,61±0,22	27,69±1,23	27,5±0,9	27,96±1,54	27,61±0,53	27,55±1,68	28,63±2,73	29,85±5,03
IPO8	24,34±0,44	24,68±0,25	24,67±0,44	24,85±0,46	24,83±0,59	24,91±0,53	25±0,16	24,88±0,43	25,36±0,93	25,16±0,59
LANCL1	24,64±0,27	24,81±0,22	24,84±0,24	25,09±0,51	24,92±0,37	25,44±0,64	25,43±0,45	25,51±0,49	26,03±1,26	26,24±1,51
LANCL2	26,77±0,89	28,01±0,46	27,85±0,55	28,43±0,72	27,99±0,54	28,62±0,9	28,49±0,65	28,33±1,17	28,9±1,37	28,65±0,99
LGR4	26,4±0,01	26,15±0,03	26,14±0,37	26,44±0	26,2±0,35	26,5±0,13	26,67±0,28	26,5±0,27	27,05±1,28	26,49±0,73
LGR6	32,79±1,9	32,99±0	32,32±0,34	36,28±5,26	31,85±0,68	33,37±0,89	33,17±1,47	36,54±4,89	40±0	33,35±0,57
LONPL	24,87±0,1	24,74±0,03	24,58±0,01	24,77±0,23	24,68±0,28	24,69±0,26	24,68±0,14	24,72±0,22	25,41±0,97	24,71±0,24
LPHN1	26,77±0,41	26,07±0,1	25,68±0,05	25,86±0,04	26,03±0,49	25,84±0,09	26,14±0,34	26,05±0,13	26,5±0,8	25,63±0,61
LPHN2	22,44±0,48	22,73±0,23	22,97±0,18	23,65±0,19	23,62±0,36	24,01±0,26	24,1±0,24	24,1±0,27	24,53±0,6	24,33±0,72
LPHN3	27,53±0,13	28,22±0,28	28,21±0	28,14±0,33	28,48±0,65	28,41±0,88	28,74±0,76	29,12±0,7	30,12±2,11	29,54±1,41
LTB4R	29,14±0,64	28,77±0,03	28,98±0,39	29,63±1,02	29,36±1,05	30,09±1,63	30,91±0,53	30,68±2,45	30,45±1,14	31,81±2,78
LTB4R2	28,36±0,63	28,47±0,11	28,67±0,17	28,84±0,59	28,65±1,4	28,56±0,81	29,16±1,09	28,51±0,64	28,62±1,2	28,13±0,29
MASS1	29,76±1,12	30,57±0,38	30,93±0,74	31,27±1,02	31,23±0,94	31,09±0,6	31,77±0,3	31,01±0,73	31,53±1,65	30,93±1,44
MC1R	27,67±0,46	27,19±0	27,19±0,06	27,43±0,55	27,2±0,71	27,11±0,87	27,57±0,22	27±0,41	27,17±1,05	26,49±0,38
OPN3	28,43±1,01	27,49±0,51	27,66±1,26	27,05±0,34	26,87±0,34	27,65±0,99	27,3±0,77	27,47±1,1	26,88±0,45	27,21±1,13
OPRL1	30,8±0,47	30,16±0,23	29,92±0,55	30,11±0,32	29,91±0,28	30,09±0,88	29,36±0,24	29,51±0,56	30,4±1,46	29,49±0,15
OXER1	29,94±0,02	29,8±0,3	29,76±0,52	29,91±0,11	29,8±0,4	29,23±0,28	30,62±0,98	29,97±0,05	32,06±3,34	31,09±1,13
OXTR	29,19±0,13	30,31±0,07	30,61±0,85	31,66±1,38	30,89±0,66	32,17±1,32	32,98±0,36	33,46±1,63	32,59±1,41	32,87±0,36
P2RY1	26,44±0,14	26,36±0,18	26,05±0,29	27,15±1,23	26,52±0,61	26,57±0,42	27,61±1,17	26,9±0,61	27,86±1,91	27,49±1,43
P2RY11	26,14±0,4	26,54±0,31	26,29±0,17	26,81±0,28	26,4±0,68	26,49±0,59	26,66±0,36	26,17±0,41	26,61±0,55	25,76±0,48
P2RY13	30,36±0,34	30,1±0,46	29,7±0,34	30,43±0,52	30,72±0,74	29,71±0,07	31,01±1,2	30,4±0,76	31,36±2,34	30,54±1,56
P2RY4	30,58±0,43	29,93±0,19	29,68±0,4	30,08±0,34	29,78±0,47	29,69±1,42	30,65±0,92	29,79±1,47	30,58±2,07	30,31±0,84
P2RY5	27,26±0,15	27,27±0,83	27,44±0,35	28,12±0,11	28,46±0,24	28,54±0,26	28,92±0,33	28,63±0,13	29,57±1,59	29,02±0,37
PGK1	20,5±0,49	21,11±0,44	21,14±0,57	21,2±0,28	21,32±0,65	21,95±0,74	21,99±0,62	21,93±0,87	22,64±1,48	22,33±0,96
PHGDH	23,68±1,07	23,66±0,51	23,89±1,1	23,56±0,46	23,4±0,76	23,75±0,7	23,7±0,66	23,76±0,88	23,97±1,25	24,12±1,41
POLR2A	22,06±0,2	22,94±0,05	23,08±0,46	23,64±0,46	23,65±0,77	23,88±0,6	24,01±0,36	23,9±0,72	24,43±1,01	23,93±0,11
PPIA	18,26±0,45	19,35±0,43	19,45±0,58	19,68±0,41	19,58±0,27	20,22±0,46	20,09±0,25	19,99±0,45	20,59±1,08	20,22±0,65
RARS	23,9±0,1	24,35±0,27	24,26±0,09	24,51±0,12	24,39±0,14	24,61±0,2	24,67±0,16	24,55±0,05	25,14±0,49	24,39±0,23
RPLP0	19,47±0,28	19,6±0,27	19,55±0,25	19,69±0,37	19,62±0,17	19,96±0,7	19,9±0,31	19,89±0,47	20,56±1,33	20,01±0,58
SENP3	24,28±0,32	24,74±0,14	24,79±0,4	24,93±0,31	24,87±0,45	24,96±0,44	25±0,09	24,86±0,32	25,12±0,32	24,53±0,5
SMO	25,15±0,25	24,77±0,35	24,86±0,17	24,95±0,02	24,99±0,42	24,92±0,13	25,12±0	25,04±0,23	25,61±0,85	25,46±0,69
SSTR2	31,36±0,77	30,96±0,32	30,96±0,21	30,35±0,57	30,44±0,73	30,6±0,35	30,88±0,41	29,45±0,92	29,42±0,11	28,26±1,77
TBP	26,08±0,2	26,78±0,47	26,84±0,4	27,02±0,57	26,91±0,21	27,02±0,02	27,32±0,57	27,04±0,18	27,71±0,21	27,04±0,62
TBXA2R	29,15±0,27	28,54±0,43	27,94±0,29	28,14±0,09	27,74±0,21	27,7±0,06	27,75±0,04	27,52±0,25	28,53±0,9	27,67±0,67
TFRC	22,77±0,29	23,31±0,49	23,08±0,34	23,61±0,45	23,82±0,25	24,61±0,91	25,01±0,48	25,03±0,95	25,67±1,25	25,24±0,39
TM7SF1	26,61±0,46	26,51±0,37	26,23±0,4	27,61±2,13	26,14±0,19	26,28±0,01	33±9,9	26,11±0,53	26,94±0,68	26,09±0,28
VN1R1	27,19±0,5	26,97±0,16	26,77±0,02	26,81±0,26	26,83±0,39	26,73±0,49	26,91±0,22	26,73±0	27,04±0,56	26,54±0,18

Les expressions des gènes de la carte RCPG TaqMan® Array Card d'Applied Biosystems sont données en cycle seuil, normalisés par rapport au RPLP0 et moyennés. Chaque jour de mise en quiescence a été testé 2 fois, sauf les f-NSC qui ont été testées 3 fois.
Les gènes sont considérés comme exprimés si leur Ct est inférieur à 31,5.

ANNEXE VI : Courbes doses-réponse des molécules issues du criblage sur les cellules souches cancéreuses TG16 en prolifération et en quiescence.

Molécule	Structure	EC50 TG16 P (µM)	EC50 TG16 Q (µM)	Résultats
Zuclopenthixol		29±5	48±18	
Parthénolide		10±2	21±1	
Bisacodyl		>100	1,3±0,1	
Isoconazole		43±1	12±1	
Progestérone		75±6	25±9	
Astémizole		17±2	58±9	
Prazosine		29±8	118±34	
Sertraline		31±1	44±9	
Ellipticine		13±1	56±10	
Fendiline		42±1	45±16	
Ivermectine		1,5±0,2	6±2	
Amiodarone		11±1	14±5	
β-Escine		6±1	8±1	
Perhexiline		11±1	21±4	
Prénylamine		32±2	42±8	
Suloctidil		13,5±0,1	14±6	

Molécule	Structure	EC50 TG16 P (µM)	EC50 TG16 Q (µM)	Résultats
Terfénadine		9±1	24±6	
Butoconazole		29±4	18±3	
Acide Ethacrynique		60±14	12±2	
Lutéoline		65±24	34±4	
Lynestrénol		32±2	28±6	
Félodipine		39±4	33±3	
Tamoxifène		20±1	20±3	
Clioquinol		35±5	29±5	
AMPc		>100	>100	
Primaquine		52±7	60±14	
Trapidil		>100	>100	

CELLULES TG16 : EC50 des molécules sélectionnées lors du criblage secondaire sur les cellules TG1.

Les molécules sélectionnées lors du criblage secondaire ont été testées en courbes dose-réponse (1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM) sur les cellules TG16 en prolifération et en quiescence. Les courbes ont été réalisées en triplicata, les EC50 ont été déterminés à partir de l'équation de Hill ayant servi à ajuster les courbes. En gris, composés qui n'ont pas d'effet.

ANNEXE VII : Courbes dose-réponse des molécules issues du criblage, sur les cellules souches cancéreuses OB1 en prolifération et en quiescence.

Molécule	Structure	EC50 OB1 P (µM)	EC50 OB1 Q (µM)	Résultats
Zuclopenthixol		27±9	44±17	
Parthénolide		18±4	35±11	
Bisacodyl		>100	0,5±0,1	
Isoconazole		51±5	14±5	
Progestérone		89±29	23±11	
Astémizole		13±3	43±16	
Prazosine		26±7	67±18	
Sertraline		32±11	45±2	
Ellipticine		8±1	30±9	
Fendiline		40±13	48±9	
Ivermectine		3±1	7±2	
Amiodarone		12±1	19±1	
β-Escine		12±1	6±1	
Perhexiline		12±1	22±4	
Prénylamine		30±7	49±4	
Suloctidil		15±2	20±4	

Molécule	Structure	EC50 OB1 P (µM)	EC50 OB1 Q (µM)	Résultats
Terfénadine		10±2	22±4	
Butoconazole		35,1±0,9	19±2	
Acide Ethacrynique		60±20	24±3	
Lutéoline		27±4	18±4	
Lynestrénol		26±5	56±10	
Félodipine		43±5	41±6	

Molécule	Structure	EC50 OB1 P (µM)	EC50 OB1 Q (µM)	Résultats
Tamoxifène		28±3	29±3	
Clioquinol		27±8	30±3	
AMPc		>100	>100	
Primaquine		>100	>100	
Trapidil		>100	>100	

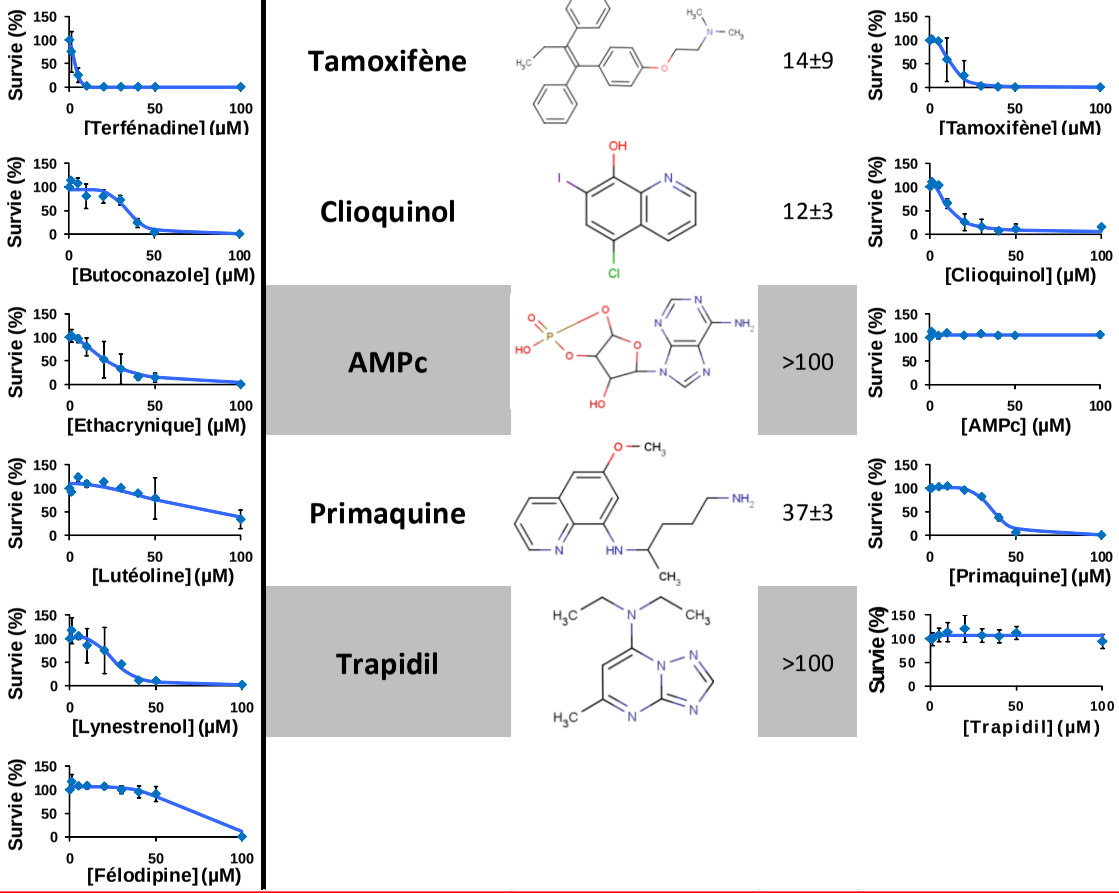
CELLULES OB1 : EC50 des molécules sélectionnées lors du criblage secondaire sur les cellules TG1.

Les molécules sélectionnées lors du criblage secondaire ont été testées en courbes dose-réponse (1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM) sur les cellules OB1 en prolifération et en quiescence. Les courbes ont été réalisées en triplicata, les EC50 ont été déterminés à partir de l'équation de Hill ayant servi à ajuster les courbes. En gris, composés qui n'ont pas d'effet.

ANNEXE VIII : Courbes dose-réponse des molécules issues du criblage sur les cellules souches neurales fœtales f-NSC.

Molécule	Structure	EC50 f-NSC (µM)	Résultats
Zuclopenthixol		13±1	
Parthénolide		8,4±0,2	
Bisacodyl		>100	
Isoconazole		50±5	
Progestérone		65±70	
Astémizole		6,3±0,2	
Prazosine		14±1	
Sertraline		10±2	
Ellipticine		7±2	
Fendiline		11±1	
Ivermectine		4±1	
Amiodarone		10	
β-Escine		nd	
Perhexiline		3±1	
Prénylamine		9±2	
Suloctidil		5±1	

Molécule	Structure	EC50 f-NSC (µM)	Résultats
Terfénadine		4±1	
Butoconazole		34±1	
Acide Ethacrynique		21±11	
Lutéoline		70±36	
Lynestrénol		23±5	
Félodipine		59±12	
Tamoxifène		14±9	
Clioquinol		12±3	
AMPc		>100	
Primaquine		37±3	
Trapidil		>100	



CELLULES f-NSC : EC50 des molécules sélectionnées lors du criblage secondaire sur les cellules TG1.

Les molécules sélectionnées lors du criblage secondaire ont été testées en courbes dose-réponse (1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM). Les courbes ont été réalisées en triplicata, les EC50 ont été déterminés à partir de l'équation de Hill ayant servi à ajuster les courbes. En gris, composés qui n'ont pas d'effet.

ANNEXE IX : Courbes dose-réponse des composés issus du criblage sur les cellules HEK.

Molécule	Structure	EC50 HEK (µM)	Résultats
Zuclopenthixol		29±1	
Parthénolide		13±5	
Bisacodyl		nd	
Isoconazole		60±9	
Progestérone		36±10	
Astémizole		21±9	
Prazosine		22±6	
Sertraline		23±1	
Ellipticine		13±2	
Fendiline		34±9	
Ivermectine		13±1	
Amiodarone		28±4	
β-Escine		31±1	
Perhexiline		12±1	
Prénylamine		25±6	
Suloctidil		10±1	

Molécule	Structure	EC50 HEK (µM)	Résultats
Terfénadine		8±1	
Butoconazole		34±8	
Acide Ethacrynique		nd	
Lutéoline		nd	
Lynestrénol		57±8	
Félodipine		55±2	
Tamoxifène		30±10	
Clioquinol		22±1	
AMPc		nd	
Primaquine		91	
Trapidil		nd	

CELLULES HEK : EC50 des molécules sélectionnées lors du criblage secondaire sur les cellules TG1.

Les molécules sélectionnées lors du criblage secondaire ont été testées en courbes dose-réponse (1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM). Les courbes ont été réalisées en triplicata, les EC50 ont été déterminés à partir de l'équation de Hill ayant servi à ajuster les courbes. En gris, composés qui n'ont pas d'effet.

ANNEXE X : Courbes dose-réponse des composés issus du criblage, sur la lignée cellulaire de glioblastome U-87 MG.

Molécule	Structure	EC50 U-87MG (µM)	Résultats
Zuclopenthixol		32±1	
Parthénolide		55	
Bisacodyl		>100	
Isoconazole		28	
Progestérone		>100	
Astémizole		13±3	
Prazosine		23±1	
Sertraline		38±6	
Ellipticine		>100	
Fendiline		42	
Ivermectine		14±1	
Amiodarone		48±6	
β-Escine		27	
Perhexiline		17±3	
Prénylamine		36	
Suloctidil		21±1	

Molécule	Structure	EC50 U-87MG (µM)	Résultats
Terfénadine		13±4	
Butoconazole		68	
Acide Ethacrynique		>100	
Lutéoline		>100	
Lynestrénol		85±10	
Félodipine		55±7	

Molécule	Structure	EC50 U-87MG (µM)	Résultats
Tamoxifène		31±2	
Clioquinol		>100	
AMPc		nd	
Primaquine		nd	
Trapidil		>100	

CELLULES U-87 MG: EC50 des molécules sélectionnées lors du criblage secondaire sur les cellules TG1.

Les molécules sélectionnées lors du criblage secondaire ont été testées en courbes dose-réponse (1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM). Les courbes ont été réalisées en triplicata, les EC50 ont été déterminés à partir de l'équation de Hill ayant servi à ajuster les courbes. En gris, composés qui n'ont pas d'effet.

ANNEXE XI : Courbes dose-réponse des composés issus du criblage, sur les astrocytes humains (HA).

Molécule	Structure	EC50 HA (µM)	Résultats
Zuclopenthixol		12±1	
Parthénolide		59±4	
Bisacodyl		>100	
Isoconazole		15±3	
Progestérone		>100	
Astémizole		19±4	
Prazosine		15±1	
Sertraline		24±1	
Ellipticine		5±1	
Fendiline		42±8	
Ivermectine		3±1	
Amiodarone		22±7	
β-Escine		7±1	
Perhexiline		12±2	
Prénylamine		30±2	
Suloctidil		11±1	

Molécule	Structure	EC50 HA (µM)	Résultats
Terfénadine		9±2	
Butoconazole		24±6	
Acide Ethacrynique		>100	
Lutéoline		>100	
Lynestrénol		20±1	
Félodipine		36±6	

Molécule	Structure	EC50 HA (µM)	Résultats
Tamoxifène		15±4	
Clioquinol		11,0±0,1	
AMPc		nd	
Primaquine		76	
Trapidil		>100	

CELLULES HA : EC50 des molécules sélectionnées lors du criblage secondaire sur les cellules TG1.

Les molécules sélectionnées lors du criblage secondaire ont été testées en courbes dose-réponse (1µM, 5µM, 10µM, 20µM, 30µM, 40µM, 50µM et 100µM). Les courbes ont été réalisées en triplicata, les EC50 ont été déterminés à partir de l'équation de Hill ayant servi à ajuster les courbes. En gris, composés qui n'ont pas d'effet.

ANNEXE XII : High-throughput screening identifies bisacodyl as potently cytotoxic towards glioblastoma stem cells in an acidic pH environment

Publication soumise à Cancer Research.

ANNEXE XIII : BREVET : Bisacodyl et dérivés comme médicament destiné au traitement du cancer.

Revendications

Demande en cours

ANNEXE XIV : Liste des autres publications

Fève M, Zeniou M, Chneiweiss H, Haiech J, Kilhoffer MC. The endo-GPCR expression repertoire in glioblastoma tumour stem cells unveils new potential therapeutic targets (en préparation).

Haiech J, Audran E, **Fève M**, Ranjeva R, Kilhoffer MC. Revisiting intracellular calcium signaling semantics. Biochimie. 2011 Dec;93(12):2029-37. Epub 2011 May 19.

Dagher R, Peng S, Gioria S, **Fève M**, Zeniou M, Zimmermann M, Pigault C, Haiech J, Kilhoffer MC. A general strategy to characterize calmodulin-calcium complexes involved in CaM-target recognition: DAPK and EGFR calmodulin binding domains interact with different calmodulin-calcium complexes. Biochim Biophys Acta. 2010 Nov 30.

Dagher R, Brière C, **Fève M**, Zeniou M, Pigault C, Mazars C, Chneiweiss H, Ranjeva R, Kilhoffer MC, Haiech J. Calcium fingerprints induced by calmodulin interactors in eucaryotic cells. Biochim Biophys Acta. 2009 Jun;1793(6):1068-77. 2008 Dec 14.

Jagla M, **Fève M**, Kessler P, Lapouge G, Erdmann E, Serra S, Bergerat JP, Céraline J. A splicing variant of the androgen receptor detected in a metastatic prostate cancer exhibits exclusively cytoplasmic actions. Endocrinology. 2007 Sep;148(9):4334-43. Epub 2007 May 31.

ANNEXE XV : CV

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Marie FEVE

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

Utilisation d'une approche de chimie biologie intégrative dans la recherche de nouvelles molécules actives sur la prolifération et la différenciation des cellules souches cancéreuses

Résumé

Depuis l'émergence du concept de cellules souches cancéreuses (CSC), de telles cellules ont été isolées à partir de diverses tumeurs solides, dont les glioblastomes. Les CSC et les propriétés qui les caractérisent permettent de mieux comprendre l'hétérogénéité tumorale, ainsi que l'agressivité de certaines tumeurs et les récidives après traitement. Avec la mise en évidence des CSC, un nouveau paradigme est apparu dans le domaine de la thérapie anticancéreuse visant à cibler non seulement les cellules de la masse tumorale, mais également les CSC, plus résistantes aux chimio- et radiothérapies, mais aussi capables d'entrer en quiescence et de reformer la tumeur d'origine. L'isolement de CSC à partir des tumeurs, leur physiopathologie et la recherche de molécules capables de les détruire ou de les différencier afin de les rendre plus sensibles aux traitements mobilisent un nombre croissant d'équipes de recherche et certaines industries pharmaceutiques.
Cette thèse présente un travail sur des CSC isolées de glioblastomes humains et s'inscrit dans la démarche énoncée ci-dessus.

Mots Clés : Glioblastomes humains, Cellules Souches Cancéreuses, Quiescence, Single Nucleotide Polymorphism, Récepteurs couplés aux protéines G, Transcriptome, Chimie-Biologie Intégrative, Criblage, Chimiothèque, Relation Structure-Activité.

Summary

Since the emergence of the concept of cancer stem cells (CSC), such cells were isolated from various solid tumors including glioblastomas. The CSC and the properties that characterize them allow a better understanding of tumor heterogeneity and aggressiveness of certain tumors and recurrences after treatment. With the highlighting of CSC, a new paradigm has emerged in the field of cancer therapy. New strategies aim at targeting not only the cells of the tumor mass, but also the CSC, more resistant to chemo- and radiotherapy, but also capable of enter into a quiescent state and to reform the original tumor. The isolation of CSC from solid tumors, their pathogenesis and the search for molecules capable of destroying them or differentiate them to make them more sensitive to treatment, mobilize a growing number of research teams and some pharmaceutical industries.
This thesis presents a work on CSC isolated from human glioblastomas and is part of the approach set out above.

Keywords: Human Glioblastoma, Cancer Stem Cells, Quiescence, Single Nucleotide Polymorphism, G protein-coupled receptors, transcriptomics, Integrative Biology-Chemistry, Screening, Chemical Library, Structure-Activity Relationship.