Thèse de doctorat

Université de Limoges

Université de Limoges

École Doctorale Bio-Santé (ED 524)

Equipe d'accueil 3842

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Sciences de la Vie et de la Terre

Présentée et soutenue par

Sophie Hombourger

Le 18 décembre 2017

Place des signalisations autophagique et neurotrophique dans le Glioblastome Multiforme : implications pour les Cellules Souches Cancéreuses

Thèse dirigée par Mireille VERDIER et Barbara BESSETTE

JURY :

Président du jury
M. Serge BATTU, PU, EA3842, Université de Limoges

Rapporteurs
Mme. Hélène BŒUF, DR, Inserm U1026, BioTis, Université de Bordeaux
Mme. Christine TOULAS, IR-HDR, INSERM U1037, "Glioblastoma Radioresistance", Oncopole Toulouse

Examinateurs
Mme. Corinne CHADENEAU, MCU, Equipe 2RCT, Université de Poitiers
Mme. Mireille VERDIER, MCU-HDR, EA3842, Université de Limoges
Mme. Barbara BESSETTE, MCU, EA3842, Université de Limoges

Thèse de doctorat

Université de Limoges

Université de Limoges

École Doctorale Bio-Santé (ED 524)

Equipe d'accueil 3842

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Sciences de la Vie et de la Terre

Présentée et soutenue par

Sophie Hombourger

Le 18 décembre 2017

Place des signalisations autophagique et neurotrophique dans le Glioblastome Multiforme : implications pour les Cellules Souches Cancéreuses

Thèse dirigée par Mireille VERDIER et Barbara BESSETTE

JURY :

Président du jury
M. Serge BATTU, PU, EA3842, Université de Limoges

Rapporteurs
Mme. Hélène BŒUF, DR, Inserm U1026, BioTis, Université de Bordeaux
Mme. Christine TOULAS, IR-HDR, INSERM U1037, "Glioblastoma Radioresistance", Oncopole Toulouse

Examinateurs
Mme. Corinne CHADENEAU, MCU, Equipe 2RCT, Université de Poitiers
Mme. Mireille VERDIER, MCU-HDR, EA3842, Université de Limoges
Mme. Barbara BESSETTE, MCU, EA3842, Université de Limoges

A mes parents,

A ma sœur,

A mes grands-parents

BY-NC-ND

Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées.

Marie Curie

BY-NC-ND

Remerciements

Je profite de ces quelques lignes pour remercier toutes les personnes qui m'ont aidée, de près ou de loin, au cours de ces trois années de thèse. Mille excuses à ceux que j'aurais pu oublier.

Tout d'abord je tiens à adresser mes sincères remerciements aux membres du jury d'avoir accepté d'y participer. Je remercie le Dr Hélène Bœuf et le Dr Christine Toulas d'avoir accepté de juger mon travail en tant que rapportrices. Je tiens également à remercier le Pr Serge Battu d'avoir accepté de siéger au jury et le Dr Corinne Chadeneau pour sa participation en tant qu'examinatrice.

Je tiens ensuite à exprimer ma gratitude au professeur Marie-Odile Jauberteau-Marchan de m'avoir accueillie au sein de son équipe. Merci pour votre confiance et votre bienveillance.

Je voudrais également remercier mes directrices de thèse, le Dr Mireille Verdier et le Dr Barbara Bessette pour leur confiance. Je tiens vraiment à vous remercier d'avoir été si compréhensives et de m'avoir permis de poursuivre, j'ai conscience que je vous dois énormément. Ces trois années à vos côtés m'ont permis de grandir, scientifiquement, mais pas que, et de prendre confiance en moi. Je vous remercie également d'avoir su vous rendre disponibles malgré vos emplois du temps chargés. Ça n'a pas été facile mais vous m'avez permis d'aller jusqu'au bout, merci.

Je tiens aussi à remercier le Dr Gaëlle Bégaud et le Dr François Gallet pour leur aide technique et pour la correction du manuscrit.

Je remercie bien évidemment tous mes collègues de l'EA3842 pour leur bonne humeur et leur gentillesse.
Tout d'abord Clément, merci de m'avoir fait une petite place dans ton bureau à mon arrivée, et de m'y avoir accueillie si gentiment.
Un grand merci à Soha pour m'avoir initiée au sujet et pour son aide par la suite.
Miguel, merci pour ton sourire à toute épreuve.
Merci à Sandra, Amazigh et Thomas pour leur aide et tous leurs conseils.
Sabrina, Hugo et Marine, merci pour votre bonne humeur et pour nos pauses repas, reflet de notre équilibre mental inaltérable malgré la thèse… ou pas ! Je vous souhaite bon courage pour la fin !
Merci à Hussein pour son énergie et sa positivité en toutes circonstances, tu as été un colocataire merveilleux. Je te souhaite plein de bonheur pour la suite.
Aurélie P. et Philippe, merci pour votre disponibilité et pour votre patience vis-à-vis de mes nombreuses requêtes.
Mohamad, merci pour ton soutien dans cette dernière ligne droite. Je te souhaite de trouver un environnement dans lequel tu pourras t'épanouir, tu le mérites.

BY-NC-ND

Merci à Nicolas, de t'être occupé de ma pauvre plante lâchement abandonnée, mais vraiment… ferme cette porte !
Merci au docteur Kim, heureusement que tu étais là.
A Sofiane, merci pour ton immense gentillesse, ton écoute, ta disponibilité (de jour, comme de nuit 😉), ton esprit critique et la quantité de conseils que tu as pu me donner.
Un immense merci à Aurélie L. pour ses conseils pleins de sagesse, son aide précieuse, son écoute et nos conversations (plus ou moins sérieuses 😉). Puisses-tu trouver l'équilibre que tu recherches.
Merci à Amandine et Hafidha, pour votre disponibilité, votre gentillesse et votre aide, tant au labo qu'en dehors. Hafidha, merci d'avoir la même imagination débordante que moi et pour ces fous-rires qui en ont découlé. Amandine, merci pour ton énergie (inépuisable !), tes manips improbables à base de poussins bleus qui m'ont fait envisager la bio autrement et nos discussions scientifiques qui m'ont permis de prendre du recul. Sans vous deux tout aurait été beaucoup plus compliqué…

Merci à tous les stagiaires, petits et grands, biologistes et médecins, qui sont passés par le labo avec leur bonne humeur et leur énergie. Je voudrais remercier en particulier Aude et Adeline qui ont travaillé sur mon projet.
Safae, quoi qu'en dise François on ne parle pas trop…. On rattrape juste les périodes pendant lesquelles on ne se voit pas ! Merci, j'ai passé de super moments avec toi. Tu m'impressionnes par ta polyvalence, ton énergie et ta motivation. Je ne suis même pas sûre que tu dormes pour réussir à faire tout ce que tu fais !
Alexandre, merci pour ta patience et ton soutien pendant ma rédaction. J'admire le calme avec lequel tu as supporté mes pétages de câbles ! Merci aussi pour tes blagues, raffinées, comme je les aime 😊.
Merci à Maxime pour tes visites au 2ème qui m'ont si souvent remonté le moral
J'adresse également mes remerciements aux statutaires Fabrice, Danièle et Marie-Hélène pour leur gentillesse.
Enfin, aux trois « petits » nouveaux, Camille, Axel et Eric, je vous souhaite bon courage. Ça ne va pas être facile, mais c'est vraiment une expérience enrichissante.
Merci à Ana, si discrète mais indispensable au bon fonctionnement du labo, je te souhaite beaucoup de bonheur et l'épanouissement, tant au niveau personnel que professionnel.

Merci à Claire Carrion de m'avoir initiée à la microscopie confocale.
Merci à Bertrand Courtioux pour son écoute, son aide et sa disponibilité.
Merci à Adeline Rigaud qui s'occupe si bien de nous.

Je tiens également à remercier mes maitres de stage de M1 et de M2 qui m'ont fait découvrir le monde merveilleux de la recherche.

BY-NC-ND

Une pensée pour mes Nantais, Germain, Pauline et Clément, il est bien loin le temps du lycée, on en a fait du chemin ! Merci à vous pour toutes ces années, même si vous n'êtes pas à coté de moi pour cette étape je sais que vous pensez à moi et je vous remercie pour tout ce soutien ♥.

Maela, depuis 9 ans maintenant, bien que quelques 1000 km (+/- 1000 autres km) nous aient séparées et malgré nos emplois du temps de ministres, tu as toujours été un soutien indéfectible, dans les bons comme dans les mauvais moments. Je vais te devoir quelques années de merci ! Mais bon ça y est, c'est fait, Docteure & Docteure !

Pour finir je voudrais remercier ma famille, mes parents, pour leur soutien et pour m'avoir donné les moyens de faire ce que j'aime. A ma petite sœur, maintenant grande et indépendante, tu as su trouver ta voie, je suis fière de toi. Et enfin, à mes grands-parents, qui m'ont toujours soutenue, j'aurais aimé que vous puissiez tous voir cet aboutissement, merci à vous ♥

BY-NC-ND

Droits d’auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : *http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/*

BY-NC-ND

Sommaire

Remerciements 9
Droits d'auteurs 13
Sommaire 15
Table des Figures 19
Table des Tableaux 21
Liste des Abréviations 23
Préambule 27
Introduction 33
Chapitre I. Le Gliome 35
I.1. Généralités 35
I.1.1. Le cancer 35
I.1.2. Les gliomes 36
I.1.3. Les cellules du système nerveux central 37
I.1.4. Les différents types de tumeurs du système nerveux central 38
I.2. Les glioblastomes 40
I.2.1. Les différents sous-types 40
I.2.2. Histologie 43
I.3. Hypoxie 44
I.4. Traitements et résistance 47
I.4.1. Traitements 47
I.4.2. Résistance 49
I.5. Les cellules souches cancéreuses 51
I.5.1. Hétérogénéité des tumeurs 51
I.5.2. Modèle stochastique VS modèle hiérarchique 51
I.5.3. Caractéristiques des cellules souches cancéreuses 53
I.5.4. Marqueurs de cellules souches 55
I.5.5. Thérapies ciblant les CSC 59
Chapitre II. L'autophagie 61
II.1. Les différents types d'autophagie 62
II.1.1. Micro-autophagie 62
II.1.2. Autophagie médiée par les chaperonnes 62
II.1.3. Macro-autophagie 62
II.2. Mécanisme de la macro-autophagie 63
II.3. Régulation de l'autophagie 69
II.3.1. La protéine kinase AMP-dépendante (AMPK) 70
II.3.2. mTOR 70
II.3.3. Autres régulateurs 72
II.3.4. Modulation pharmacologique 73
II.4. Autophagie et cancer 74
Chapitre III. Les Neurotrophines 75
III.1. Généralités 75
III.2. Les récepteurs aux neurotrophines 75
III.2.1. Structure générale 76

BY-NC-ND

III.2.2. Les différents récepteurs 79
III.3. Signalisation 81
III.3.1. Signalisation Trk 81
III.3.2. Signalisation $p75^{NTR}$ 83
III.4. Neurotrophines et cancer 84
Matériel et Méthodes 85
Chapitre I. Culture cellulaire 87
I.1. Modèle cellulaire 87
I.1.1. Conditions de culture 87
I.1.2. Transfection.....87
I.2. Traitements 89
I.2.1. Incubation avec le témozolomide.....89
I.2.2. Test de cytotoxicité XTT 89
I.3. Tri cellulaire 89
Chapitre II. Tests fonctionnels 91
II.1. Test de prolifération BrdU 91
II.2. Détection des nucléosomes solubles par ELISA Cell Death..... 91
II.3. Formation de colonies..... 92
Chapitre III. Etude Transcriptomique par RT-PCR quantitative..... 93
III.1. Extraction des ARN totaux 93
III.2. Reverse Transcription 93
III.3. PCR quantitative (qPCR) 94
III.4. Analyse des résultats 95
Chapitre IV. Etude protéomique 96
IV.1. Western Blot 96
IV.1.1. Extraction des protéines.....96
IV.1.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide et transfert sur membrane 97
IV.1.3. Saturation de la membrane et incubation avec les anticorps.....97
IV.1.4. . Révélation par chimioluminescence 98
Chapitre V. Immunofluorescence Indirecte (IFI)..... 99
Chapitre VI. Analyses statistiques 100
Objectifs 101
Résultats 105
Chapitre I. Place de l'autophagie et de la signalisation TrkC dans la survie des cellules de GBM..... 107
I.1. L'autophagie et la signalisation passant par TrkC et NT3 s'associent pour favoriser la survie des cellules de GBM..... 107
I.2. Travaux complémentaires..... 131
I.2.1. Validation/mise en place des modèles.....131
I.2.2. Inhibition de l'autophagie et de TrkC : effets à long terme 135
Chapitre II. Autophagie, signalisation TrkC et cellules souches cancéreuses dans le GBM147
II.1. Etude de la population cellulaire totale..... 147
II.1.1. Effet de l'inhibition de l'autophagie sur les cellules souches cancéreuses : 147
II.1.2. Effet de l'inhibition de la signalisation TrkC sur les cellules souches cancéreuses 154

BY-NC-ND

II.2. Autophagie, signalisation TrkC et cellules souches cancéreuses : étude sur les populations triées 158
II.2.1. Effet de l'inhibition de l'autophagie sur les caractéristiques associées aux CSC 159
II.2.2. Effet de l'inhibition de la signalisation TrkC sur les caractéristiques associées aux CSC 165
Discussion 171
Conclusion générale 183
Références bibliographiques 187

BY-NC-ND

BY-NC-ND

Table des Figures

Figure 1 : Caractéristiques des cellules tumorales 36
Figure 2 : Classification 2016 des tumeurs cérébrales selon l'OMS 40
Figure 3 : Caractéristiques moléculaires et phénotypiques du GBM. 44
Figure 4 : Régulation d'HIF-1α 46
Figure 5 : Protocole du traitement de « routine » du GBM 48
Figure 6 : Modèle stochastique vs modèle des cellules souches 53
Figure 7 : Rôle de LGR5 dans la voie Wnt 58
Figure 8 : Sélection des CSC par les traitements 60
Figure 9 : Les différentes formes d'autophagie 61
Figure 10 : Place de l'autophagie en conditions physiologiques et en cas de dérégulation.. 63
Figure 11 : Les grandes étapes de l'autophagie 66
Figure 13 : Régulation de l'autophagie 70
Figure 14 : Régulation de la signalisation des complexes mTORC1 et mTORC2 72
Figure 14 : Structure et dimérisation des récepteurs aux neurotrophines 78
Figure 15 : Voies de signalisation des neurotrophines 83
Figure 17 : Hybridation in situ pour la détection d'une amplification du gène codant pour l'EGFR 108
Figure 18 : Vérification de l'extinction de l'expression des protéines Beclin1 et Atg5 132
Figure 19 : Expression des deux formes LC3I et II 133
Figure 20 : Expression relative de TrkC entier (Full Lenght -FL) et TrkC Tronqué (Tr)..... 134
Figure 21 : Expression de la protéine p38-MAPK et de sa forme phosphorylée. 135
Figure 22 : Etude de l'expression des deux formes LC3I et II 136
Figure 23 : Etude des transcrits des récepteurs aux neurotrophines TrkC (forme totale et tronquée) et de la neurotrophine NT3 137
Figure 24 : Etude des transcrits du récepteur aux neurotrophines $p75^{NTR}$ et du récepteur à la neurotensine, la sortiline. 138
Figure 25 : Etude de l'expression de TrkC FL, TrkC Tr et NT3. 139
Figure 26 : Marquage par immunofluorescence de TrkC et de la sortiline 141
Figure 27 : Expression et activation de p38-MAPK, ERK et Akt 143
Figure 28 : Expression de l'EGFR 145
Figure 29 : Impact de l'inhibition de l'autophagie sur la prolifération cellulaire. 147
Figure 30 : Impact de l'inhibition de l'autophagie sur la capacité clonale des cellules. 148
Figure 31 : Cytotoxicité de différentes doses de Témozolomide 150

BY-NC-ND

Figure 32 : Impact de l'inhibition de l'autophagie sur la résistance des cellules au Témozolomide. ……...151

Figure 33 : Effet de l'inhibition de l'autophagie sur l'expression de marqueurs des CSC. .. 153

Figure 34 : Impact de l'inhibition du récepteur TrkC sur la prolifération cellulaire..... 154

Figure 35 : Impact de l'inhibition de la signalisation TrkC sur la capacité clonale des cellules. 155

Figure 36 : Impact de l'inhibition de la signalisation TrkC sur la résistance des cellules au Témozolomide..... 156

Figure 38 : Fractogramme obtenu avec les U87-MG, U87-pLKO , U87-shBeclin1 et U87-shTrkC 159

Figure 39 : Fractogramme obtenu avec les U87-MG, U87-pLKO, U87-shBeclin1 160

Figure 40 : Impact de l'inhibition de l'autophagie sur la capacité clonale des cellules des différentes fractions. 162

Figure 41 : Impact de l'inhibition de l'autophagie sur la résistance des cellules des différentes fractions au Témozolomide..... 163

Figure 42 : Impact de l'inhibition de l'autophagie sur l'expression des marqueurs de CSC après tri par SdFFF. 164

Figure 43 : Fractogramme obtenu avec les U87-MG, U87-pLKO, U87-shTrkC..... 166

Figure 44 : Impact de l'inhibition de la signalisation TrkC sur la capacité clonale des cellules des différentes fractions. 167

Figure 45 : Impact de l'inhibition de la signalisation TrkC sur la résistance des cellules des différentes fractions au Témozolomide. 168

Figure 46 : Impact de l'inhibition de la signalisation TrkC sur l'expression de marqueurs des cellules souches après tri par SdFFF. 169

Figure 47 : Abondance des CSC dans le GBM en fonction de leur état d'activation et sélection du phénotype par l'inhibition de l'autophagie et de la signalisation TrkC..... 182

BY-NC-ND

Table des Tableaux

Tableau I : Caractéristiques des différents sous-types de GBM d'après le « Cancer Genome Atlas » 43

Tableau II : Gènes impliqués dans le processus autophagique chez les mammifères et équivalents chez la levure 65

Tableau III : Amorces et Sondes commerciales utilisées pour la qPCR 94

Tableau IV : références et séquences des amorces et sondes 95

Tableau V : Anticorps utilisés pour le Western Blot 98

Tableau VI : anticorps utilisés pour l'immunofluorescence 99

Tableau VII : Etat des principales mutations/altérations géniques dans les lignées de GBM étudiées 107

BY-NC-ND

BY-NC-ND

Liste des Abréviations

3MA = 3-MéthylAdénine

Ac = Anticorps
Act = Actine
ADN = Acide DésoxyriboNucléique
AKT ou **PKB** = protéine kinase B
AMP = Adénosine MonoPhosphate
AMPK = AMP-activated protein kinase
APC = Adenomatous Polyposis Coli
APS = Ammonium PerSulfate
ARNm = Acide RiboNucléique messager
ASCL1 = Achaete-scute family bHLH transcription factor 1
Ask-1 = Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1
ATCC = American Type Culture Collection
Atg = Autophagy Related Genes
ATP = Adenosine Tri-Phosphate

β-Cat = β-Caténine
BCL2L13 = BCL2-like 13
BCL2 = B-cell lymphoma 2
BCRP = Breast Cancer Resistance Protein
BDNF = Brain Derived Neurotrophic Factor
BMI1 = B lymphoma Mo-MLV Insertion region 1 homolog
BNIP3 = BCL2 Interacting Protein 3
BSA = Bovine Serum Albumin
BTIC = Brain Tumor Initiating Cells

CBP/300 = CREB-binding protein/p300
CCR = Cancer ColoRectal
CD44 = Cluster of differentiation 44
cdc42 = Cell Division Control Protein 42 Homolog
CDKN1A = cyclin dependent kinase inhibitor 1A
CHI3L1 = chitinase 3 like 1
c-JUN = Jun Proto-Oncogene
CKI = Casein Kinase 1
CQ = Chloroquine
CREB = cAMP response element binding protein
CRR = Cystein Rich Repeat
CSC = cellules souches cancéreuses
C-TAD = C-terminal Transactivation Domain

DAG = DiAcyl Glycérol
DAPI = 4’,6’-diamidino-2-phénylindole
DCX = doublecortin
DLBCL = Diffuse Large B Cells Lymphoma
DLL3 = delta like canonical Notch ligand 3
DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium
Dvl = Disheveled

ECL = Enhanced ChemiLuminescent
EDTA = Ethylène Diamine Tétraacétique Acide
EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor
ERK = Extracellular signal-regulated kinases

BY-NC-ND

GABRA1 = gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha1 subunit
GAPDH = Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
GBM = Glioblastome Multiple
Grb2 = Growth factor receptor-bound protein
GSK3 = Glycogen Synthase Kinase 3β

H = Hypoxie
HIF = Hypoxie Inducible Factor
HIF-1 = Hypoxia Inductible Factor 1
hIPSc = Human Induced Pluripotent Stem Cells
HRE = Hypoxia Response Element
HRP = Horse Radish Peroxydase

IDH = Isocitrate deshydrogenase
IFI = Immunofluorescence Indirecte
Ig = Immunoglobuline
IκB = Inhibitor of Kappa B
IKK = IκB Kinase
Ip3 = Inositol-1,4,5-triphosphate

JNK = c-Jun N-terminal Kinase
JNKK = Jnk-Activated Kinase

LAMP2 = Lysosomal-Associated Membrane Protein
LC3b = Light Chain 3 b
LGR5 = Leucine rich repeat containing G protein-coupled Receptor 5
LRR = Leucine-Rich Repeat

MAPK = Mitogen Associated Protein Kinase
MEK = MAP ERK Kinase
MET = MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
MGMT = 6-O-Méthylguanine-ADN méthyltransférase
MLV = Murine Leukemia Virus
mTOR = Mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1 = mammalian Target Of Rapamycin complex 1

N = Normoxie
NANOG = en référence à la mythologie celtique irlandaise Tír na nÓg ("la Terre de l'éternelle jeunesse")
NEFL = Neurofilament light
NES = Nestin
NF1 = Neurofibromatosis type 1
NFκB = Nuclear Factor Kappa B
NGF = Nerve Growth Factor
NIK = NF-kappa-B-Inducing Kinase
NKX2-2 = NK2 homeobox 2
NOS = Not Otherwise Specified
NT = **NTF** = Neurotrophine
NT3 = **NTF3** = Neurotrophine 3
NT4/5 = **NTF4/5** = Neurotrophine 4/5
NT6 = **NTF6** = Neurotrophine 6
NT7 = **NTF7** = Neurotrophine 7
N-TAD = Cluster de gènes NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2
NTR = Neurotrophin Receptor
NTRK = Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor

BY-NC-ND

Oct4 = Octamer-binding transcription factor
OLIG2 = oligodendrocyte transcription factor 2
OMS = Organisation Mondiale de la Santé

P38 = p38 MAP kinase
P75^{NTR} = p75 Neurotrophin Receptor
PAS = Phagophore Assembly Site
PBS = Phosphate buffered saline
PDGFRA = Platelet derived growth factor receptor alpha
PE = Phosphatidyl Ethanolamine
PFA = Paraformaldéhyde
P-gp = P-glycoprotéine
PI3K = Phosphatidyl-inositol kinase de type 3
PI3P = Phosphatidylinositol 3 Phosphate
PKA = Protéine Kinase A
PKC = Protéine Kinase C
PLC γ = Phospholipase C gamma
PTEN = Phosphatase and Tensin homolog
PVDF = Polyvinylidene difluoride
pVHL = von Hippel–Lindau tumor suppressor

Raf = Raf kinase
Ras = Ras GTPase activating protein
RE = Réticulum Endoplasmique
RhoA = Ras Homolog Gene Family, member A
RhoGDI = Rho GDP-Dissociation Inhibitors
ROS = Reactive Oxygen Species
Rubicon = RUN and cystein-rich domain containing beclin 1 interacting protein

SDS = Dodécylsulfate de sodium
SLC12A5 = Solute carrier family 12 member 5
SNC = Système Nerveux Central
SNP = Système Nerveux Périphérique
SOS = Son Of Sevenless
Sox2 = Sex determining region Y-box 2
SRC-1 = Steroid Receptor Coactivator-1
SVF = Serum de Veau Fœtal
SYT1 = Synaptotagmin 1

TBS = Tris Buffered Saline
TCF = T Cell Factor
TCF4 = Transcription factor 4
TIF2 = Transcriptional intermediary factor-2
TNF = Tumor Necrosis Factor
TP53 = Tumor protein p53
Trk = Tropomyosin Receptor Kinase
TrkC FL = TrkC full length
TrkC Tr = TrkC truncated

ULK1 = Unc-51 like autophagy activating kinase 1

VEGF = Vascular Epithelial Growth Factor
VPS = Vacuolar Protein Sorting

WT = Wild-Type

BY-NC-ND

Préambule

BY-NC-ND

Le cancer n'est pas une maladie nouvelle puisque des momies d'ancienne Egypte montrent des séquelles de tumeurs. Les premiers écrits relatant de cas de cancers remontent à cette période, vers 3000 av. J.-C., mais le terme « cancer » n'existe pas encore. Il faut attendre Hippocrate (460-370 av. J.-C.) qui donne à cette maladie le nom de *carcinos*, qui signifie crabe en Grec, en référence à sa forme. Galien utilisera plus tard le mot *oncos*, qui signifie « grosseur », pour désigner les tumeurs. A travers les âges les connaissances se sont étoffées, différentes techniques de traitements ont été mises en œuvre, les onguents, saignées, purges, excision et cautérisation. Cependant un paramètre est resté constant, la faible efficacité de ces traitements (Early History of Cancer | American Cancer Society).

Le cancer se caractérise par une prolifération incontrôlée des cellules résultant d'un échappement aux mécanismes de contrôle assurant la régulation du développement. Les cellules tumorales se développent de façon anarchique jusqu'à former une masse, qui va envahir l'organe dans lequel elle se trouve, plus ou moins rapidement. La rapidité de croissance de la tumeur fait que la vascularisation de celle-ci n'aura pas le temps de se mettre en place correctement, ce qui entraine un défaut d'apport en nutriments et en oxygène au cœur de la tumeur.

Le cancer représente aujourd'hui la première cause de mortalité en France (environ 30% des décès) et en Europe de l'Ouest (Ligue contre le cancer | Association de lutte contre le Cancer). Grâce aux avancées de la science il est aujourd'hui possible de caractériser plus précisément les tumeurs, notamment à l'aide de marqueurs moléculaires, ce qui permet aux traitements, chimiothérapie, radiothérapie, immunothérapie, d'être de plus en plus personnalisés, afin de s'adapter au mieux et d'être le plus efficace possible. Mais, bien que 60% des cancers soient curables, il en reste pour lesquels les traitements restent peu, voire pas, efficaces. C'est le cas notamment des gliomes, et plus particulièrement du gliome de grade IV, le glioblastome.

Le glioblastome multiforme (GBM) est un cancer très agressif et résistant aux traitements, du fait de ses capacités d'adaptation, moins de 10% des patients survivent plus de 5 ans et la récidive est quasi systématique. Il est caractérisé par un microenvironnement fortement hypoxique, dû à une croissance rapide empêchant la vascularisation du centre de la tumeur. Afin de survivre à ces conditions pauvres en oxygènes, les cellules tumorales détournent et amplifient un mécanisme physiologique de recyclage, l'autophagie. En conditions physiologiques, en réponses à différents types de stress, dont l'hypoxie, elle permet le recyclage de protéines (notamment à durée de vie longue) et d'organites défectueux ou obsolètes. Les cellules tumorales utilisent ce système afin d'éliminer les éléments toxiques, qui pourraient nuire à leur survie, qui leur confère également une indépendance vis-à-vis des

BY-NC-ND

apports extérieurs en recyclant leurs constituants. En plus de la protection des cellules tumorales contre les processus de mort cellulaire, induits par la carence en oxygène, l'autophagie participe également à la résistance aux traitements.

Des travaux récents du laboratoire (auxquels j'ai participé) ont mis en évidence qu'un autre mécanisme, en plus de l'autophagie, est particulièrement impliqué dans la résistance des cellules tumorales, il s'agit de la signalisation neurotrophique passant par TrkC/NT3 (Jawhari et al., 2017). Ces travaux ont montré que l'hypoxie active l'autophagie, mais également la signalisation par la voie TrkC/NT3. De plus, l'activation de la voie neurotrophique est potentialisée lorsque l'autophagie est inhibée, ce qui suggère une complémentarité entre ces deux mécanismes pour assurer la survie de la cellule. C'est pourquoi la double inhibition, de l'autophagie et de la voie TrkC, est nécessaire pour amener les cellules de GBM à entrer en apoptose en conditions hypoxiques.

Les neurotrophines (NGF, BDNF, NT3, NT4/5) sont des facteurs de croissance spécifiques du système nerveux central. Elles se fixent à trois récepteurs de type tyrosine kinase (TrkA, TrkB et TrkC) ou à un récepteur de la famille des *tumor necrosis receptor* ($p75^{NTR}$), et activent des voies de signalisation impliquées dans divers processus neuronaux tels que la survie cellulaire, la différenciation, la croissance et l'arborisation axonale et dendritique, la formation et la plasticité synaptique. Elles sont un thème d'étude majeur de l'équipe EA3842, pour leur rôle dans différents modèles de cancer (Akil et al., 2011 ; Dubanet et al., 2015; De la Cruz-Morcillo et al., 2016; Mazouffre et al., 2017).

Le rôle des neurotrophines dans la biologie et la progression du cancer a déjà été mis en évidence. Il a particulièrement été montré dans la littérature que l'autophagie et la signalisation des neurotrophines sont associées au phénotype des cellules souches cancéreuses (CSC). Or les cellules souches cancéreuses représentent également un paramètre majeur pour l'agressivité de la tumeur. Bien qu'elles ne soient présentes qu'en faible proportion sur l'ensemble de la tumeur, les CSC jouent tout de même un rôle important dans la progression, la résistance et la récidive du cancer. Elles sont en effet capables de s'auto-renouveler, ce qui maintient le pool de cellules tumorales, elles sont résistantes aux traitements, notamment grâce à leur activité autophagique intense, et sont capables de reformer une tumeur. De plus, les CSC peuvent se trouver dans différents états, selon les conditions notamment du microenvironnement, elles peuvent être plutôt activées, ou plutôt quiescentes. En fonction de cet état, elles n'auront pas le même comportement, ni les mêmes capacités fonctionnelles.

BY-NC-ND

Ma thèse reprend deux thématiques principales du laboratoire, le rôle des neurotrophines et de l'autophagie dans la survie et l'agressivité des cellules cancéreuses. L'objectif était de comprendre comment les cellules de GBM résistent au stress de l'hypoxie et des traitements, quel est l'impact des processus neurotrophique et autophagique et quel rôle jouent les CSC dans cette résistance.

BY-NC-ND

Introduction

BY-NC-ND

Chapitre I. Le Gliome

I.1. Généralités

I.1.1. Le cancer

Le cancer est caractérisé par une prolifération anarchique des cellules, résultant d'un échappement aux mécanismes de contrôle qui en assurent normalement la régulation. Dans le cas des cancers solides, les cellules tumorales se développent de façon incontrôlée jusqu'à former une masse qui va envahir l'organe dans lequel elles se trouvent, plus ou moins rapidement.

Le cancer n'est jamais le résultat d'un évènement unique, plusieurs facteurs se combinent pour provoquer la transformation des cellules. Ces facteurs peuvent être de différents types : **externes**, liés à l'environnement (tabac, UV, particules ou pathogènes), ou **internes**, résultants d'une évolution normale mais qui fragilise les cellules, associés de manière large au vieillissement. Il existe également des prédispositions d'ordre génétique, passant par la transmission d'une mutation héréditaire qui va favoriser le risque de développer un cancer (Institut National du Cancer).

La transformation des cellules peut survenir par la mutation de gènes particuliers. Il en existe deux sortes, les proto-oncogènes, qui deviennent alors des oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Les oncogènes sont capables d'induire la transformation des cellules normales en cellules tumorales en favorisant la croissance, la survie et la division. Ils ont été découverts dans les années 1970 (Stehelin et al., 1976). Les gènes suppresseurs de tumeurs on pour rôle de limiter la croissance cellulaire. Leur mutation conduit à leur inactivation, ce qui entraine une prolifération abérrante et illimitée des cellules tumorales (Lee and Muller, 2010; Yeo, 1999).

Grâce aux avancées de la science, il est aujourd'hui possible de caractériser plus précisément les tumeurs, notamment à l'aide marqueurs moléculaires. Cette caractérisation permet aux traitements par chimiothérapie, radiothérapie ou immunothérapie, d'être de plus en plus personnalisés, afin de s'adapter au mieux à chaque profil et d'être ainsi le plus efficaces possible. Mais, bien que 60% des cancers soient curables, il en reste pour lesquels les traitements restent peu, voire pas, efficaces (Ligue contre le cancer).

La tumorigenèse, ou transformation d'une cellule saine en une cellule tumorale, est un processus qui se fait en plusieurs étapes. Dans les années 2000, Hanahan et Weinberg ont listé 6 caractéristiques fondamentales des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2000),

BY-NC-ND

qu'ils ont complété quelques années plus tard (Hanahan and Weinberg, 2011). Ces paramètres caractéristiques des cancers sont les suivants (figure 1) :

- L'autosuffisance en signaux prolifératifs
- L'insensibilité aux inhibiteurs de croissance
- L'échappement au système immunitaire
- La réplication à l'infini
- La promotion de l'inflammation
- L'invasion et les métastases
- L'induction de l'angiogénèse
- L'instabilité génomique et les mutations
- La résistance à la mort cellulaire
- La perturbation de l'équilibre énergétique

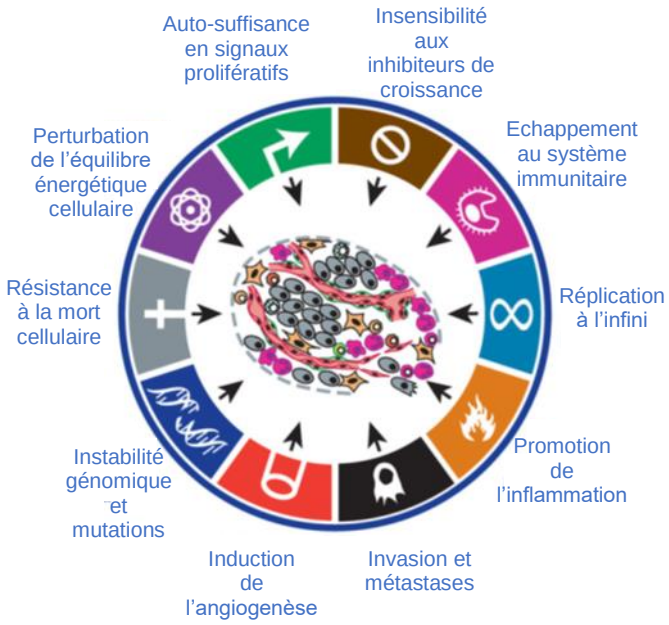


Figure 1 : Caractéristiques des cellules tumorales
D'après (Hanahan and Weinberg, 2011) Cette liste des caractéristiques fondamentales du cancer permet de mieux le définir et de « prévoir » l'évolution de la maladie.

I.1.2. Les gliomes

Les gliomes sont des tumeurs du système nerveux central (SNC), issues des cellules gliales, le plus fréquemment des astrocytes (80 à 85% des gliomes) qui représentent 40 à 50% des cellules gliales, ce qui en fait la population la plus abondante (Zeng et al., 2015). Avant de décrire ce type de tumeur, nous allons définir les différents types cellulaires constitutifs du système nerveux central.

BY-NC-ND

I.1.3. Les cellules du système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) est constitué de deux grandes familles de cellules : les cellules nerveuses et les cellules gliales, ayant chacune un rôle précis.

- Les cellules nerveuses ou neurones sont des cellules hautement différenciées et très spécialisées dans la perception et le contrôle de l'ensemble des fonctions physiologiques. Elles sont capables de communiquer à distance via des signaux électriques et chimiques afin de répondre aux stimuli reçus. Les neurones peuvent communiquer entre eux, mais également avec d'autres cellules effectrices, comme par exemple les cellules musculaires. Un encéphale humain adulte contient environ 100 milliards de neurones, formant des structures complexes appelées circuits neuronaux. Ces circuits sont constitués de neurones afférents, qui véhiculent l'information de la périphérie vers le SNC, et de neurones efférents, qui véhiculent l'information du SNC vers la périphérie. Il existe également des interneurones impliqués dans les communications de courte distance (Ciceri and Dehorter, 2014). Les circuits neuronaux peuvent se combiner en systèmes plus complexes et plus vastes, comme ceux qui forment par exemple le système visuel et le système auditif.

- Les cellules gliales, initialement considérées comme des cellules de soutien, représentent environ 50% des cellules du cerveau. Elles participent indirectement à la transmission des signaux en assurant l'homéostasie de l'environnement des neurones et interviennent dans la formation du système nerveux, la plasticité, le maintien des circuits neuronaux. Elles sont indispensables au bon fonctionnement et à la survie des neurones (Allen and Barres, 2009). Ces cellules ont des morphologies, des localisations et des fonctions différentes et peuvent ainsi être classées selon ces critères (Zhang, 2001). Elles sont divisées en deux grandes familles, la macroglie, qui comprend les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules épendymaires, et la microglie qui désigne des macrophages spécialisés (Nishiyama et al., 2009).

Les astrocytes doivent leur nom à leur forme d'étoile due à la présence de prolongements appelés dendrites. Il s'agit du type cellulaire le plus abondant dans la plupart des zones du cerveau où ils comblent l'espace entre les neurones (Nedergaard et al., 2003). Bien que leur rôle soit peu connu, leur fonction principale est de maintenir les conditions optimales de l'environnement chimique des neurones pour assurer une production correcte de signaux électriques. Pour cela, les astrocytes forment une enveloppe autour des jonctions synaptiques pour limiter la diffusion des neurotransmetteurs libérés au niveau des synapses. En plus de cette régulation de l'accessibilité des neurotransmetteurs synaptiques, ils vont également participer au contrôle de la concentration extracellulaire de différentes molécules qui pourraient nuire au bon fonctionnement des neurones, notamment la concentration en ions potassium. Ils sont incapables de produire des signaux électriques, mais expriment des

BY-NC-ND

récepteurs membranaires à certains neurotransmetteurs et sont aussi capables d'en libérer (Ullian et al., 2001). L'implication des astrocytes dans la formation et la régulation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) est actuellement sujet à controverse, de nouvelles études semblent nécessaires pour confirmer ou infirmer cette théorie (Sofroniew and Vinters, 2010). Les astrocytes, comme les oligodendrocytes, sont issus de progéniteurs neuroépithéliaux (Rowitch and Kriegstein, 2010).

Parmi les cellules de la macroglie, on trouve également des oligodendrocytes, dont le rôle est de produire la gaine de myéline entourant certains neurones. Leur équivalent dans le système nerveux périphérique (SNP) sont les cellules de Schwann (Zuchero and Barres, 2015).

Le troisième type cellulaire constituant la macroglie sont les cellules épendymaires. Ce sont des cellules ciliées qui tapissent les cavités ventriculaires du SNC. Ces cellules sécrètent le liquide céphalo-rachidien et assurent sa circulation grâce à leurs cils (Del Bigio, 2010).

Contrairement à la macroglie, qui est d'origine ectodermique (Hafidi and Galifianakis, 2003), la microglie est d'origine mésodermique. Elle est constituée par les macrophages résidents du SNC, qui assurent une fonction de sentinelle pour l'immunité innée (Saijo et al., 2013). Cette population cellulaire participe également à l'homéostasie et joue un rôle important dans l'expansion neuronale, la différenciation et la mise en place des circuits synaptiques pendant la période périnatale. La réponse de la microglie est finement régulée car le moindre changement de l'environnement cérébral entraine son activation, ce qui peut avoir des effets dramatiques (Ginhoux and Prinz, 2015). En effet, une mauvaise régulation de l'activation de la microglie peut conduire à des maladies neuro-dégénératives (Walker and Lue, 2015).

Chacun de ces types cellulaires peut potentiellement donner naissance à une tumeur. Ces tumeurs présenteront les caractéristiques de leurs cellules d'origine ce qui permet de les classifier.

I.1.4. Les différents types de tumeurs du système nerveux central

La précédente classification des tumeurs du système nerveux central (SNC) de l'organisation mondiale de la santé (OMS) se basait sur l'observation microscopique des tumeurs, notamment les caractéristiques histologiques (Louis et al., 2007). En 2016, cette classification a été complétée par l'ajout des caractéristiques génotypiques (Figure 2) (Louis et al., 2016). Les tumeurs du SNC sont classées selon le tissu affecté, puis en fonction des particularités phénotypiques et génotypiques et de leur agressivité, traduites par le grade. Ainsi, parmi les tumeurs astrocytaires et oligodendrogliales diffuses ont été identifiés :

BY-NC-ND

- Les astrocytomes diffus ou anaplasiques, *IDH*-mutants, de grade II et III respectivement. Le gène *IDH* code pour l'isocitrate deshydrogenase qui participe au cycle de Krebs et à la protection des cellules contre le stress oxydatif (Paul et al., 2017; Reitman et al., 2010; Ward et al., 2010). Elle est également importante pour la croissance cellulaire car elle intervient dans la production de NAPDH qui est nécessaire à la synthèse lipidique et nucléotidique (DeBerardinis et al., 2007).
- Les glioblastomes *IDH*-mutant ou non, de grade IV
- Le gliome médian diffus, H3 *K27M*-mutant, de grade IV (cette mutation concerne l'histone H3 (Meyronet et al., 2017)
- L'oligodendrogliome, *IDH*-mutant codélétés 1q/19q, de grade II
- L'oligodendrogliome anaplasique, *IDH*-mutant codélétés 1q/19q, de grade III

La classification de 2007 comptait également les oligo-astrocytomes, terme aujourd'hui désuet puisqu'il est en général possible de différencier clairement les astrocytomes et les oligodendrogliomes par des marqueurs génétiques. Il reste cependant certains cas pour lesquels le diagnostic oligoastrocytome reste utilisé, notamment lorsque les marqueurs génétiques manquent pour orienter vers l'un ou l'autre des sous-types. Les tumeurs sont alors identifiées comme NOS (*not otherwise specified*). Ce terme est utilisé pour les tumeurs présentant des caractéristiques ne permettant pas de les classer dans un groupe, ou pour celles dont les analyses n'ont pas été assez poussées pour identifier le groupe auquel elles appartiennent. NOS ne représente cependant pas une catégorie (figure 2) (Louis et al., 2016). Bien que très rares, des oligoastrocytomes « vrais » ont été observés ; dans ce cas, la tumeur présente à la fois les marqueurs d'un oligodendrogliome et d'un astrocytome (Huse et al., 2015).

BY-NC-ND

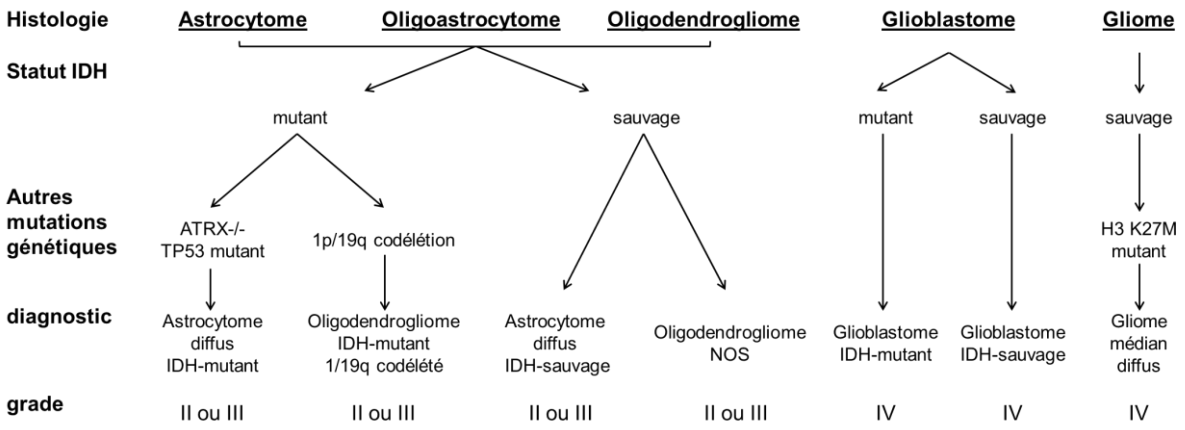


Figure 2 : Classification 2016 des tumeurs cérébrales selon l'OMS
D'après (Louis et al., 2016). Cette classification basée sur l'histologie et le statut mutationnel a été établie pour améliorer la précision du diagnostic de façon à prédire plus efficacement la réponse au traitement et le pronostic.

Parmi ces tumeurs du SNC nous nous sommes plus particulièrement intéressés au glioblastome, qui représente la tumeur la plus agressive parmi les gliomes (grade IV).

I.2. Les glioblastomes

Les gliomes représentent 40 à 50% des tumeurs cérébrales primaires (Rigau et al., 2011) et, parmi elles, les glioblastomes (GBMs), gliomes de haut grade, donc très agressifs, représentent 1 tumeur sur 2, ce qui en fait la tumeur cérébrale primaire la plus fréquente chez l'adulte. Leur incidence est de moins de 5 cas pour 100 000 habitants en 2015 (Thakkar et al., 2014). La moyenne de survie avec traitement est de 12 à 18 mois et moins de 10% des patients survivent au-delà de 5 ans. C'est la 2ème cause de mort par cancer chez l'enfant, après la leucémie. Les symptômes résultent de la pression de la tumeur sur les tissus environnants et de l'inflammation du tissu cérébral qui va provoquer un œdème. Ils se manifestent principalement par une hypertension intracrânienne. Elle peut être associée à d'autres symptômes comme des nausées, vomissements, céphalées, troubles du comportement ou de la vision, perte de mémoire et parfois des crises d'épilepsie. Ils varient en fonction de la localisation de la tumeur.

I.2.1. Les différents sous-types

Tous les GBM ne sont pas identiques, il en existe plusieurs sortes, présentant différentes caractéristiques. Mais, du fait de la complexité de leur structure, due à l'hétérogénéité de leur composition, ils sont très difficiles à distinguer. C'est pourquoi dans un

BY-NC-ND

souci de clarification, plusieurs « sous-classifications » ont été mises en place, se basant sur différents marqueurs moléculaires.

La première classification est basée sur l'expression du gène *IDH1* qui code l'isocitrate deshydrogenase (IDH). Le statut *IDH1* permet de diviser les glioblastomes en trois groupes :

- Le glioblastome *IDH1*-wild type, il représente 90% des cas. Il s'agit d'un glioblastome primaire ou *de novo*, prédominant chez les patients de plus de 55 ans.
- Le glioblastome *IDH1*-muté, représente 10% des cas. Il s'agit d'un glioblastome secondaire, récidive d'un gliome diffus de bas grade, principalement observé chez des sujets jeunes (Ohgaki and Kleihues, 2013).
- Le glioblastome NOS (not otherwise specified), concerne les tumeurs pour lesquelles le statut *IDH1* ne peut pas être déterminé (Louis et al., 2016).

Il semblerait que la mutation *IDH1* soit inversement corrélée avec le grade du gliome. Cependant, pour la plupart des récidives, le gène est muté, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que les GBM récidivants sont issus de gliomes de bas grade (Paul et al., 2017).

Une deuxième caractérisation des sous-types de GBM a été édicté par le « Cancer Genome Atlas » tenant compte également des variations d'expression génique. Quatre sous-types ont été identifiés : Classique, Mésenchymateux, Proneural et Neural (Tableau I) (Kwon et al., 2015).

Sous-type	Caractéristiques
Classique	- Amplification du chromosome 7 (trisomie ou polysomie 7) ou 7q, associée à une perte du chromosome 10 - Forte augmentation de l'expression de l'*EGFR* (*Epidermal Growth Factor*) et altérations du gène conduisant à des mutations de la protéine - Pas de mutation de *TP53* (*tumor protein p53*), gène suppresseur de tumeur, qui sont pourtant fréquentes dans les GBM (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008) - Forte surexpression des marqueurs de précurseurs neuraux et de cellules souches tels que NES (*nestin*), Notch et les acteurs de la voie Sonic hedgehog
Mésenchymateux	- Diminution de l'expression du gène suppresseur de tumeur *NF1* (*Neurofibromatosis type 1*), qui peut également être parfois muté, en association ou non, à une mutation de *PTEN* (*Phosphatase and Tensin homolog*) - Expression de marqueurs astrocytaires

BY-NC-ND

	- Expression de marqueurs mésenchymateux tels que *CHI3L1* (*chitinase 3 like 1*) et/ou *MET* (*Hepatocyte growth factor receptor, proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*) (Phillips et al., 2006) qui traduisent l'apparition de processus de transition épithélio-mésenchymateuse, associée à une dédifférenciation des cellules (Thiery, 2002) - Augmentation de l'expression des gènes de la super-famille des Tumor Necrosis Factor (*TNF*) et de la voie NFκB, probablement due à un fort taux de nécrose et d'inflammation associée.
Proneural	- Altération du gène *PDGFRA* (P*latelet Derived Growth Factor Receptor Alpha*), se traduisant par des mutations et une surexpression du gène, et des mutations d'*IDH1* - Fréquentes mutations de *TP53* (30-35%) (Liu et al., 2016; Olivier et al., 2010) et perte d'hétérozygotie (47-54%) (Fujisawa et al., 2000) - Amplification du chromosome 7, associée à une perte du chromosome 10, caractéristique du sous-type Classique, est également observée dans la moitié des glioblastomes de sous-type Proneural - Surexpression d''autres gènes du développement oligodendrocytique, comme *NKX2-2* (*NK2 homeobox 2*) et *OLIG2* (*oligodendrocyte transcription factor 2*) (Noble et al., 2004). OLIG2 est capable de réguler l'expression du gène *CDKN1A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 1A*), codant la protéine p21 suppresseur de tumeur, entrainant une augmentation de la prolifération et une sous-expression du gène *CDKN1A* (Ligon et al., 2007). - Expression de gènes associés au développement proneural, comme *SOX2* (*sex determining region Y-box 2*), *DCX* (*doublecortin*), *DLL3* (*delta like canonical Notch ligand 3*), *ASCL1* (*achaete-scute family bHLH transcription factor 1*) et *TCF4* (*transcription factor 4*)
Neural	- Expression de marqueurs neuraux comme *NEFL* (*neurofilament light*), *GABRA1* (*gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha1 subunit*), *SYT1* (*synaptotagmin 1*) et

BY-NC-ND

	SLC12A5 (*solute carrier family 12 member 5*) (Verhaak et al., 2010).

Tableau I : Caractéristiques des différents sous-types de GBM d'après le « Cancer Genome Atlas »

Les GBM issus de récidives ont également été divisés en deux sous-groupes. En cas de récidive, les cellules peuvent avoir un comportement différent de la tumeur primaire, particulièrement en ce qui concerne la résistance au traitement par le Témozolomide (agent alkylant de l'ADN qui va entrainer la méthylation de la guanine en position O6, entre autres, et conduire à une réparation aberrante (Kohsaka and Tanaka, 2013). En effet, il y a deux sous-types de reprogrammation transcriptonnelle au cours de la récidive du glioblastome, soit deux mécanismes qui pourraient être impliqués dans la résistance à la chimiothérapie. Le premier, concerne les tumeurs de type G1, qui expriment des gènes impliqués dans le phénotype souche, l'auto-renouvellement et dans la réparation de l'ADN, notamment les gènes *HOX*, *ES1*, *CDK et AURKA/B*. Les tumeurs primaires desquelles sont issues les récidives de type G1 expriment déjà ces gènes, ce qui montre que les traitements et la progression de la maladie n'entrainent pas de modification de l'expression ou de mutation de ces gènes. Le second concerne les tumeurs de type G2, qui acquièrent l'expression de gènes menant à un phénotype proche de celui des neurones. Contrairement au type G1, ces cellules ont un profil d'expression génique différent de la tumeur primaire. Parmi les gènes dont l'expression est modifiée se trouvent *MGMT* (*O6-methylguanine methyl transferase*) et *MSH6* (*mutS homolog 6*). Les cellules activent l'expression de *MGMT*, qui va retirer le groupement methyl et ainsi assurer l'intégrité de l'ADN (Kitange et al., 2009), mais perdent celle de *MSH6*, un gène du système MMR (Mismatch Repair system) (Kwon et al., 2015).

Ces caractérisations se complètent pour définir au mieux les GBM et permettent d'avoir une meilleure vue d'ensemble de la tumeur et ont également une valeur prédictive de la résistance aux traitements et des récidives.

I.2.2. Histologie

Il a été montré que les glioblastomes sont construits sur un modèle concentrique à 3 couches (figure 3) (Persano et al., 2011). La couche la plus interne, appelée cœur ou couche nécrotique, est composée de cellules qui prolifèrent lentement, de phénotype souche, dans un environnement fortement hypoxique. Vient ensuite la couche intermédiaire, constituée de cellules fortement proliférantes, de phénotypes divers, dans un environnement légèrement hypoxique. Et enfin, la couche la plus externe, vascularisée, est constituée de cellules différenciées, très peu proliférantes, dans un environnement normoxique (Persano et al., 2011). D'après ce modèle de niche, il existe une corrélation entre le gradient hypoxique, le

BY-NC-ND

phénotype des cellules tumorales et la résistance de ces cellules à la chimiothérapie (Pistollato et al., 2010).

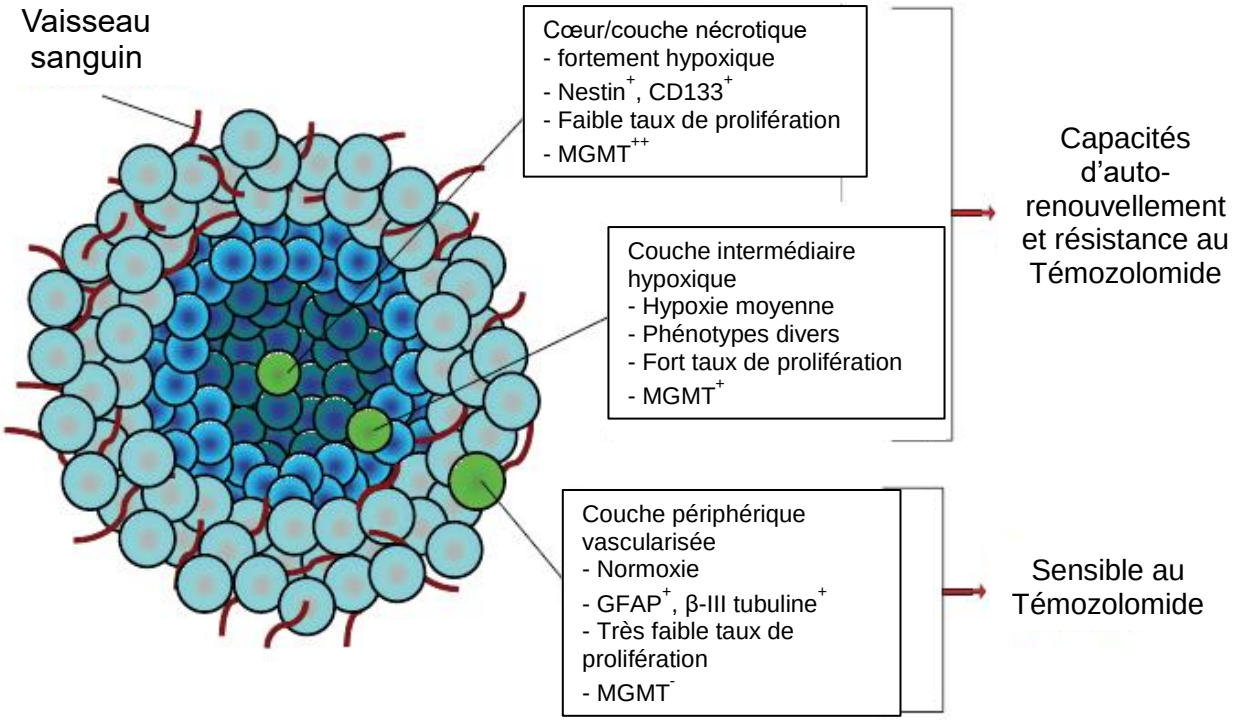


Figure 3 : Caractéristiques moléculaires et phénotypiques du GBM.
D'après (Persano et al., 2011) Le GBM forme une masse constituée de couches concentriques avec un gradient de disponibilité en oxygène, le cœur étant hypoxique et la périphérie normoxique. En fonction du niveau d'oxygène, différents types de cellules se développent dans chaque couche.

I.3. Hypoxie

Face à la baisse de disponibilité en oxygène, la cellule met en place des réponses adaptatives comme le ralentissement à l'extrême de son cycle cellulaire, la réduction de la consommation d'énergie et l'expression de facteurs favorisant la survie et l'angiogenèse. Du fait de la structure du GBM, son micro-environnement est fortement hypoxique et contraint les cellules à amplifier des mécanismes de défense physiologiques afin de pallier ce manque d'oxygène. Cette adaptation passe par la modulation de la réponse transcriptionnelle, elle-même assurée par le facteur HIF (Yang et al., 2012).

En cas de faible disponibilité en oxygène, le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) est stabilisé et induit l'expression d'une grande quantité de gènes favorisant la résistance cellulaire au stress. Il peut être activé de façon physiologique, par

BY-NC-ND

exemple au cours de l'érythropoïèse (Shah and Xie, 2014), ou au cours de pathologies comme le cancer, notamment dans les tumeurs solides (Masoud and Li, 2015).

HIF-1 est un facteur hétérodimérique constitué de HIF-1α et HIF-1β. HIF-1β est exprimé constitutivement et son expression est stabilisée. HIF-1α est également exprimé constitutivement mais est sensible à la disponibilité en oxygène. En conditions normoxiques, HIF-1α est rapidement dégradé car il est la cible d'enzymes de type HIF-1α prolyl-hydroxylases. Cela entraine sa reconnaissance par le complexe von Hippel Lindau (pVHL) ayant une activité d'ubiquitine E3 ligase ; la protéine ubiquitinée est ensuite dégradée via le protéasome (Salceda and Caro, 1997). Au contraire, en conditions hypoxiques, HIF-1α ne subit pas cette modification post-traductionnelle, ce qui stabilise la protéine. Une fois stabilisé, HIF-1α va être transloqué au noyau et se dimériser avec HIF-1β. De plus, l'absence d'hydroxylation conduit au recrutement du co-activateur CBP/p300. Le complexe HIF/CBP/p300 se fixe sur une séquence spécifique appelée HRE (Hypoxia Responsive Element) de l'ADN, présente dans les promoteurs de différents gènes, et entraine leur transcription (Ke and Costa, 2006). Les gènes concernés codent pour des protéines impliquées dans l'angiogenèse, la survie cellulaire, le métabolisme glucidique, l'invasion tumorale et l'autophagie (figure 4) (Fujiwara et al., 2007; Fulda and Debatin, 2007; Hu et al., 2012; Kilic et al., 2006; Krock et al., 2011).

BY-NC-ND

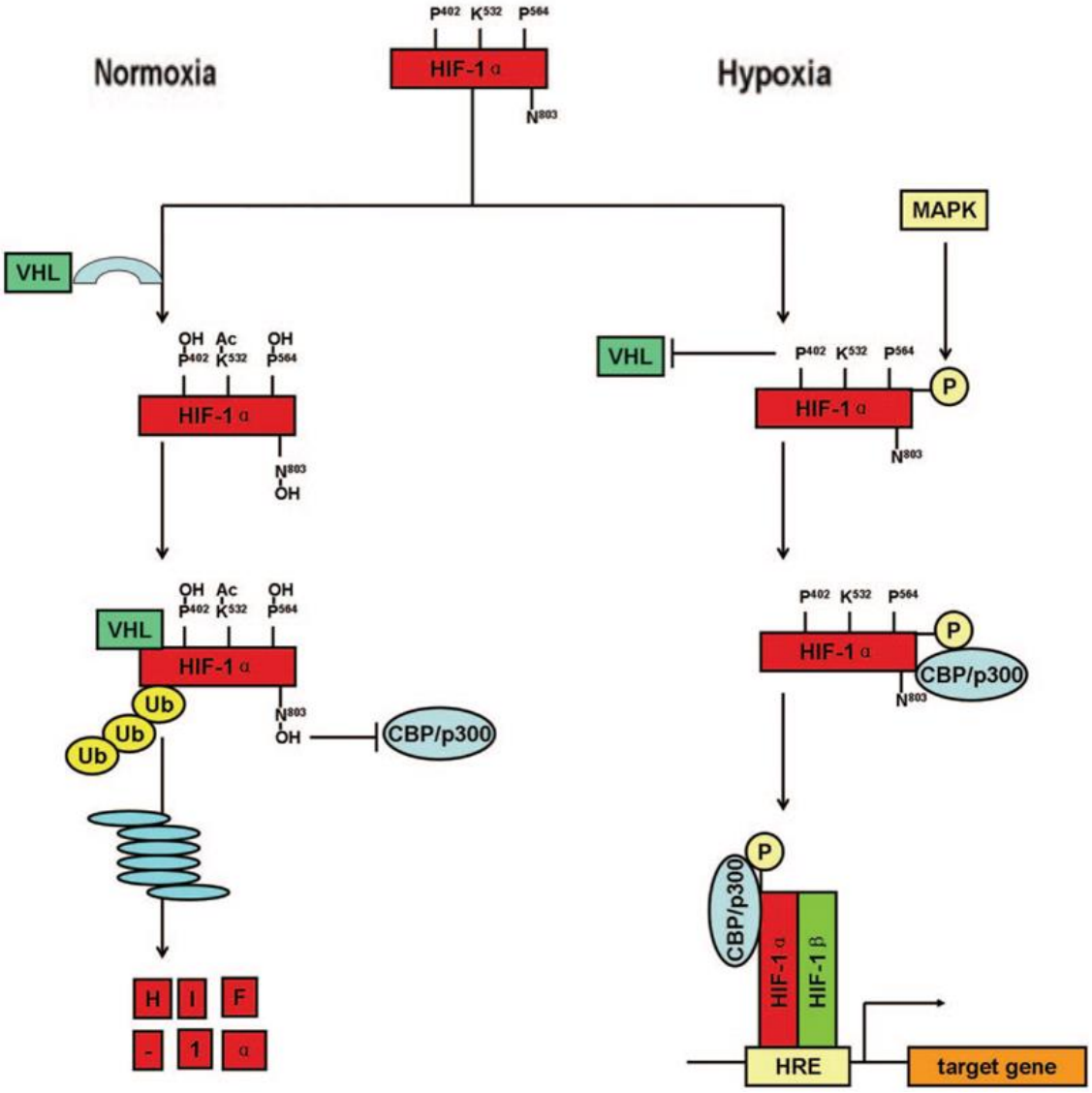


Figure 4 : Régulation d'HIF-1α
D'après (Ke and Costa, 2006). L'activation d'HIF-1α est oxygène-dépendante. En normoxie (à gauche), HIF-1α est hydroxylé et se lie au complexe VHL-ubiquitine ligase E3, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome. L'hydroxylation empêche le recrutement du co-activateur transcriptionnel CBP/p300. En hypoxie (à droite), le manque d'O_2 empêche l'hydroxylation. Il n'y a donc pas de liaison de VHL et HIF-1α est stabilisé. Lorqu'HIF-1α est stabilisé il va être transloqué vers le noyau et va se lier à HIF-1β. L'absence d'hydroxylation favorise la phosphorylation d'HIF-1α et le recrutement du co-activateur CBP/p300 ce qui permet la transcription des gènes cibles.

Il existe 2 autres formes paralogues, HIF-2α et HIF-3α (Lando et al., 2002). HIF-2α a 48% d'homologie avec HIF-1α et est capable de se dimériser avec HIF-1β et de se fixer aux HRE. Il a été démontré que HIF-2α joue un rôle dans l'initiation et la progression tumorale (Covello et al., 2006; Holmquist-Mengelbier et al., 2006; Hu et al., 2006; Raval et al., 2005). Ce facteur est impliqué dans la biologie des cellules souches (Covello et al., 2006) et est

BY-NC-ND

spécifiquement exprimé par les cellules souches tumorales du cerveau (Li et al., 2009). HIF-2α pourrait fournir à ces cellules un avantage de croissance en activant en aval différents gènes, même lorsque la disponibilité en oxygène est normale. Il a été montré que HIF-2α est co-localisé avec des marqueurs de cellules souches cancéreuses, à la fois *in vitro* et *in vivo*, ce qui suggère que les cellules exprimant HIF-2α ont majoritairement un phénotype souche. HIF-2α pourrait donc être un marqueur d'une sous-population de cellules souches nécessaires à la croissance tumorale (Li et al., 2009). La troisième forme, HIF-3α, est également exprimée dans divers tissus et est capable de se dimériser avec HIF-1 β et de se lier au HRE (Gu et al., 1998). Ce variant issu d'un épissage alternatif, est aussi connu sous le nom d'inhibiteur PAS (IPAS ; Per, Arnt, Sim motif). IPAS n'a pas d'activité de transactivation, en revanche, il se fixe au niveau de la région amino-terminale d'HIF-1α et empêche sa liaison à l'ADN. HIF-3α joue donc un rôle d'inhibiteur d'HIF-1 (Makino et al., 2001).

Il a été montré que l'hypoxie intervient dans la résistance du glioblastome aux traitements. Du fait de l'environnement fortement hypoxique résultant de la prolifération rapide de la tumeur, les vaisseaux vont se développer à l'extérieur de la tumeur, mais pas au centre. Les cellules se trouvant au cœur de la tumeur vont donc avoir peu d'apport en oxygène et en nutriments, elles auront plutôt tendance à être quiescentes, ne vont pas (ou très peu) se diviser et seront peu actives (Haar et al., 2012). L'absence de vascularisation empêche la drogue d'atteindre les cellules du centre de la tumeur, n'éliminant que les cellules de la périphérie (Vaupel et al., 2001). Dans le cas où la drogue parviendrait jusqu'au centre de la tumeur, son activité serait tout de même limitée. En effet, l'action d'un grand nombre de chimiothérapies passe par la génération de ROS (Reactive Oxygen Species), ce qui est impossible en absence d'oxygène (Carmeliet and Jain, 2011). De plus, les traitements anti-tumoraux ont souvent une activité anti-proliférative, or ici, les cellules se trouvant en hypoxie prolifèrent très peu, elles ne seront donc pas affectées par ce type de drogues (Oliver et al., 2009).

I.4. Traitements et résistance

I.4.1. Traitements

Le traitement de référence actuel est le « protocole Stupp » (Stupp et al., 2005). Ce traitement associe une chirurgie, visant à éliminer la plus grande partie de la masse tumorale, suivie, après 4 à 8 semaines, d'une radio-chimiothérapie, utilisant une radiothérapie à 2 Gy par jour et le Témozolomide (agent alkylant). Ce traitement n'offre qu'une médiane de survie de 15 mois (figure 5). Dans la plupart des cas, le traitement ne permet pas une guérison totale, mais une augmentation de l'espérance de vie car la récidive est très fréquente du fait du pouvoir très infiltrant des cellules tumorales qui vont se disperser dans le système nerveux central. Ainsi, même si la tumeur d'origine est éradiquée, de nouveau foyers se développent

BY-NC-ND

à distance, car les cellules ayant migré ne sont pas éliminées par le traitement. En cas de récidive les patients peuvent se voir poser un implant, dans la cavité formée après la résection, contenant de la Carmustine, un autre agent chimiothérapeutique alkylant de l'ADN. Cet implant est appelé Gliadel® (Hart et al., 2011; Salmaggi et al., 2011).

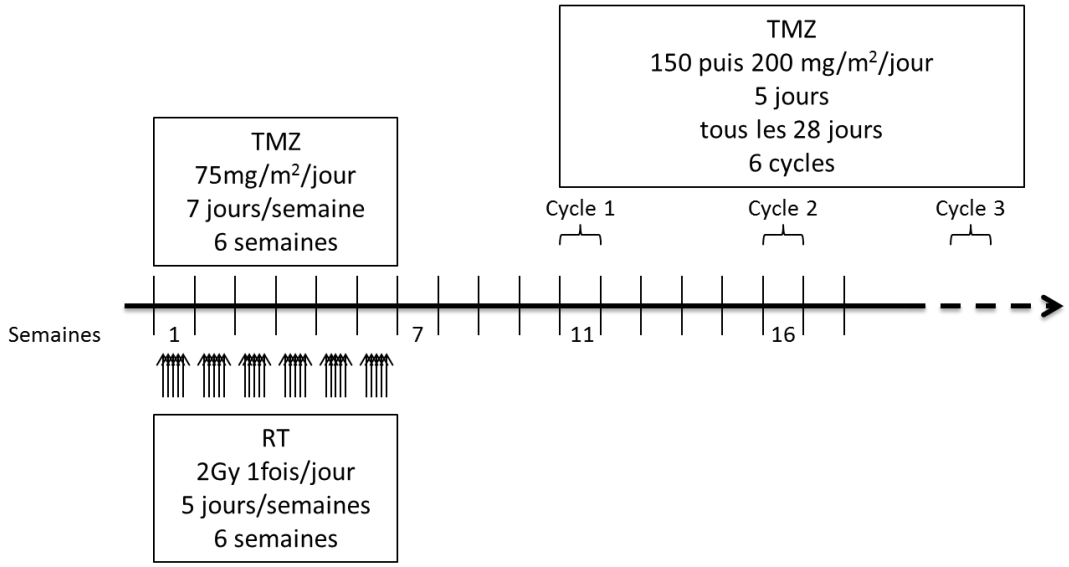


Figure 5 : Protocole du traitement de « routine » du GBM
D'après (Stupp et al., 2005) Le protocole Stupp, qui se présente sous la forme d'une radio-chimiothérapie concomitantes suivies d'une chimiothérapie, a permis d'améliorer la survie des patients, mais il reste peu efficace.

D'autres traitements alternatifs (de type thérapie ciblée) ont été développés, notamment des traitements à base d'anticorps (Ac). Par exemple, le Bevacizumab est un Ac ciblant le VEGF, facteur de croissance favorisant l'angiogenèse. Ce traitement vise à empêcher la vascularisation de la tumeur (Presta et al., 1997). Bien que ce type de traitement ait montré des résultats intéressants à court terme, il n'a pas permis d'améliorer la survie globale des patients (Gilbert et al., 2014). L'Erlotinib, un Ac anti-EGFR, vise à contrer la surexpression du récepteur à l'EGF (epidermal growth factor) fréquemment observée dans les GBM. Ce traitement a également montré une efficacité limitée qui s'explique par la présence de transporteurs de la famille MDR (multidrug resistance), notamment la P-glycoprotéine (P-gp) et la protéine de résistance du cancer du sein Breast Cancer Resistance Protein (BCRP), surexprimées par les cellules de GBM, qui provoquent l'efflux de la drogue par les cellules (de Vries et al., 2012).

BY-NC-ND

Malgré l'évolution des thérapeutiques et des différentes modalités de traitements utilisés depuis 30 ans, la survie globale n'a été améliorée que de 6 mois. Le pronostic reste donc très sombre. C'est pourquoi le développement de nouvelles thérapies est nécessaire.

L'essai de nouveaux traitements est en cours, notamment l'association d'une forte dose de TMZ associée à une vaccination ciblant la protéine PP65 du cytomegalovirus. La vaccination favorise la réponse lymphocytaire T antigène spécifique, ce qui maintient la réponse immunitaire active (alors qu'elle est normalement altérée par le TMZ). Ce traitement permet d'accroitre la survie sans progression de 10 mois et la survie globale de 34 mois par rapport au traitement au TMZ seul. Bien que réalisé sur peu de patients, cette étude offre des perspectives intéressantes quant au développement de nouveaux traitements (Batich et al., 2017).

La résistance du glioblastome aux traitements est la cause principale des récidives, elle représente donc un problème majeur. Pratiquement tous les glioblastomes sont intrinsèquement résistants au TMZ et s'ils ne le sont pas, ils le deviennent (Hiddingh et al., 2014). Cependant, que la résistance soit intrinsèque ou acquise, au niveau moléculaire, les mécanismes sont semblables (Goldie, 2001). Plusieurs ont été identifiés comme pouvant être à l'origine de la résistance des tumeurs (Haar et al., 2012).

I.4.2. Résistance

Le mécanisme le plus connu est l'efflux des drogues, connu sous l'appellation « multi-drug resistance » (MDR). Il passe par l'expression de protéines transmembranaires qui vont former des pompes à efflux qui vont entrainer l'expulsion hors de la cellule des molécules thérapeutiques (Molnár et al., 2010).

Un autre mécanisme de résistance repose sur les voies de réparation de l'ADN. Une grande partie des agents chimiothérapeutiques conventionnels induisent des altérations de l'ADN. Ce type de dommage devrait, idéalement, entrainer l'apoptose de la cellule concernée. Cependant, certaines cellules tumorales présentent des systèmes de réparation plus performants que les cellules saines, ce qui assure leur protection (Haar et al., 2012). En effet, le TMZ, qui fait partie des agents chimiothérapeutiques altérant l'ADN, est un agent alkylant utilisé dans le protocole de Stupp. Il agit sur la méthylation d'une guanine en position O6 et provoque l'apoptose de la cellule. Mais il ne sera efficace que si la cellule n'exprime pas la *MGMT* (*O^6-methylguanine methyl transferase*), qui est une enzyme de réparation de l'ADN assurant l'élimination des groupements alkyles sur les guanines en position O^6 (Zhang et al., 2010). Or il se trouve que la *MGMT* est fréquemment surexprimée (60%) dans le GBM (comme évoqué plus haut), ce qui favorise la résistance au TMZ. Il reste cependant 40% des cas de

BY-NC-ND

GBM pour lesquels la *MGMT* est sous-exprimée du fait de la méthylation de son promoteur, ce qui sensibilise les cellules au TMZ (Taylor and Schiff, 2015). Au contraire, d'autres cellules tumorales présentent plutôt un défaut des systèmes de réparation, en particulier le MMR, qui va également leur être bénéfique. Le système MMR détecte et corrige les mésappariements, dont ceux induit par le TMZ. Si le système ne parvient pas à corriger l'erreur il va favoriser la mort de la cellule. La déficience de ce système favorise la résistance au TMZ en permettant une tolérance aux mésappariements provoqués par l'alkylation de l'ADN (Sarkaria et al., 2008). L'efficacité de la radiothérapie est également limitée par le détournement de ces voies de réparation, puisque son action se base également sur l'altération de l'ADN, directement par ionisation des molécules d'eau liées à l'ADN, ou indirectement par génération de ROS (Reactive Oxygen Species) qui provoquent un stress oxydatif.

La résistance des cellules à la mort cellulaire est l'un des paramètres qui caractérise les cellules tumorales. Cette résistance peut passer par la surexpression de Bcl-2 (B cell lymphoma-2), une protéine anti-apoptotique qui participe à la résistance des cellules tumorales aux traitements (Han and Chen, 2015). Elle inhibe l'apoptose, mécanisme d'action principal du TMZ, en empêchant la libération de cytochrome c par la mitochondrie, ce qui bloque la cascade de caspases nécessaire à l'induction de l'apoptose (Haar et al., 2012; Liu et al., 2013b; Lu and Shervington, 2008).

Les miRNAs sont de petits ARNs non codants qui inhibent généralement le transfert, (noyau / cytoplasme), et la stabilité des ARNs messagers. Chez l'homme, les miRNAs interviennent dans la régulation physiologique de l'expression de nombreux gènes, mais également dans certaines pathologies, notamment le cancer. Selon le gène régulé, les miRNAs peuvent être anti-tumoraux, ou pro-tumoraux (Di Leva et al., 2014), et certains ont été identifiés comme étant impliqués dans le développement des glioblastomes (Haar et al., 2012) et dans la résistance aux traitements, tant par radiothérapie que chimiothérapie (Koshkin et al., 2013). On peut citer par exemple le miR-21 dont la surexpression, observée dans le glioblastome, provoque une résistance au TMZ en inhibant l'apoptose induite par la drogue. L'activité du TMZ passe par la surexpression de Bax, une protéine pro-apoptotique de la famille BCL-2, et l'activation de la caspase-3. Le miR-21 inhibe l'expression de Bax et diminue l'activité de la capsase-3. De plus, ce miRNA provoque une surexpression de la protéine Bcl-2, une protéine anti-apoptotique (Shi et al., 2010).

Face à l'inefficacité des traitements et à la résistance des cellules de GBM les recherches se tournent depuis quelques années vers le ciblage d'une population particulière de cellules tumorales, les cellules souches cancéreuses (CSC).

BY-NC-ND

I.5. Les cellules souches cancéreuses

I.5.1. Hétérogénéité des tumeurs

Les tumeurs ne sont pas constituées d'un amas de cellules homogènes, leur hétérogénéité a d'abord été suggérée dans les années 50 (Dunn, 1951; Levan and Hauschka, 1953), puis confirmée quelques années plus tard (Dexter et al., 1978; Makino, 1956). Les tumeurs sont en réalité constituées d'un mélange très hétérogène, contenant à la fois des cellules tumorales et des cellules « saines ». Les cellules « saines », qui peuvent être endothéliales, hématopoïétiques, stromales ou autres, assurent un soutien aux cellules tumorales et forment un écosystème très complexe (Junttila and de Sauvage, 2013; Kreso and Dick, 2014). Les cellules tumorales elles-mêmes, sont également hétérogènes au sein de la tumeur, au niveau morphologique, phénotypique et génétique. En effet, des études, après isolement et analyse individuelle de différentes cellules issues d'une tumeur d'un patient, ont montré que chaque clone étudié présente des caractéristiques de prolifération et de différenciation uniques. Ces clones réagissent également différemment aux traitements, certains y étant résistants, d'autres non (Meyer et al., 2015; Morrissy et al., 2017). L'hétérogénéité est un problème car elle participe à la croissance tumorale, la progression et la résistance aux traitements et a été observée dans tous les types de cancers (de Bruin et al., 2014; Dalerba et al., 2011; Mullighan et al., 2008; Snuderl et al., 2011).

I.5.2. Modèle stochastique *VS* modèle hiérarchique

Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer l'hétérogénéité des tumeurs (Catalano et al., 2011). D'après le modèle **stochastique**, ou modèle d'évolution clonale, la formation de la tumeur serait due à l'instabilité génique d'une cellule saine différenciée, provoquée par des agents intrinsèques, comme la surexpression de facteurs de transcription, l'activation anormale d'une voie de signalisation ou l'altération des systèmes de réparation de l'ADN qui ne corrigent plus les aberrations (Ionov et al., 1993; Loeb et al., 1974). Les agents mutagènes peuvent également être extrinsèques, comme le microenvironnement, la réponse immunitaire ou les agents extérieurs tels que les UV, la cigarette, les radiations et autres agents mutagènes (Heppner, 1984; Loeb and Harris, 2008). De cette cellule, naitront des cellules filles, présentant la même mutation, à laquelle s'en ajouteront de nouvelles. Ces mutations vont s'accumuler au cours du temps, augmenter la survie des cellules et accentuer leur agressivité (Nowell, 1976). Selon ce modèle, toutes les cellules constituant la tumeur auraient le même potentiel tumorigénique. C'est sur ce concept que se basent la plupart des traitements anti-tumoraux actuels, ils sont conçus pour cibler et éliminer toutes les cellules ayant un fort taux de prolifération (Lee et al., 2016).

BY-NC-ND

Le modèle **hiérarchique**, ou modèle des cellules souches, avance, quant à lui, que la tumeur se formerait à partir d'un très faible nombre de cellules cancéreuses ayant les caractéristiques de cellules souches. De la même manière que les cellules souches adulteset embryonnaires non-pathologiques, les cellules souches cancéreuses sont capables de s'auto-renouveler, de se différencier en cellules non-souches et d'initier la formation d'une nouvelle tumeur (Huang et al., 2015). Selon cette théorie, cette petite sous-population serait l'unique support de la capacité tumorigénique et serait la seule capable de former une structure ayant une organisation hiérarchique. Malheureusement, ces cellules seraient, pour la plupart, résistantes aux thérapies, ce qui contribue à l'échec des traitements (Lee et al., 2016; Marquardt et al., 2010). La mise en évidence initiale de l'existence de ces cellules a été faite en 1994, par greffe dans des souris « nudes » de cellules de patients leucémiques. L'analyse par cytométrie en flux a permis l'identification d'une cellule à l'origine de leucémie, qui exprime le marqueur CD34 (Lapidot et al., 1994). Depuis, l'existence des cellules souches a été démontrée et observée dans de nombreux types de tumeurs solides comme le sein, la prostate, le colon, le pancréas, l'ovaire, le poumon ou le cerveau (Al-Hajj et al., 2003; Collins et al., 2005; Dalerba et al., 2007; Li et al., 2007; Singh et al., 2004; Suzuki et al., 2010; Wang et al., 2013).

Ces deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs. En effet, une tumeur peut être constituée d'une multitude de cellules souches cancéreuses génétiquement différentes, mais dérivant d'une seule cellule d'origine ayant subi une mutation tumorigénique (figure 6) (Cabrera et al., 2015).

BY-NC-ND

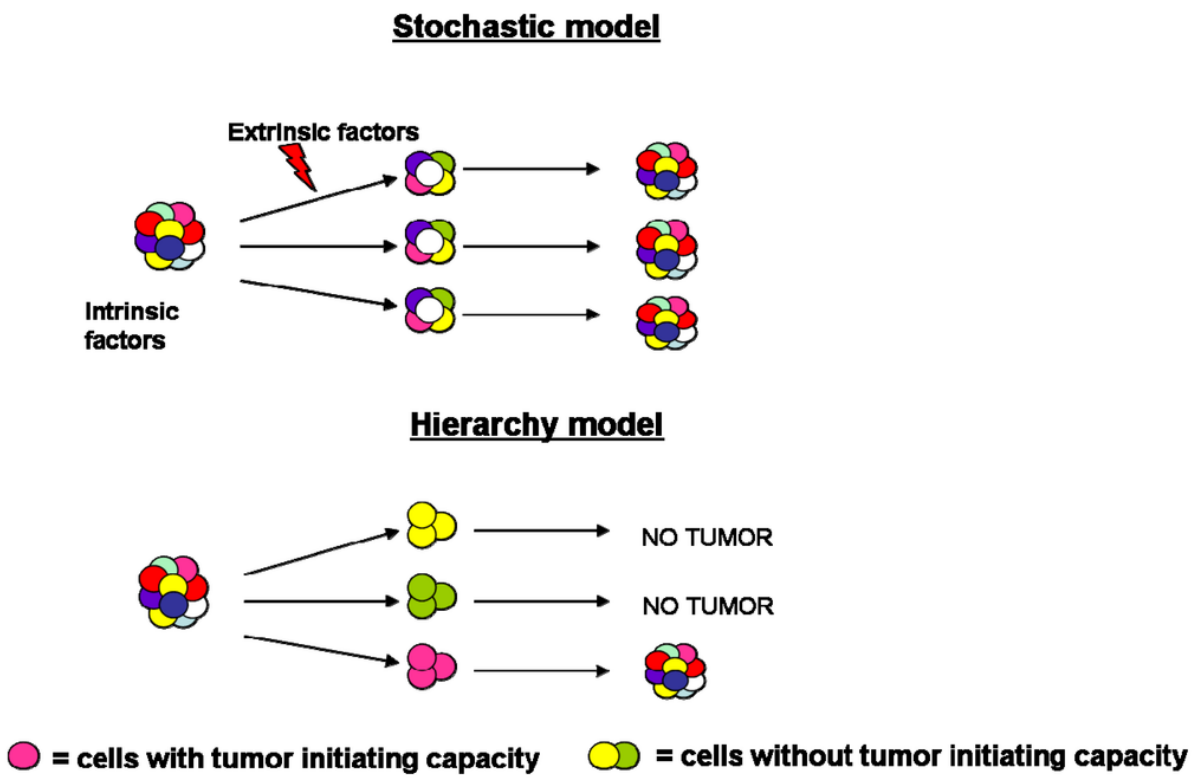


Figure 6 : Modèle stochastique vs modèle des cellules souches
D'après (Catalano et al., 2011) Ces deux modèles, stochastique et hiérarchique, longtemps opposés, visent à expliquer la tumorigenèse et l'hétérogénéité cellulaire des tumeurs. Ils sont finalement complémentaires et participent tous deux à l'expansion tumorale.

Les CSC sont particulièrement intéressantes dans l'étude du cancer, car ce sont elles qui sont capables de s'auto-renouveler, maintenant ainsi le pool de cellules tumorales. La majorité des cellules tumorales ne possède pas ce potentiel tumorigénique en l'état, il leur faut acquérir les caractéristiques des CSC (Bradshaw et al., 2016).

I.5.3. Caractéristiques des cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses ont des caractéristiques fonctionnelles proches des cellules souches embryonnaires (Lee et al., 2016). Comme ces dernières, ce sont des cellules indifférenciées, c'est-à-dire non spécialisées. Elles ont la capacité de s'auto-renouveler et de se diviser de façon asymétrique afin de donner deux cellules filles différentes (une cellule souche et une cellule progénitrice), contrairement aux progéniteurs qui vont engendrer deux cellules filles strictement identiques. Elles ont la particularité d'avoir un cycle cellulaire long (jusqu'à plusieurs semaines) et d'être fortement clonogéniques, c'est-à-dire qu'elles ont une forte capacité à reformer par division un clone cellulaire (Alison and Islam, 2009; Puck and Marcus, 1956; Rafehi et al., 2011). Les CSC sont en effet multipotentes et capables de s'auto-

BY-NC-ND

renouveler et de proliférer, ce qui leur donne la capacité d'initier une nouvelle tumeur (Fedr et al., 2013; Haar et al., 2012). Ce sont ces caractéristiques qui leur confèrent un statut de cellules souches cancéreuses. (Lathia et al., 2015). Les CSC se trouvent dans des niches dont le microenvironnement est minutieusement régulé pour maintenir leur phénotype souche. Dans certains cas le microenvironnement peut également favoriser l'acquisition d'un phénotype souche (Auffinger et al., 2015; Ye et al., 2014). Ces régulations passent notamment par des facteurs, de croissance comme le VEGF, des facteurs de transcription comme Oct4, des composants de la matrice extra-cellulaire (MEC), ou des cytokines. Ces éléments sont produits par les CSC elles-mêmes, ou par d'autres cellules qui peuvent être de différents types, comme des cellules immunitaires ou des fibroblastes associés à la tumeur. D'autres éléments peuvent également participer à la régulation, comme l'hypoxie ou le pH (Balkwill et al., 2012; Heddleston et al., 2009; Hjelmeland et al., 2011).

Les CSC peuvent donc se différencier, mais il a également été montré que des cellules différenciées sont capables, souvent sous l'effet d'un stress, d'acquérir un statut de CSC. Par exemple, l'exposition de cellules de glioblastome au Témozolomide, qu'elles soient de lignée ou issues de patient, entraine une augmentation du pool de CSC. Cette dédifférenciation pourrait passer par l'induction d'une réponse au traitement de type « hypoxie-like ». En effet, il a été montré que ces nouvelles CSC surexpriment HIF-1α et HIF-2α (Auffinger et al., 2014; Gordan et al., 2007; Li et al., 2009). Un équilibre dynamique, de différenciation et dédifférenciation, se met en place entre les CSC et les cellules différenciées, ce qui entretient une large gamme de cellules tumorales dont les phénotypes forment un continuum entre « différencié » et « souche » (Hossain et al., 2015; Iliopoulos et al., 2011).

Les cellules souches sont résistantes à la fois à la radiothérapie, car elles ont des mécanismes de réparation de l'ADN plus efficaces que les autres cellules tumorales, et à la chimiothérapie, car elles expriment des pompes à efflux assurant la MultiDrogueRésistance (Kreso and Dick, 2014; Zinzi et al., 2014). Il a également été montré que les CSC expriment fortement le VEGF (*vascular epithelial growth factor)* et SDF-1 (*stromal-derived factor-1*), qui sont deux facteurs pro-angiogéniques, ce qui favorise la croissance tumorale en participant à l'angiogenèse (Huang et al., 2010). Parmi les mécanismes qui interviennent dans la résistance des CSC aux traitements, on peut citer l'autophagie qui est particulièrement amplifiée dans ces cellules (Fu et al., 2009; Ye et al., 2013). Elle se met en place en réponse à l'hypoxie et, chez certaines cellules, suite à l'irradiation (Lomonaco et al., 2009). Cet aspect sera développé dans le chapitre II de ce manuscrit.

BY-NC-ND

I.5.4. Marqueurs de cellules souches

Bien que leur existence soit maintenant admise, les CSC restent, malgré tout, difficiles à étudier car elles sont peu nombreuses, et à caractériser du fait de l'hétérogénéité des marqueurs. Le 1er marqueur à avoir été associé au phénotype souche est le CD133 (Prominin-1) (Yin et al., 1997) ; il est aujourd'hui contesté. (Holmberg Olausson et al., 2014). L'identification des CSC a été revue et se base actuellement sur un ensemble de propriétés et de marqueurs, qui sont également des marqueurs de cellules souches normales. Parmi eux, on peut citer OCT4, SOX2, BMI1, LGR5 et NANOG, qui participent au maintien du phénotype souche (Alison and Islam, 2009).

I.5.4.1. CD133

Cette glycoprotéine de surface, également connue sous le nom de prominin-1, est la première à avoir été utilisée comme marqueur de CSC (Yin et al., 1997). Elle est en effet sur-exprimée par les cellules ayant des capacités de prolifération et d'auto-renouvellement et une grande capacité à se différencier (Singh et al., 2004). Mais il a rapidement été mis en évidence que le CD133 ne représente pas un marqueur de CSC approprié car son expression n'est pas régulée en fonction du phénotype souche, seule sa glycosylation serait spécifique des CSC (Lathia et al., 2015).

I.5.4.2. Oct4

Oct4 (Octamer binding transcription factor 4) est un facteur de transcription à homéodomaine de la famille des POU (Pit-Oct-Unc), codé par le gène *Pou5f1*. C'est un des principaux facteurs contrôlant l'auto-renouvellement et le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires pluripotentes. Il est fortement exprimé par ces cellules, plus faiblement par les cellules souches somatiques et est peu exprimé par les cellules différenciées (Zangrossi et al., 2007). Il est utilisé comme marqueur des cellules initiatrices de tumeurs (Wang and Herlyn, 2015). OCT4 va pouvoir former des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres facteurs de transcription, comme Sox2 (Saxe et al., 2009).

Il a été montré qu'Oct4 joue un rôle important dans l'auto-renouvellement, la transition épithelio-mésenchymateuse et la résistance aux traitements des cellules initiatrices de tumeurs. Il intervient également dans l'initiation et la propagation de la tumeur en favorisant la phosphorylation de Stat3 *via* la voie Jak2, ce qui entraine la prolifération des cellules tumorales (Yin et al., 2015). La surexpression d'Oct4 dans les tumeurs est généralement associée à une augmentation de l'expression de Sox2 et Nanog, ces trois facteurs intervenant comme co-régulateurs (Liu et al., 2013a). Cette surexpression peut être favorisée par un environnement

BY-NC-ND

hypoxique, qui va entrainer la fixation d'HIF-2α au promoteur du gène *Pou5f1* et induire l'expression et l'activité transcriptionnelle d'Oct4 (Forristal et al., 2010).

Il a été montré qu'Oct4 est fortement exprimé dans les gliomes humains et dans les lignées de gliomes. De plus, son niveau d'expression est directement en corrélation avec le grade du gliome, plus il est exprimé et plus le grade est élevé. Il apparait également que l'exposition de cellules de glioblastome au Témozolomide entraine une augmentation de l'expression d'Oct4 ainsi que de Nanog. (Alison and Islam, 2009; Hattermann et al., 2016; Wang and Herlyn, 2015)

I.5.4.3. Nanog

Nanog (Nanog homeobox) est une protéine à domaine homeobox. Son nom est issu du royaume mythique Irlandais *Tír na nÓg*, qui signifie « royaume de l'éternelle jeunesse » (Wong and Cheung, 2016). Elle s'associe à Oct4 et Sox2 pour assurer le maintien des propriétés souches des cellules souches embryonnaires (Orkin et al., 2008) et est surexprimée par les CSC (Gong et al., 2015). Il a été montré que pour être stable cette protéine doit être phosphorylée (Xie et al., 2014).

Comme pour Oct4, l'expression de Nanog est associée aux gliomes de haut grade (Elsir et al., 2014). Sa surexpression par les cellules tumorales intervient dans la prolifération anormale des cellules non-souches, l'auto-renouvellement des cellules souches, la migration et l'invasion des cellules tumorales, la chimiorésistance et la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Gawlik-Rzemieniewska and Bednarek, 2016; Iv Santaliz-Ruiz et al., 2014).

Nanog intervient dans la régulation d'autres gènes impliqués dans le phénotype souche. Il a en effet été montré que cette protéine est nécessaire pour l'activation de la transcription du gène *Bmi1* (Xie et al., 2014).

I.5.4.4. Sox2

Sox2 (sex determining region Y-box 2) est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'auto-renouvellement et de la prolifération des cellules souches embryonnaires et dans le maintien de la prolifération des progéniteurs neuraux chez l'adulte (Graham et al., 2003; Song et al., 2016). C'est également un marqueur de CSC dans le GBM associé au sous-type proneural (Berezovsky et al., 2014).

BY-NC-ND

L'activité de Sox2 passe par la régulation de l'expression de facteurs de transcription (Li et al., 2013a), de microRNA (Vencken et al., 2014), de régulateurs épigénétiques (Amador-Arjona et al., 2015) et de molécules de signalisation (Taranova et al., 2006).

Sox2 favorise les métastases en participant à la TEM via la régulation de la voie Wnt/β-caténine (Li et al., 2013b). Il a également été mis en évidence que l'extinction de l'expression de Sox2 dans des cellules initiatrices de GBM entraine une diminution de la prolifération due à une différenciation progressive des cellules entrainant leur sortie du cycle cellulaire et éventuellement leur mort (Gangemi et al., 2009).

Oct4, Sox2 et Nanog font partie des cocktails OSKM (Oct4, Sox2, Klf4 et Myc), dont la découverte a permis à Shinya Yamanaka d'obtenir le prix Nobel de Médecine en 2012, et ONSL (Oct4, Nanog, Sox2 et Lin28) qui sont impliqués dans le reprogrammation des cellules différenciées vers des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007).

I.5.4.5. BMI1

BMI1 fait partie de la famille des protéines du groupe Polycomb (PcG). Les protéines de ce groupe forment un complexe nommé PRC1 (polycomb repressive complex 1), qui est un répresseur transcriptionnel de nombreux gènes. Le complexe inhibe l'expression des gènes cibles en modifiant l'organisation de la chromatine (Chatoo et al., 2009).

Dans les cellules souches embryonnaires, une partie des gènes dont l'expression est réprimée par les PcG sont également ciblés par trois facteurs de transcriptions, Oct4, Sox2 et Nanog. Ces éléments pourraient indiquer que les facteurs de transcription maintiendraient la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches, en recrutant les PcG afin de réprimer l'expression des gènes impliqués dans la différenciation des cellules (Alison and Islam, 2009). De plus, outre la quiescence, BMI1 est également associé à la senescence des cellules (Sparmann and van Lohuizen, 2006).

Par ailleurs, il semblerait qu'en maintenant l'état souche des cellules, BMI1 inhibe l'expression des gènes HLA, limitant ainsi la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules immunitaires. BMI1 participerait donc à « l'invisibilité » des CSC vis-à-vis du système immunitaire, permettant leur échappement, soit en empêchant la différenciation des cellules, soit en réprimant directement l'expression des molécules HLA (Abdouh et al., 2009).

BY-NC-ND

I.5.4.6. LGR5

LGR5/Gpr49 (Leucin-rich repeat containing G-protein-coupled receptor 5) est une cible de la voie Wnt et participe à sa signalisation (Barker et al., 2007; Van der Flier et al., 2007). En effet, LGR5 va se complexer avec les récepteurs membranaires LRP et Frizzled. Puis leurs ligands respectifs, les R-spondins (Roof plate-specific spondin) et Wnt, vont se fixer, ce qui va activer la signalisation en aval et permettre l'expression de gènes cibles (figure 7).

LGR5 est exprimé par les cellules souches embryonnaires et par les cellules souches adultes ayant une forte activité proliférative (Jaks et al., 2008; Norum et al., 2015). Une potentielle implication de la signalisation Wnt dans le maintien de l'état souche chez l'adulte a été démontrée sur des cellules souches neurales normales (Schuijers and Clevers, 2012). LGR5 est utilisé comme marqueur de cellules souches dans différents types de tissus (Barker and Clevers, 2010; Barker et al., 2007; Haegebarth and Clevers, 2009; Jaks et al., 2008).

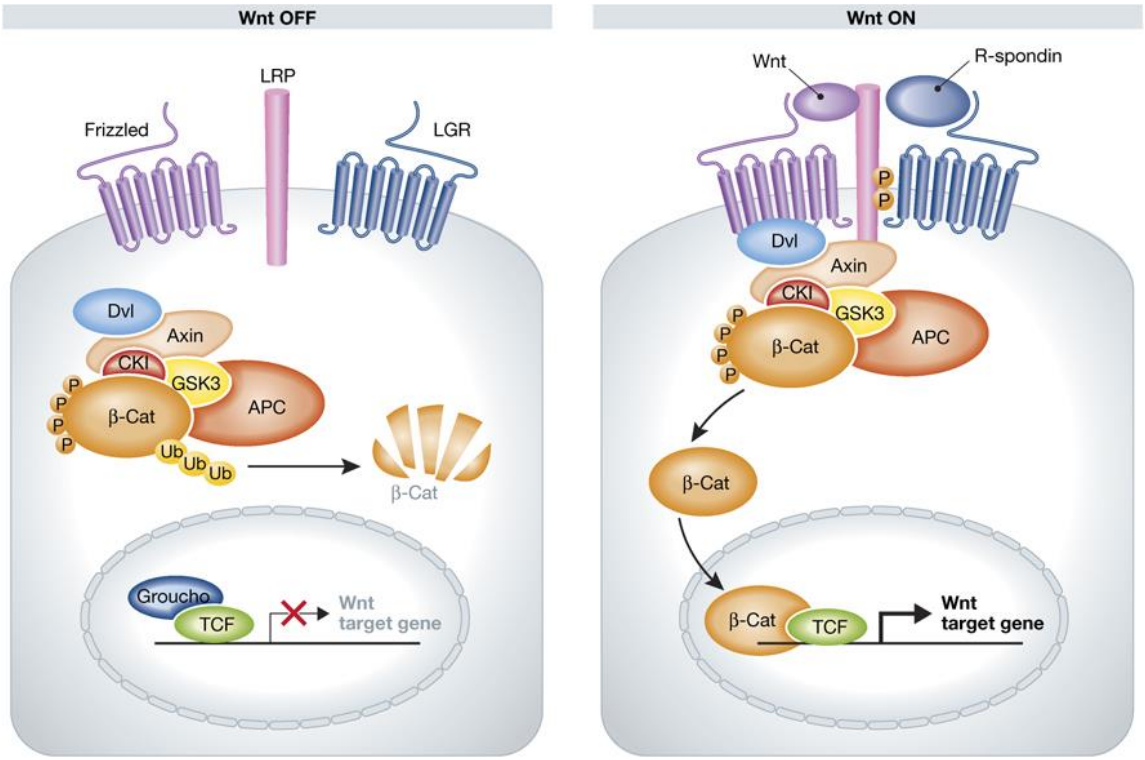


Figure 7 : Rôle de LGR5 dans la voie Wnt
D'après (Schuijers and Clevers, 2012). La protéine LGR5 fait partie du complexe formant le récepteur aux ligands Wnt et participe à l'activation de la voie. Sans les ligands Wnt et R-spondin, le complexe de dégradation Axin, Dvl (Disheveled), CKI (Casein Kinase 1), GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3β) et APC (Adenomatous Polyposis Coli) lie la β-Caténine (β-Cat) et la phosphoryle ce qui conduit à sa dégradation. Au contraire, lorsque Wnt et la R-spondin se fixent respectivement sur Frizzled et LGR5, le complexe de dégradation est séquestré. La β-Caténine est transloquée vers le noyau où elle se fixe à TCF (T Cell Factor) à la place du répresseur Groucho et active la transcription des gènes cibles.

BY-NC-ND

LGR5 est fortement exprimé par les cellules cancéreuses *in vitro* et joue un rôle pro-survie. *In vivo*, plus le grade de la tumeur est élevé, plus la proportion de cellules exprimant LGR5 est importante. De plus, son expression est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients puisqu'il a été montré que LGR5 pourrait participer à l'agressivité des cellules et leur résistance aux traitements (Leushacke and Barker, 2012; Nakata et al., 2013). Sa présence a essentiellement été démontrée dans le cancer colorectal (Barker et al., 2007), mais également dans d'autres tissus comme l'ovaire (Amsterdam et al., 2013a), le pancréas (Amsterdam et al., 2013b), et également le cerveau (Mao et al., 2013).

LGR5 est surexprimé dans les gliomes humains, ce qui est en accord avec la présence de cellules souches cancéreuses, et la capacité à former des sphères (*in vitro*) ainsi qu'une capacité tumorigénique (*in vivo*) (Nakata et al., 2013). Il a été montré que dans ce type de cellules, LGR5 est impliqué dans la croissance des cellules et leur prolifération (WANG et al., 2014).

Remarque : Il est à noter qu'il a été mis en évidence que BMI1 est un marqueur de CSC quiescentes, alors que LGR5 serait un marqueur de CSC « activées » dans le modèle du cancer colorectal (CCR). Ces deux marqueurs commencent à être utilisés en parallèle afin de déterminer l'état des CSC (Yan et al., 2012). Il a été mis en évidence qu'il existe une hétérogénéité des CSC issues de GBM, qui ne possèdent pas les mêmes capacités tumorigéniques (Beier et al., 2007; Galli et al., 2004). Il a ensuite été montré que, parmi les CSC de GBM, il existe des cellules présentant tous les critères phénotypique associés aux CSC, mais qu'il en existe également qui présentent une version plus restreinte de ce phénoype souche (Günther et al., 2008). De nouveaux travaux ont par la suite confirmé, à partir d'un GBM issu de patient, qu'il existe au moins deux populations de CSC au sein de la tumeur, qui diffèrent au niveau de leur capacité de croissance et leur capacité à induire une tumeur (Piccirillo et al., 2009).

I.5.5. Thérapies ciblant les CSC

Comme dit précédemment, les CSC apportent à la tumeur sa résistance aux traitements anti-tumoraux et par conséquent peuvent apparaitre comme étant des facteurs de récidive (figure 8) (Lee et al., 2016). La thérapie conventionnelle (protocole Stupp) pour traiter les glioblastomes est peu efficace et n'empêche pas la récidive. Cette thérapie, et les thérapies anti-tumorales en général, ne ciblent pas les CSC (Cho et al., 2013), il est donc nécessaire de développer des traitements spécifiquement dirigés contre ces cellules. Parmi les cibles intéressantes se trouve le facteur HIF. En effet, l'implantation de cellules de GBM, dont l'expression d'HIF-1α a été inhibée, chez des souris entraine un développement plus lent de

BY-NC-ND

la tumeur qu'avec des cellules non modifiées (Wang et al., 2017). La manipulation du microenvironnement tumoral et des facteurs participant au maintien des CSC pourrait s'avérer efficace (Li et al., 2009). L'inhibition de l'angiogenèse pourrait également représenter une nouvelle façon de cibler les CSC, en effet, il a été montré que, bien que l'expression de VEGF par les CSC de GBM n'ait pas d'effet *in vitro* sur leur phénotype, *in vivo* il entraine un développement massif et rapide de la tumeur qui va en plus être richement vascularisée (Oka et al., 2007). Cependant, des expériences d'inhibition du VEGF ont été réalisées sur un modèle de mélanome et ont mis en évidence que ce type de traitement favorise l'émergence de résistance passant par l'enrichissement en CSC (Schnegg et al., 2015). Un essai clinique de combinaison du traitement de routine (radio-chimiothérapie) et du Bevacizumab (anticorps anti-VEGF) a également été réalisé, mais il n'a pas montré d'amélioration d'efficacité du traitement (van Linde et al., 2015).

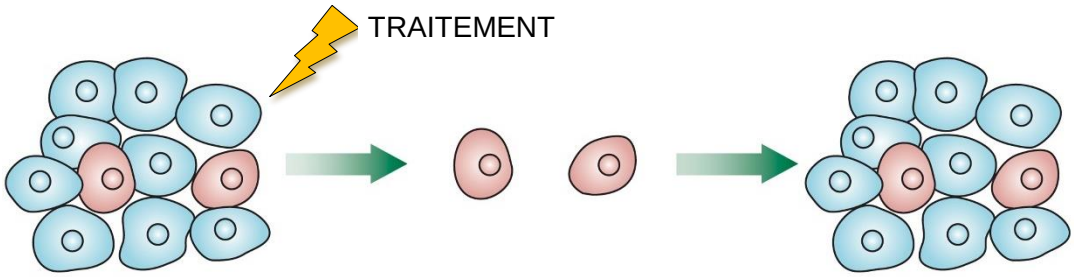


Figure 8 : Sélection des CSC par les traitements
D'après (Vermeulen et al., 2012). Les traitements éliminent les cellules sensibles de la masse tumorale (bleues) mais laissent les CSC (rouges) qui sont résistantes. Les caractéristiques de ces CSC leur permettent de reformer par la suite une tumeur grâce à leur capacité d'auto-renouvellement, ce qui explique la récidive.

Comme expliqué plus haut, les CSC détournent des voies de survie afin de résister à la fois à l'environnement pauvre en oxygène des tumeurs et aux différents traitements, chimiothérapie ou radiothérapie. Nous nous sommes particulièrement intéressés à un de ces mécanismes, l'autophagie, qui est connue pour être fortement amplifiée dans le GMB.

BY-NC-ND

Chapitre II. L'autophagie

L'autophagie est un terme utilisé pour faire référence à tous les systèmes de recyclage et de dégradation impliquant un adressage de composants cytoplasmiques vers le lysosome. Elle a été mise en lumière dans les années 1950 avec la découverte de cet organite (De Duve, 1957), mais c'est dans les années 2000 qu'elle a été plus particulièrement étudiée et expliquée par Yoshinori Ohsumi, qui a obtenu le prix Nobel de Médecine pour ses travaux en 2016 (Ohsumi, 2014). Actuellement 3 types ont été caractérisés : la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie médiée par des chaperonnes (figure 9). Contrairement au système de dégradation ubiquitine-protéasome, l'autophagie est un mécanisme qui a longtemps été considéré comme non-sélectif (Mizushima, 2007). Cette notion est en train d'évoluer vers la définition d'une autophagie qui serait à la fois sélective et non sélective, en fonction des stress et des molécules à dégrader (Svenning and Johansen, 2013).

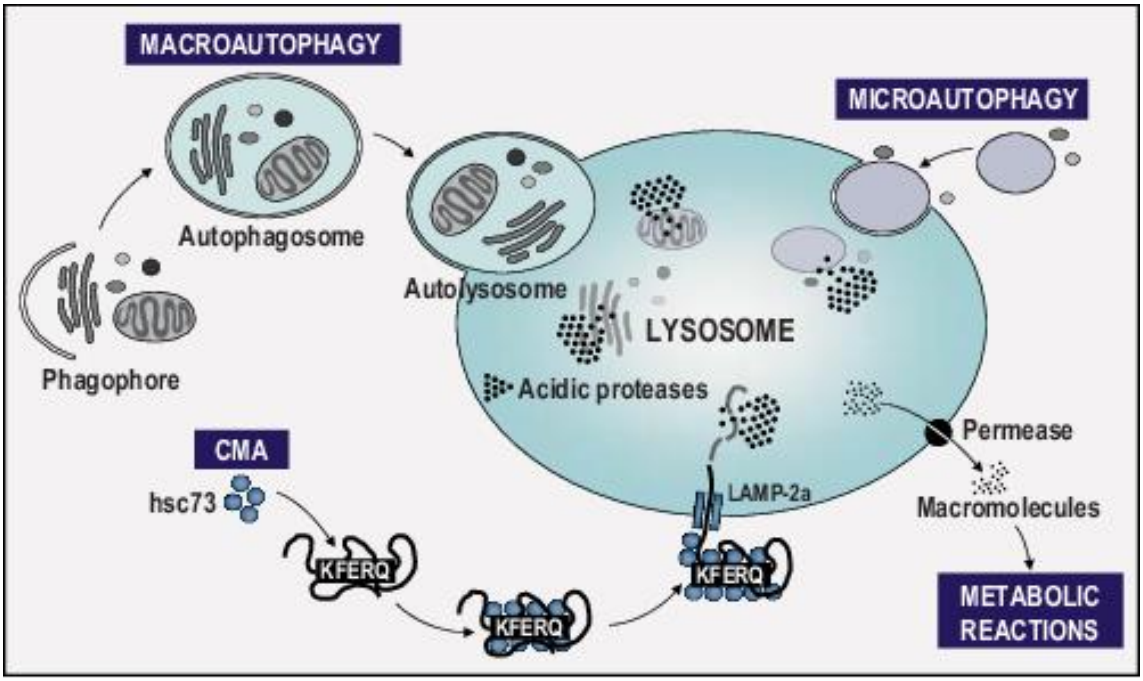


Figure 9 : Les différentes formes d'autophagie
D'après (Vicencio et al., 2008). Le terme autophagie peut faire référence à 3 formes de recyclages : la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie médiée par des chaperonnes. Toutes convergent vers le lysosome. CMA = Chaperone Mediated Autophagy

BY-NC-ND

II.1. Les différents types d'autophagie

II.1.1. Micro-autophagie

La microautophagie, chez les mammifères, est un processus par lequel une partie du cytosol est directement capturée par le lysosome par invagination de sa membrane (Li et al., 2012). Elle peut également être assurée par les endosomes tardifs (Sahu et al., 2011), ce qui permet la dégradation sélective de protéines cytosoliques, exprimant un domaine KFERQ, reconnu par la HSPA8 il s'agit alors de micro-autophagie endosomale, ou indépendant de ce domaine (Mukherjee et al., 2016). La microautophagie ne se met pas en place en réponse à un stress cellulaire, mais suite à la détection de son substrat (Galluzzi et al., 2017).

II.1.2. Autophagie médiée par les chaperonnes

L'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA : Chaperon Mediated Autophagy) permet la dégradation des protéines cytosoliques présentant une séquence signal spécifique KFERQ (Lysine-Phénylalanine-Acide Glutamique-Arginine-Glutamine). Ce motif est reconnu par la protéine chaperonne Hsc70 (Hsp73/HSPA8), qui fait partie des Heat Shock Protein. Elle va diriger le matériel à dégrader vers le lysosome, contrairement à la micro-autophagie endosomale qui passe par les endosomes (Mukherjee et al., 2016), au niveau duquel elle se fixe au récepteur LAMP2A (Lysosome-associated protein-2A). Le matériel va alors être internalisé puis dégradé (Tanida, 2011). Cette forme d'autophagie se distingue des deux autres car elle ne nécessite pas de vésicules ou d'invagination de la membrane pour le transport des protéines vers le lysosome (Kaushik and Cuervo, 2012). Seules les protéines portant un domaine KFERQ peuvent être dégradées par CMA (Dice et al., 1990). La CMA ne prend pas en charge les organites ni les macromolécules telles que les lipides, les acides nucléiques ou les protéines membranaires (Galluzzi et al., 2017). Elle est activée tardivement en réponse au stress, et n'intervient qu'après la macro-autophagie (Salvador et al., 2000).

II.1.3. Macro-autophagie

Le terme autophagie est habituellement utilisé pour désigner la macro-autophagie, comme ce sera le cas dans ce manuscrit.

Selon les conditions, l'autophagie peut être divisée en deux types : l'autophagie basale, complémentaire du protéasome, qui permet de maintenir un recyclage des composants du cytoplasme et l'autophagie induite en réponse à un stress. Celui-ci peut être de différentes natures : la privation en nutriments ou en facteurs de croissance, l'hypoxie, le stress oxydatif, la détection d'ADN endommagé, les agrégats de protéines, l'altération d'organites ou la présence de pathogènes intracellulaires (Ao et al., 2014). Elle permet alors de dégrader le matériel endommagé, obsolète ou étranger, de recycler ce qui peut l'être et de rendre la cellule

BY-NC-ND

auto-suffisante, afin qu'elle puisse survivre sans apport extérieur. Elle occupe également une place importante dans la réponse immunitaire en participant à la présentation de l'antigène et à la défense contre les pathogènes intracellulaires (Gannage et al., 2013).

Outre ses fonctions de maintien de l'homéostasie cellulaire, l'autophagie, lorsqu'elle est dérégulée, participe également à la mise en place de différentes pathologies, notamment la tumorigenèse, les maladies neurodégénératives (maladies de Parkinson, Alzheimer, Huntington, Creutzfeldt-Jakob), les cardiomyopathies (maladie de Danon), la maladie de Crohn, la stéatose hépatique, le diabète de type II (figure 10) (Tanida, 2011).

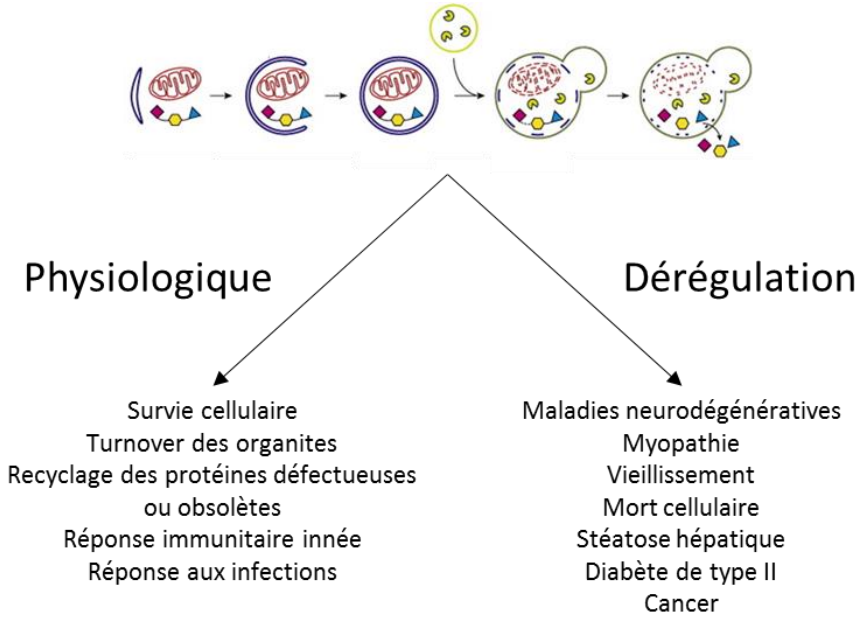


Figure 10 : Place de l'autophagie en conditions physiologiques et en cas de dérégulation
Adapté de (Zaffagnini and Martens, 2016). L'autophagie peut à la fois être favorable à la cellule en la protégeant contre les agressions et le matériel endommagé qui devient toxique, mais également être délétère suite à sa dérégulation qui peut participer à l'émergence de pathologies.

II.2. Mécanisme de la macro-autophagie

L'autophagie a d'abord été décrite chez la levure où 31 protéines ont été identifiées (Ohsumi, 2014). Elles sont codées par les gènes *ATG* (Autophagy related genes). Ces protéines sont conservées chez les mammifères, bien qu'ayant des appellations différentes (tableau II).

BY-NC-ND

Gènes impliqués dans le processus autophagique		
Gènes chez la levure	Homologue(s) chez les mammifères	Autres appellations
Atg1	*-ULK1/2,*	*-ATG1, ATG1A, UNC51, hAUG1, Unc51.1*
ATG2	*-ATG2 (isoformes A et B)*	
ATG3	*-ATG3*	*-APG3, APG3L, PC3-96, APG3-LIKE*
ATG4	*-ATG4 (isoformes A, B, C et D)*	*-APG4, AUTL2*
ATG5	*-ATG5*	*-ASP, APG5, APG5L, hAPG5, APG5-LIKE*
ATG6	*-BECN1*	*-ATG6, VPS30, beclin1*
ATG7	*-ATG7*	*-GSA7, APG7L, APG7-LIKE*
ATG8	*-mATG8L* *-GABARAPL1* *-GATE16* *-LC3 (isoformes A-a, A-b, B et C)*	*-APG8L, ATG8B, ATG8L, APG8-LIKE* *-GEC1* *-GABARAPL2, GEF2* *-MPA1LC3B*
ATG9	*-ATG9 (isoformes A et B)*	*-mATG9, ATG9L1, MGD3208*
ATG 10	*-ATG10*	*-APG10, APG10L, pp12616*
ATG 12	*-ATG12*	*-APG12, FBR93, APG12L, HAPG12*
ATG 13	*-ATG13*	*-KIAA0652 PARATARG8*
ATG 14	*-ATG14*	*-ATG14L, BARKOR, KIAA0831*
ATG 16	*-ATG16L1*	*-IBD10, WDR30, APG16L, ATG16A*
ATG 17	*-FIP200*	*-CC1, ATG17, PPP1R131*
ATG 18	*-WIPI-1, 2 (homologue d'ATG21), 3 et 4*	*-ATG21, ATG18B, CGI-50*
ATG 21	*-ATG21*	*-ATG18B, CGI-50, WIPI-2 (homologue d'ATG18)*
ATG 24	*-ATG24A*	*-SNX30*
ATG 27	*-LAMPs ?*	
ATG40	*-FAM134B*	
Mug66	*-ATG101*	
PEX14	*-PEX14*	

BY-NC-ND

VPS15	*-PIK3R4*	*-Vps15, p150*
VPS34	*-PIK3C3*	*-hVps34, Vps34*
VPS38	*-UVRAG*	*-p63, DHTX,*
?	*-Afly*	*-WDFY3*
?	*-AMBRA1, DCAF3, WDR94*	
?	*-DFCP1*	*-ZFYVE1, SR3, TAFF1, ZNFN2A1, PPP1R172*
?	*-FYCO1*	
?	*-MTMR14*	*-C3orf29*
?	*-MTMR3*	
?	*-NBR1*	
?	*-NDP52*	
?	*-NIX/BNIP3L*	
?	*-PARK2*	
?	*-PINK1*	*-PARK6*
?	*-RUBCN*	*-Rubicon, SCAR15, KIAA0226*
?	*-SQSTM1*	*- p62, p60, A170, DMRV, OSIL, PDB3, ZIP3, p62B, NADGP, FTDALS3*

Tableau II : Gènes impliqués dans le processus autophagique chez les mammifères et équivalents chez la levure

Le processus autophagique peut être divisé en 3 grandes étapes : la formation de l'autophagosome, sa fusion avec le lysosome/endosome tardif et la dégradation du contenu de l'autophagosome. Chez la levure, les protéines impliquées dans la formation de l'autophagosome se rassemblent en un point appelé PAS (Phagophore Assembly Site). Cette structure ne semble pas exister chez les mammifères, cependant de multiples sites d'assemblage de l'autophagosome ont été observés, au niveau du RE (Réticulum Endoplasmique), du Golgi, des endosomes et des mitochondries (Feng et al., 2014). En effet, l'initiation de l'autophagie nécessite la présence d'une membrane à partir de laquelle va se former l'autophagosome. Le scénario le plus observé est la formation de l'autophagosome à partir de compartiments associés à la membrane du RE. Ces compartiments sont riches en phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) et en protéines à domaine FYVE. On appelle ces compartiments omégasomes du fait de leur structure en forme d'oméga (Ao et al., 2014).

BY-NC-ND

Progressivement la membrane va s'allonger autour du matériel à recycler et former un phagophore qui va maturer en autophagosome. Il fusionne ensuite avec un lysosome donnant naissance à un autophagolysosome qui va s'acidifier afin de dégrader son contenu. Les produits obtenus (peptides, acides aminés, acides nucléiques, lipides…) vont ensuite être réutilisés par la cellule (figure 11) (Trocoli and Djavaheri-Mergny, 2011).

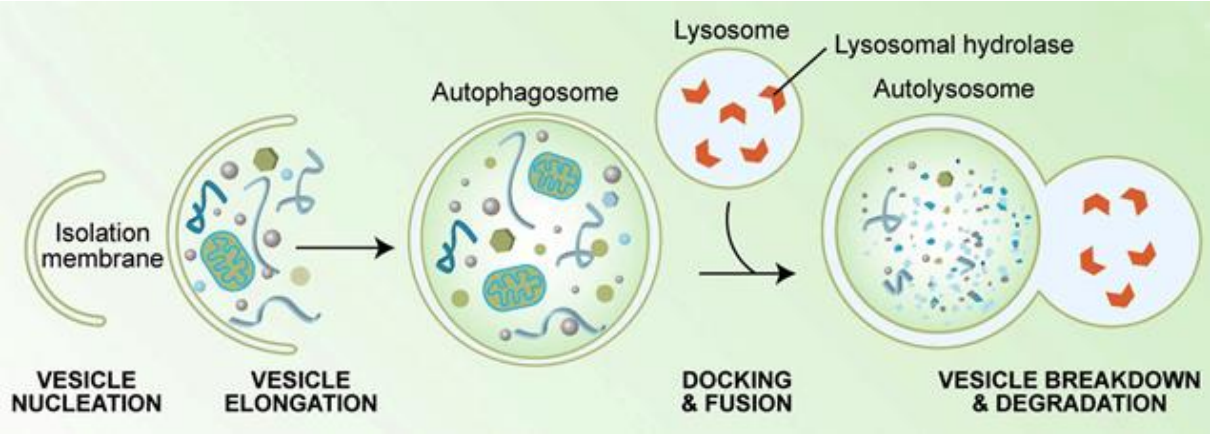


Figure 11 : Les grandes étapes de l'autophagie
D'après (Meléndez and Levine, 2009). La macroautophagie permet le recyclage de matériel qui est capturé par une membrane pour former l'autophagosome, puis dégradé grâce à la fusion avec la lysosome et remis en circulation pour être réutilisé.

Ces étapes sont assurées principalement par les protéines ATG « core ». Ces protéines forment 4 complexes qui vont jouer des rôles différents. Pour plus de clarté, nous ne détaillerons que les complexes mammaliens (figure 12).

BY-NC-ND

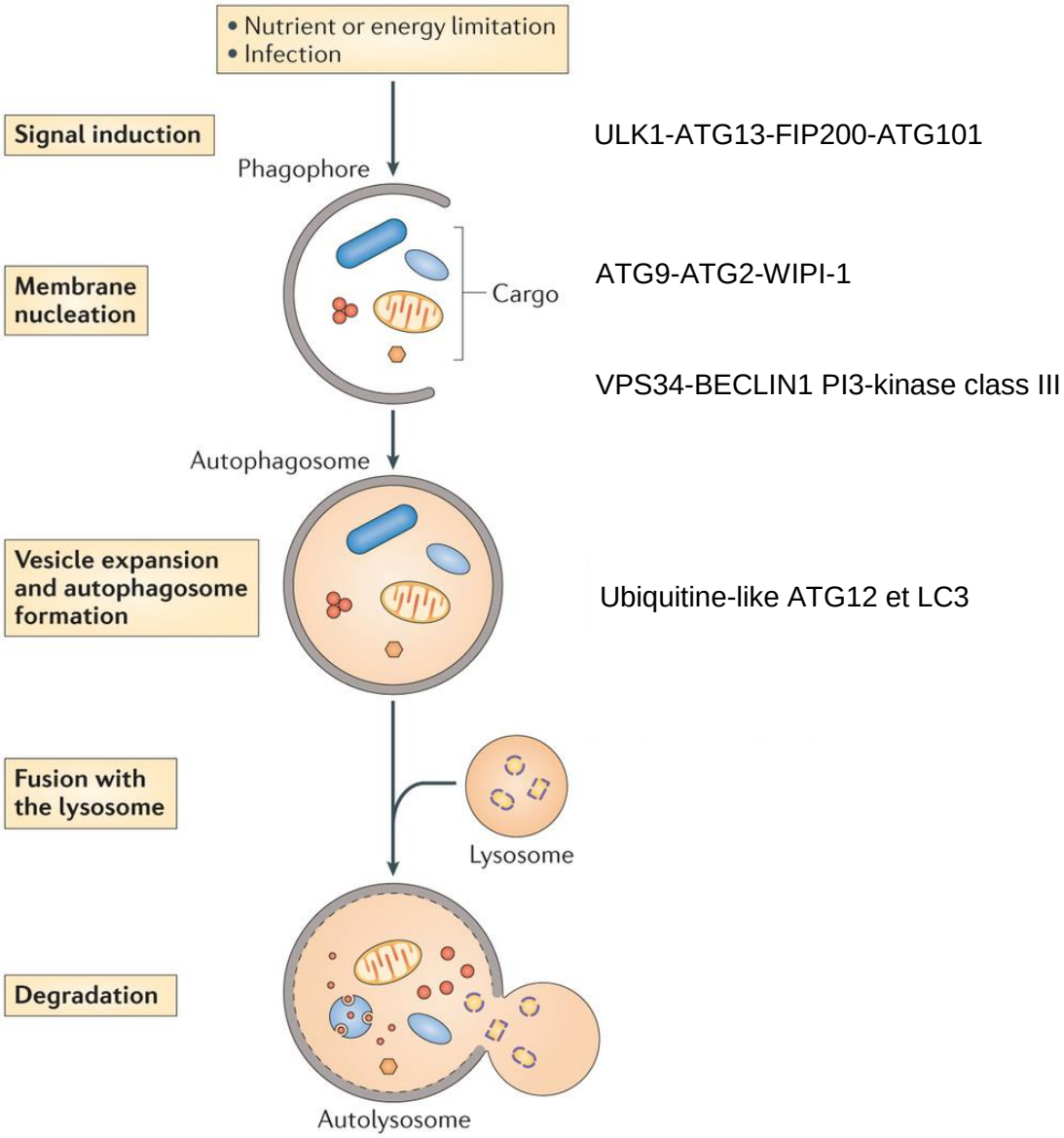


Figure 12 : **Protéines impliquées dans les différentes étapes de l'autophagie**

D'après (Huang and Brumell, 2014). Différents complexes interviennent dans le processus autophagique : le complexe ULK1 qui débute en recrutant le phagophore, le complexe ATG9 qui démarre la formation de l'autophagosome, le complexe VPS34 qui continue la formation de l 'autophagosome et assure sa maturation et le complexe LC3 qui participe également à la formation et à la maturation de l'autophagosome ainsi qu'à sa fusion avec le lysosome.

<u>Le complexe ULK1 :</u> Il est composé des protéines ULK1 qui est une protéine kinase, ATG13, FIP200 et ATG101 et débute le processus en formant l'omégasome. FIP200 qui appartient à la famille des « Focal Adhesion kinases » (FAK) participe à la stabilité et la phosphorylation d'ULK1. ATG101 est également impliquée dans la stabilité et la phosphorylation basale d'ULK1, ainsi que d'ATG13. ATG13 recrute ATG14 qui fait partie du complexe Vps34-Beclin1 PI3K de classe III, ce qui suggère une interaction entre ces deux complexes (Tanida, 2011).

BY-NC-ND

Le complexe ATG9-ATG2-WIPI-1 : Il intervient au début de la formation de l'autophagosome (Ao et al., 2014). En conditions riches en nutriments, ATG9 (protéine exprimée dans les membranes cellulaires) se trouve dans le réseau trans-golgien et dans les endosomes. Mais lorsque l'accès aux nutriments est limité, ATG9 est déplacée vers les autophagosomes en formation, grâce à l'action d'ULK1. Durant le processus autophagique, ATG9 et WIPI-1 se trouvent co-localisés au niveau de points « LC3-positifs » ce qui permet de cibler le site d'assemblage de l'autophagosome. La protéine ATG2 a été récemment identifiée chez les mammifères où deux isoformes existent, ATG2A et ATG2B (Velikkakath et al., 2012).

Le complexe VPS34-Beclin1 PI3-kinase de classe III : Ces trois éléments constituent la structure de base de ce complexe mais sa composition s'adapte selon sa fonction en agrégeant d'autres protéines (Matsunaga et al., 2009). Chez les mammifères, il existe au moins 3 configurations de ce complexe.

- Le complexe ATG14-Vps34-Vps15-Beclin1 est nécessaire à la formation de l'autophagosome ;
- Le complexe UVRAG/Vps38-Vps34-Vps15-Beclin1 participe à la maturation de l'autophagosome et au trafic endocytique ;
- Le complexe Rubicon-UVRAG-Vps38-Vps34-Vps15-Beclin1, à l'inverse, régule négativement la maturation de l'autophagosome et le trafic endocytique.

L'autophagie dépendante de Beclin1 est activée par la protéine Ambra1, grâce à son domaine WD40. Elle joue un rôle primordial dans l'embryogenèse (Tanida, 2011). Mais il a été montré que Beclin1 n'est pas toujours nécessaire à l'induction de l'autophagie, puisqu'il existe une voie non canonique, Beclin1-indépendante (Scarlatti et al., 2008). Il a aussi été montré dans les neurones senseurs, que la formation de l'autophagosome et la mise en place de l'autophagie pouvaient se faire indépendamment de Vsp34, mais cela requiert alors la présence d'ATG7 (Zhou et al., 2010).

Les systèmes de conjugaison Ubiquitine-like ATG12 et LC3 : Ces deux systèmes participent à l'élongation du phagophore et à la maturation de l'autophagosome. Pour le premier système, ATG12 est activé par ATG7 (enzyme E1-like), puis transféré via ATG10 (enzyme E2-like) pour être conjugué à ATG5 et former le complexe ATG12-ATG5. Le second système, LC3, est particulier puisqu'il cible un phospholipide, la phosphatidyléthanolamine (PE). C'est pourquoi on l'appelle système de lipidation. La LC3 intervient dans l'élongation de la membrane et l'hémifusion. Elle est synthétisée sous forme de pro-LC3, puis est clivée par ATG4B, activée par ATG7 et transférée via

BY-NC-ND

ATG3 pour être conjuguée à la PE (Schaaf et al., 2016). Le complexe LC3-PE, associé à la membrane autophagosomale, est appelé LC3II et la LC3 cytosolique, LC3I. Du fait de l'existence de ces deux formes, la LC3 est utilisée comme un marqueur autophagosomal majeur (Kabeya et al., 2000; Klionsky et al., 2012). Lorsque la formation de l'autophagosome est effectuée, le complexe LC3-PE est clivé, côté cytosolique, par ATG4B afin de délipider et recycler la LC3. Il semble que ce recyclage soit essentiel pour que l'autophagie soit efficace. Cependant seule la LC3II se trouvant sur la face cytosolique de la membrane pourra être délipidée par ATG4B. Celle restant à l'intérieur de l'autophagosome devient un substrat du processus et sera dégradée par autophagie, ce qui permet de suivre le flux autophagique. La protéine LC3 est le plus connu des homologues mammaliens d'ATG8, mais trois autres ont été identifiés, GABARAP, GATE-16 et mATG8L. Ils vont également être modifiés par ATG4 (ATG4A pour GATE-16 et ATG4B pour GABARAP et mATG8L), ATG7 et ATG3. Ils pourront être lipidés pour devenir GATE-16-II, GABARAP-II et mATG8L-II. Comme la LC3II, GABARAP-II est transmembranaire et lorsqu'elle est localisée sur la face cytoplasmique, elle est délipidée par ATG4 (Kaminskyy and Zhivotovsky, 2012). La protéine ATG16L détermine le site où va avoir lieu la lipidation de la LC3, et donc l'emplacement de formation de l'autophagosome. De plus, le complexe ATG16/ATG12-ATG5 pourrait agir comme une enzyme E3-like pour faciliter la lipidation de la LC3 et pourrait participer à la détermination de l'emplacement de la mise en place de l'autophagie (Tanida, 2011).

Pour finir, l'autophagosome fusionne avec le lysosome et forme un autophagolysosome, qui n'a plus qu'une seule membrane, afin que son contenu soit dégradé grâce à l'acidification du compartiment (Mauvezin et al., 2015).

Bien qu'elles soient moins spécifiques que la CMA, la micro- et la macro-autophagie peuvent tout de même cibler spécifiquement certains substrats. Il existe par exemple une mitophagie, qui permet l'élimination spécifique des mitochondries par micro- ou macro-autophagie (Palikaras and Tavernarakis, 2014).

L'autophagie est un processus qui peut être à la fois bénéfique et létal pour la cellule. C'est pourquoi sa régulation est très importante (Poklepovic and Gewirtz, 2014).

II.3. Régulation de l'autophagie

Les systèmes de régulation directe de l'autophagie impliquent principalement deux kinases, l'AMPK (AMP-activated Protein Kinase) et mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) et secondairement la PKA (protéine kinase A) (figure 13).

BY-NC-ND

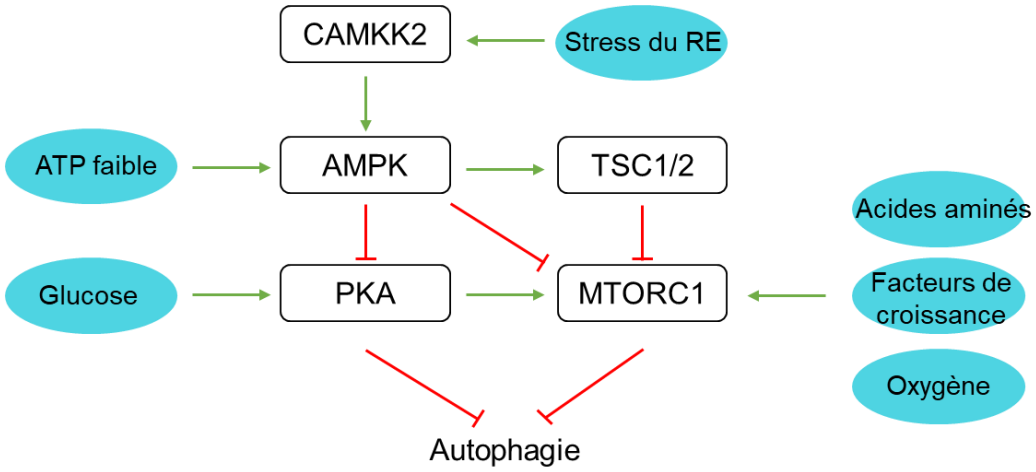


Figure 13 : Régulation de l'autophagie
D'après (Parzych and Klionsky, 2014). La régulation de l'autophagie est assurée par des protéines kinases, les deux principales sont l'AMPK et mTORC1, mais la PKA peut également participer.

II.3.1. La protéine kinase AMP-dépendante (AMPK)

L'AMPK est un senseur de la disponibilité en énergie. Elle est capable de détecter les niveaux d'ATP et d'AMP intracellulaires et s'active en cas de stress pour déclencher l'autophagie (Meley et al., 2006). Lorsque la disponibilité en énergie est faible, la cellule contient majoritairement de l'AMP qui se lie à l'AMPK et stimule son activité kinase (Hardie, 2007). L'AMPK est alors capable d'inhiber mTORC1, soit directement (Yang and Klionsky, 2010), soit indirectement, *via* la phosphorylation et l'activation du complexe TSC1/2, un inhibiteur de mTORC1 (Inoki et al., 2003). Les niveaux d'ATP et d'AMP varient en fonction de la disponibilité en glucose, mais également en fonction de la disponibilité en oxygène. Des conditions hypoxiques peuvent donc déclencher l'activation de l'AMPK (Gabryel et al., 2014). L'AMPK peut également induire l'autophagie plus directement, en activant ULK1 (Kim et al., 2011).

II.3.2. mTOR

mTOR est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la voie de signalisation des facteurs de croissance en aval de la PI3K/Akt (Alayev and Holz, 2013). mTOR est impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire et de la prolifération (Brown et al., 1994). Ses cibles principales sont le facteur 4E-BP1 (4E binding protein 1), inhibiteur du facteur elf4E (initiateur de la traduction) et la S6K1 (p70 ribosomal S6 kinase). Elle interagit avec d'autres protéines pour former deux complexes mTORC1 et mTORC2. Le complexe mTORC1 intervient dans la synthèse des protéines nécessaires à la croissance et à la prolifération

BY-NC-ND

cellulaire, la synthèse lipidique, le métabolisme mitochondrial et l'autophagie. Seul mTORC1 est sensible à la rapamycine, son inhibiteur (Ganley et al., 2009; Holz, 2012). La fonction de mTORC2 est peu connue, il a tout de même été montré que ce complexe intervient dans l'activation d'Akt, il peut donc moduler l'autophagie (Guertin et al., 2006).

L'activation de mTORC1 nécessite la disponibilité d'une quantité suffisante d'acides aminés, sans quoi le complexe devient réfractaire aux signaux d'activation (Kim et al., 2003; Proud, 2002; Reiling and Sabatini, 2006). Cette régulation évite les pertes d'énergie inutiles. L'activation de mTORC1 se situe principalement en aval de la voie des facteurs de croissance. Ils activent la voie PI3K, qui, par la génération de PIP3, engage en aval le recrutement d'Akt à la membrane plasmique. Celle-ci est activée par l'action conjointe de PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase 1) et du complexe mTORC2 (dans la plupart des cas, mais la PI3K peut activer directement Akt). Akt est responsable de la phosphorylation d'un grand nombre de cibles impliquées dans la prolifération et la survie. Elle va par exemple phosphoryler TSC2, une sous-unité du complexe TSC, inhibiteur de la GTPase RHEB (Ras homolog enriched in brain). La phosphorylation de TSC2 entraine l'arrêt de l'activité inhibitrice du complexe TSC sur la protéine RHEB, qui est alors capable d'activer mTORC1 (Mendoza et al., 2011; Sengupta et al., 2010)(Mendoza et al., 2011; Sengupta et al., 2010). Sans facteurs de croissance, la voie PI3K/Akt n'est pas activée et l'inhibition de RHEB par le complexe TSC n'est pas levée, donc mTORC1 reste inactif (figure 14) et n'exerce plus son rôle inhibiteur de l'autophagie.

BY-NC-ND

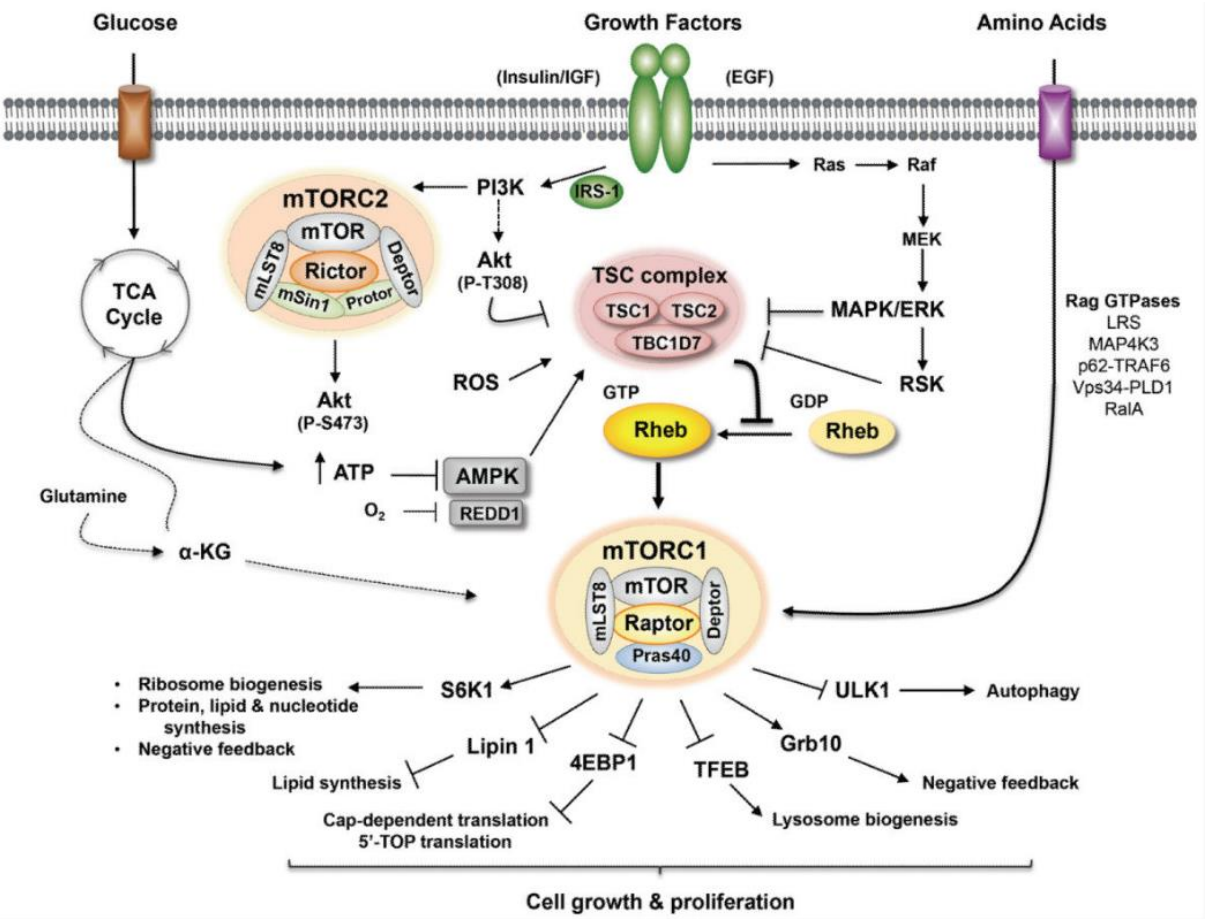


Figure 14 : Régulation de la signalisation des complexes mTORC1 et mTORC2
D'après (Huang and Fingar, 2014). La régulation des complexes mTORC1 et mTORC2 par la disponibilité en nutriments, facteurs de croissance et acides aminés assure le contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire.

II.3.3. Autres régulateurs

La PKA est capable de réguler l'autophagie en phosphorylant la protéine LC3, ce qui empêche son incorporation dans les autophagosomes et ainsi inhibe l'autophagie (Cherra et al., 2010). Elle favorise également la régulation *via* l'activation indirecte de mTORC1 par l'inhibition de l'AMPK (Djouder et al., 2010).

L'autophagie peut également être régulée par la MAPK JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) à différents niveaux, notamment par la phosphorylation de protéines de la famille Bcl-2 et par la modulation de l'expression des gènes liés à l'autophagie (Zhou et al., 2015)(Zhou et al., 2015). La protéine p53 participe également à la régulation de l'autophagie, en fonction de sa localisation. Il est classiquement décrit que lorsqu'elle est cytoplasmique elle l'inhibe, et qu'elle devient activatrice lorsqu'elle est nucléaire par sa fonction de facteur de transcription (Tang et al., 2015; Tasdemir et al., 2008). Cependant, notre équipe a observée dans un modèle de neuroblastome que la présence de p53 mutée dans son domaine de transactivation

BY-NC-ND

(donc dépourvue d'activité transcriptionnelle) était néanmoins capable d'activer l'autophagie en réponse à un stress hypoxique (Naves et al., 2013). Les sirtuines (Sirt1 et Sirt2), des histones déacétylases, jouent aussi un rôle dans la régulation de l'autophagie (Ng and Tang, 2013). Sirt1, par la déacétylation d'ATG5, ATG7 et ATG8, permet l'activation de l'autophagie. Elle déacétyle également la protéine FoxO1 qui va alors activer la transcription de gènes impliqués dans l'autophagie (Lee et al., 2012).

L'autophagie peut également être inhibée chimiquement par différentes drogues.

II.3.4. Modulation pharmacologique

Bien que cela ne soit pas leur but premier, certaines molécules agissent sur l'autophagie, en l'inhibant, ou au contraire en l'activant (Galluzzi et al., 2017). D'autres médicaments ont été identifiés pour avoir une activité sur l'autophagie.

Certains traitements activent l'autophagie, comme par exemple le Verapamil (Kania et al., 2017), qui est un traitement de l'hypertension et de l'arythmie cardiaque, ou la Thioridazine (Cheng et al., 2015), qui est un anti-psychotique. La rapamycine active également l'autophagie, il s'agit inhibiteur spécifique de la protéine mTOR, elle-même inhibitrice de l'autophagie (Harder et al., 2014).

L'exemple de la chloroquine, est particulièrement intéressant. En effet, cet agent anti-malaria provoque une inhibition de l'autophagie en bloquant la fusion entre l'autophagosome et le lysosome (Golden et al., 2014). Cet aspect de son activité a initié des recherches pour l'application dans le traitement du cancer, notamment un essai clinique de phase I/II réalisé chez des patients atteints de glioblastome, qui associe un traitement à l'hydroxychloroquine à de la radiothérapie et de la chimiothérapie au Témozolomide habituelles. Cette combinaison offre cependant une faible efficacité car l'inhibition de l'autophagie est trop faible par rapport à l'autophagie induite par le TMZ (Rosenfeld et al., 2014).

D'autres l'inhibent, comme par exemple la Monensine, qui est un antibiotique, ou la Verteporfine, qui est un traitement de la myopie et de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2015).

En dehors de ces médicaments, dont l'activité sur l'autophagie n'est que secondaire, des molécules, spécifiquement sélectionnés pour leur capacité à moduler l'autophagie, sont utilisés en recherche. La plupart sont des inhibiteurs de l'autophagie. On trouve les inhibiteurs de PI3K, comme la 3-Méthyladénine (3-MA), la Wortmannin et la LY294002, ainsi que deux nouveaux, le PT210 et le GSK-2126458 (McNamara and Degterev, 2011), qui ciblent Ulk1. On trouve enfin les inhibiteurs tardifs, qui inhibent la dégradation du contenu autophagosomal par

BY-NC-ND

le lysosome. Parmi eux, la Pepstatine A et l'E64d inhibent les protéases lysosomales. La Bafilomycine A1 bloque le transport des protons des lysosomes, inhibant ainsi les hydrolases. La Desmethylclomipramine bloque la fusion autophagosome-lysosome. La Lucanthone perturbe la perméabilisation de la membrane lysosomale. La Chloroquine (CQ) and l'Hydroxychloroquine (HCQ), précédemment évoquées, inhibent l'acidification lysosomale. Elles font partie des agents lysosomotropiques, au même titre que la Lys05, qui entraine une augmentation du pH lysosomal, et l'ARN5187, qui bloque la maturation finale de l'autophagolysosome (Pasquier, 2016).

II.4. Autophagie et cancer

Il a été mis en évidence que l'autophagie intervient dans les cancers, initialement comme un mécanisme anti-tumoral (Liang et al., 1999; Mathew et al., 2007). Il a cependant été montré depuis, que ce processus pouvait jouer un rôle pro-tumoral (Yang et al., 2014). Bien que l'autophagie puisse avoir un rôle protecteur contre le cancer en évitant par exemple le stress oxydatif, son rôle pro-tumoral devient dominant quand la tumeur est installée. En effet, grâce à elle, la cellule survit sans apport extérieur, ce qui est indispensable du fait de l'absence de vascularisation du cœur des tumeurs solides ; elle permet également d'éliminer les éléments toxiques produits notamment par l'altération de l'ADN par les traitements (White, 2015). L'action de l'autophagie dépend donc essentiellement du stade auquel elle intervient : en phase précoce, elle aura plutôt un rôle anti-tumoral alors qu'à un stade tardif elle aura plutôt un rôle pro-tumoral (Bhutia et al., 2013)

Il a de plus été montré que l'autophagie représente un mécanisme de protection fortement amplifié par les cellules souches cancéreuses (CSC) et que ce mécanisme favorise leur survie (Vitale et al., 2015). Les CSC se trouvent en effet fréquemment dans des niches fortement hypoxiques et non vascularisées, ce qui les force à survivre sans apport extérieur. Comme nous l'avons précédemment évoqué, les CSC représentent une cible thérapeutique potentielle et, du fait de l'activité cytoprotectrice de l'autophagie, il pourrait être intéressant de cibler ce mécanisme.

L'autophagie n'est pas le seul mécanisme dérégulé dans le cancer, en effet, les cellules tumorales détournent également la signalisation des facteurs de croissance à leur avantage. Parmi eux, certains ont été initialement découvert dans système nerveux central, ce sont les neurotrophines. Du fait de cette spécificité et de leur implication connue dans le cancer nous nous y sommes intéressés.

BY-NC-ND

Chapitre III. Les Neurotrophines

III.1. Généralités

Les neurotrophines sont des facteurs de croissance initialement considérées comme spécifiques du système nerveux central chez les mammifères. Elles sont surtout connues pour leur implication dans la prolifération et la différenciation de différents types cellulaires durant le développement embryonnaire et la survie des neurones du système nerveux adulte (Menn et al., 1998). La première, découverte dans les années 50, est le Nerve Growth Factor (NGF) (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951) Le NGF est impliqué dans la régulation de la survie, de la croissance des neurites et de la production de neurotransmetteurs (Korsching, 1993; Tessarollo, 1998). Cette famille comprend également le brain derived neurotrophic factor (BDNF), découvert 30 ans plus tard (Barde et al., 1982). Par la suite, ont également été identifées la neurotrophine 3 (NT-3) et la neurotrophine 4/5 (NT-4/5), exprimées par les cellules de mammifères, ainsi que les neurotrophines 6 (NT-6) et 7 (NT-7), uniquement retrouvées chez le poisson (Götz et al., 1994; Lai et al., 1998; Lewin and Barde, 1996).

Les neurotrophines sont synthétisées sous forme de précurseurs, les pré-pro-neurotrophines. Elles sont constituées d'un peptide signal en N-terminal, du pro-peptide et de la neurotrophine mature (Rafieva and Gasanov, 2016). Le peptide signal est clivé dans le RE, puis la pro-neurotrophine transite vers le Golgi où elle va subir des modifications post-traductionnelles ainsi qu'un nouveau clivage pour devenir une neurotrophine mature (Al-Qudah and Al-Dwairi, 2016). La pro-neurotrophine peut également rester sous cette forme et être libérée dans le cytoplasme (Sun et al., 2013).

III.2. Les récepteurs aux neurotrophines

Les neurotrophines activent la signalisation cellulaire en se liant à des récepteurs d'affinité variable. Le récepteur $p75^{NTR}$ (p75 neurotrophin receptor), le premier à avoir été découvert, est un récepteur liant toutes les neurotrophines avec une faible affinité (Frade and Barde, 1998; Rodriguez-Tebar et al., 1990) et pouvant également fixer les pro-neurotrophines avec une forte affinité. Ce récepteur appartient à la super-famille des « tumour necrosis factor receptor » (Reichardt, 2006) et, en fonction du ligand, sa signalisation peut entrainer l'apoptose ou la survie cellulaire.

Les neurotrophines peuvent aussi se lier à trois autres récepteurs, de haute affinité, de type tyrosine kinase, les TRK (Tropomyosin Receptor Kinase) ou NTRK (Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase) (Barbacid, 1993; Meakin and Shooter, 1991). Ces trois récepteurs présentent une forte homologie de séquence et dérivent d'un même gène ancestral. TRK-B et

BY-NC-ND

TRK-C ont été identifiés après TRK-A, grâce à l'homologie entre leurs séquences (Huang and Reichardt, 2003). TRK-A interagit spécifiquement avec le NGF (Hempstead et al., 1991; Kaplan et al., 1991), TrkB avec le BDNF (Klein et al., 1991; Soppet et al., 1991; Squinto et al., 1991) et la NT-4/5 (Ip et al., 1992; Klein et al., 1992) et TrkC avec la NT-3 (Lamballe et al., 1991; Urfer et al., 1995). La NT-3 exprimée par les cellules fibroblastiques NIH3T3 peut aussi se lier à TrkA et TrkB et les activer. Cependant, dans des cellules PC12, ou dans un environnement plus physiologique, comme des neurones sensoriels, TrkA et TrkB ne semblent pas transduire de signal après fixation de la NT-3, même s'ils sont activés (Lamballe et al., 1993).

III.2.1. Structure générale

Les récepteurs Trk sont constitués de trois domaines, un domaine extracellulaire en N-terminal, contenant trois motifs riches en leucines (LRR : *leucine-rich repeats*), entourés de deux motifs riches en cystéines (CRR), ainsi que deux domaines *Ig-like* dans la région la plus proche de la membrane (Arévalo and Wu, 2006). Le récepteur est ancré dans la membrane via un unique domaine transmembranaire et présente une partie intracellulaire contenant le domaine tyrosine kinase. Le domaine extracellulaire contient des sites de *N*-glycosylation et est fortement glycosylé (figure 14) (Deinhardt and Chao, 2014). Il a été montré que lorsque ces sites ne sont pas glycosylés, le récepteur TrkA est constitutivement actif et capable de s'auto-phosphoryler en absence de son ligand. Cependant dans ce cas il n'est pas transmembranaire, car la N-glycosylation permet l'adressage du récepteur à la membrane, et ne permet donc pas l'activation des voies de signalisation en aval (Watson et al., 1999).

Le récepteur interagit avec son ligand via les domaines *Ig-C2* (Urfer et al., 1995). Pour un même récepteur, la spécificité pour le ligand peut varier en fonction de l'épissage de l'ARNm qui conduit à la production de différentes isoformes (Boeshore et al., 1999; Clary and Reichardt, 1994). Il existe également des isoformes dans lesquelles le domaine kinase de la partie intracellulaire est tronqué. Ces isoformes tronquées sont fortement exprimées dans le système nerveux mature. Elles ont été découvertes plus tardivement que les formes complètes et sont moins connues. Bien qu'il ait aujourd'hui été montré que ces formes sont capables de signaliser de manière différente (Esteban et al., 2006; Ohira et al., 2005), plusieurs hypothèses ont été émises lors de leurs découvertes, notamment le fait qu'elles servent de compétiteurs avec la forme catalytique et limitent ainsi la signalisation (Okazawa et al., 1993).

La structure du récepteur $p75^{NTR}$ est différente, surtout dans le domaine intracellulaire. Il possède une partie extracellulaire présentant quatre domaines répétés, riches en cystéines (He and Garcia, 2004). Il est ancré dans la membrane par un domaine transmembranaire unique. La région intra-cytoplasmique présente un domaine de mort (Roux and Barker, 2002).

BY-NC-ND

De la même manière que les autres récepteurs de la famille des *tumor necrosis factor receptor* (TNFR), $p75^{NTR}$ ne porte pas d'activité enzymatique. Comme les autres récepteurs aux NT, il existe plusieurs isoformes du récepteur $p75^{NTR}$. Ces isoformes peuvent être issues d'un épissage alternatif, ou d'une protéolyse. L'isoforme issue de l'épissage alternatif ne possède pas la partie permettant la liaison des neurotrophines, le rôle de cette forme est inconnu (Dechant et al., 1997). La forme clivée du récepteur est obtenue grâce à l'activité d'une métalloprotéase de la MEC, la tumor necrosis factor-α-converting enzyme (TACE/ADAM-17) et conduit à la formation d'un récepteur en deux parties, le domaine extracellulaire soluble, toujours capable de lier les NT, et le domaine intracellulaire, resté lié à la membrane. Le rôle de ce récepteur soluble est peu connu (DiStefano et al., 1993) mais il est probable qu'il soit un antagoniste compétiteur du récepteur transmembranaire (Jones and Rose-John, 2002).

BY-NC-ND

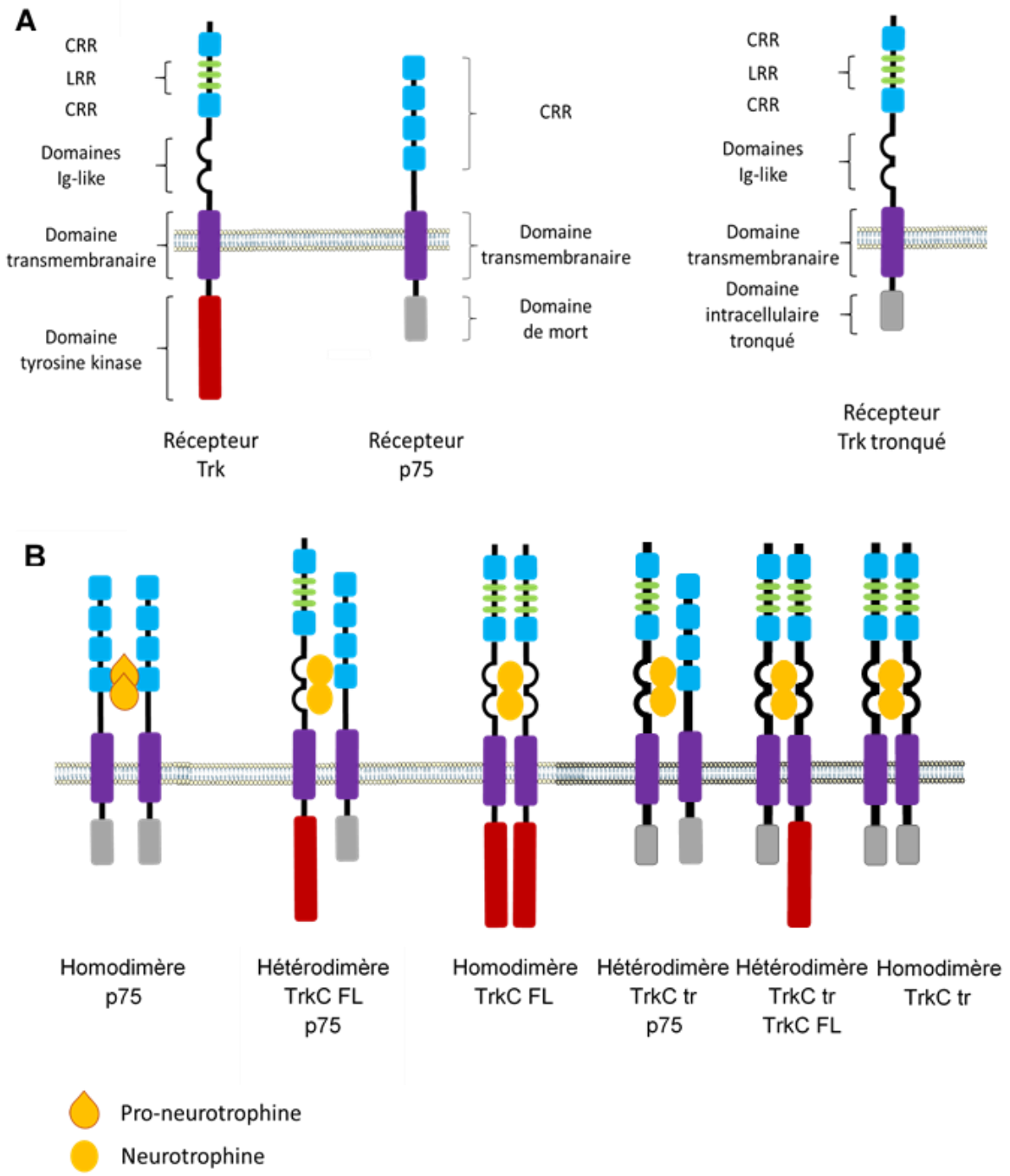


Figure 14 : Structure et dimérisation des récepteurs aux neurotrophines
Adapté de (Arévalo and Wu, 2006). (A) Les récepteurs Trk entiers et tronqués partagent la même structure, excepté le domaine intracellulaire. La structure du récepteur $p75^{NTR}$ diffère principalement par son domaine intracellulaire. (B) Les récepteurs peuvent s'homodimériser ou s'hétérodimériser pour former différentes sortes de complexes.

BY-NC-ND

III.2.2. Les différents récepteurs

III.2.2.1. Récepteur de haute affinité

III.2.2.1.1. TrkA

Le récepteur TrkA est codé par le gène *NTRK1*, situé sur le chromosome 1. TrkA est exprimé dans le SNC, mais également dans les populations de neurones périphériques (Deinhardt and Chao, 2014). La signalisation induite par le couple TrkA/NGF participe à la survie des neurones, la croissance axonale et dendritique, la formation des synapses des neurones sympathiques et senseurs (Harrington and Ginty, 2013).

Il existe deux isoformes majeures du récepteur, TrkA-I, exprimé par les neurones, et TrkA-II, exprimé par les cellules non-neuronales (Brodeur et al., 2009). Ces deux formes sont actives et fixent le NGF avec la même affinité, mais l'isoforme TrkA-II peut également être activée par la NT3 (Clary and Reichardt, 1994). Une troisième isoforme, TrkA-III, constitutivement active, a été identifiée. Elle est également issue d'un épissage alternatif, favorisé par l'hypoxie, et a été principalement observée dans le neuroblastome. La signalisation activée par le TrkA-III inhibe celle du TrkA-I favorisant un phénotype résistant au stress hypoxique et augmentant l'angiogenèse (Tacconelli et al., 2004).

III.2.2.1.2. TrkB

Le récepteur TrkB est codé par le gène *NTRK2*, situé sur le chromosome 9. Contrairement aux deux autres récepteurs, TrkB est principalement exprimé dans le SNC (Deinhardt and Chao, 2014). Le couple BDNF/TrkB est impliqué dans la survie et la différenciation de neurones spécifiques du SNC, notamment des neurones senseurs (Lewin and Barde, 1996). Il a également été montré que la signalisation BDNF/TrkB intervient dans la plasticité synaptique (Yoshii and Constantine-Paton, 2010). Le couple BDNF/TrkB participe également à l'apprentissage (Andero et al., 2014) et joue par exemple un rôle dans la mémoire de la peur et dans l'aversion à la nourriture (Ma et al., 2011; Revest et al., 2014).

Il existe deux formes du récepteur TrkB, une forme dite « *full length* » (FL), entière, capable de transmettre un signal, exprimée sous deux isoformes selon l'épissage, et une forme tronquée, qui ne possède pas le domaine kinase intracellulaire (Nakagawara et al., 1995). Il existe au moins trois isoformes du variant tronqué, TrkBT1, TrkBT2 et TrkBT-Shc. La forme T1 ne contient pas de domaine kinase, mais un domaine intracytoplasmique qui lui est propre, sans activité catalytique qui régule l'activité kinase du récepteur entier (Middlemas et al., 1991). TrkBT1 est principalement exprimé par les cellules non-neuronales du SNC (Klein et al., 1990). TrkBT-Shc contient le site de liaison Shc, mais pas le domaine kinase, il est

BY-NC-ND

principalement exprimé dans le cerveau, mais son rôle n'est pas encore connu (Stoilov et al., 2002). Lorsqu'ils sont exprimés par des cellules non-neuronales, les récepteurs tronqués inhibent l'activité du récepteur complet en séquestrant le BDNF (Biffo et al., 1995).

III.2.2.1.3. TrkC

Le récepteur TrkC est codé par le gène *NTRK3*, situé sur le chromosome 15. TrkC est exprimé dans les systèmes nerveux et périphérique chez l'adulte et l'embryon (Ernfors et al., 1992; Lamballe et al., 1991, 1993; Merlio et al., 1992), mais également dans certains ganglions du système nerveux entérique autonome et dans des tissus non neuronaux (Lamballe et al., 1993; Tessarollo et al., 1993). Ces éléments suggèrent que TrkC est impliqué dans le maintien du système nerveux ainsi que de certains tissus non-neuronaux hautement spécialisés.

Il existe 4 isoformes principales chez l'homme résultant d'épissages alternatifs de produits issus du même locus (Shelton et al., 1995). Plusieurs isoformes ont également été identifiées chez différents animaux comme le rat et le chat (Forooghian et al., 2000; Shelton et al., 1995; Tsoulfas et al., 1993). Les deux formes principales du récepteur sont la forme « full-length » qui contient le domaine kinase et qui est donc capable d'induire une signalisation (Elkabes et al., 1995; Menn et al., 2000)(Elkabes et al., 1995; Menn et al., 2000) et la forme tronquée. Elle ne possède pas de domaine kinase, mais est tout de même capable de signaliser grâce à la fixation sur son domaine intracellulaire de la Tamaline qui va recruter ARF6 (Esteban et al., 2006; Menn et al., 1998).

III.2.2.2. Récepteur de faible affinité $p75^{NTR}$

Le récepteur $p75^{NTR}$ a d'abord été décrit comme récepteur au NGF (Johnson et al., 1986). Il a ensuite été montré que ce récepteur peut lier l'ensemble des neurotrophines matures, mais avec une affinité plus faible que les autres récepteurs (Rodriguez-Tebar et al., 1990)(Rodríguez-Tébar et al., 1991). Le récepteur $p75^{NTR}$ est codé par le gène *NGFR* (*nerve growth factor receptor*), situé sur le chromosome 17, il fait partie de la famille des *tumor necrosis factor* (TNF) *receptors*. Il est impliqué dans diverses réponses cellulaires, comme l'apoptose, la survie, la croissance des neurites, la migration et l'arrêt du cycle cellulaire (Shu et al., 2015).

Le récepteur $p75^{NTR}$ peut également fixer les pro-neurotrophines avec une affinité plus forte (Roux and Barker, 2002) (Lee et al., 2001). La fixation du pro-NGF au récepteur entraine une apoptose dans les neurones sympathiques (Hempstead, 2002, 2009). Pour qu'il y ait une signalisation, des protéines adaptatrices doivent venir se fixer sur le domaine intracellulaire du récepteur (Large et al., 1989).

BY-NC-ND

Il peut se dimériser avec les récepteurs Trk et augmente l'affinité de ces derniers pour leur neurotrophine. Contrairement aux homodimères $p75^{NTR}$ qui ont une activité pro-apoptotique, les hétérodimères p75/Trk vont plutôt avoir une activité pro-survie et pro-croissance (Meeker and Williams, 2015). En effet, lorsqu'il se dimérise avec le récepteur TrkA après la liaison du NGF sur les deux récepteurs, il favorise la survie cellulaire, alors que l'activation de l'homodimère $p75^{NTR}$ par le NGF conduit à l'apoptose (Niederhauser et al., 2000).

Les récepteurs aux neurotrophines, Trk comme $p75^{NTR}$, peuvent se lier à la sortiline, qui est le récepteur à la neurotensine. La sortiline est un récepteur de type I, exprimé dans le SNC et le SNP (Nykjaer and Willnow, 2012). Lorsqu'elle est liée au récepteur $p75^{NTR}$ elle augmente son affinité pour les pro-neurotrophines, ce qui favorise l'apoptose (Skeldal et al., 2012). Lorsqu'elle se lie aux récepteurs Trk, elle aide leur transport antérograde et favorise ainsi la survie des neurones (Vaegter et al., 2011)

III.3. Signalisation

III.3.1. Signalisation Trk

Les voies de signalisation impliquant les récepteurs Trk interviennent dans de nombreux processus neuronaux, notamment la survie cellulaire, la différenciation, la croissance et l'arborisation axonale et dendritique, la formation et la plasticité synaptiques (Arévalo and Wu, 2006). La majorité de ces voies est identique entre les différents récepteurs. Leur activation se fait en deux étapes. Dans un premier temps, le ligand se fixe au récepteur transmembranaire qui va alors se dimériser. Cette étape est indispensable pour que le récepteur puisse s'auto-phosphoryler et ainsi s'activer. Ces étapes sont communes aux récepteurs de type tyrosine kinase (Barbacid, 1995). En aval, les trois voies majeures de signalisation sont la voie PLC-γ (phospholipase C-γ), la voie PI3k-Akt (phosphatidylinositol 3-kinase – protéine kinase B) et la voie des MAP kinases passant par Erk (Extracellular signal-regulated kinase) (figure 15). L'activation de ces voies fait suite à la phosphorylation de tyrosines (Y) localisées dans la partie C-terminale du récepteur Trk (MacDonald et al., 2000). La voie activée dépendra de la place du résidu phosphorylé et de la protéine adaptatrice recrutée. La phosphorylation de Y785 entraine l'activation de la voie PLC-γ, alors que la phosphorylation de Y490 permet l'activation des voies PI3k-Akt et Erk (Deinhardt and Chao, 2014).

BY-NC-ND

III.3.1.1. Voie PLC-γ

Lorsque la tyrosine 785 (la plus proche de la région C-terminale) est phosphorylée, suite à la liaison d'une neurotrophine sur son récepteur Trk, la protéine PLC-γ va être recrutée et activée. Elle va produire du diacylglycerol (DAG) et de l'inositol tri-phosphate (IP_3) à partir de phosphatidylinositol-4,5-biphosphate ($PI(4,5)P_2$). L'IP_3 entraine une libération de Ca^{2+} intracellulaire qui va activer des enzymes calcium-dépendantes, comme les Ca^{2+}-calmodulin-regulated protein kinases (CaM kinases). Le DAG entraine l'activation de la protéine kinase C (PKC) (figure 15) (Huang and Reichardt, 2003).

III.3.1.2. La voie PI3k-Akt

La voie PI3k-Akt est activée lorsque la tyrosine phosphorylée est la plus proche du domaine transmembranaire (Y490 pour TrkA et Y515 pour TrkB) (Deinhardt and Chao, 2014a). Le recrutement de la PI3k peut se faire de façon directe ou passer par les protéines adaptatrices Shc, Grb2 et Gab. Une fois activé, la PI3k va elle-même activer Akt, *via* PDK1 et mTORC2. Une fois activée la protéine Akt intervient dans la régulation de l'activité de protéines anti-apoptotiques telles que Bad, de facteurs de transcriptions comme NFκB (nuclear factor kappa B), ou Foxo (Huang and Reichardt, 2003). Akt va aussi recruter et activer m-TOR qui va favoriser la synthèse protéique et la survie, via l'activation de la protéine S6K et l'inhibition de la 4E-BP (4E-Binding Protein) (figure 15) (Hay and Sonenberg, 2004). Comme indiqué plus haut, cette voie s'oppose donc à l'activation de l'autophagie.

III.3.1.3. La voie des MAP Kinases

La voie des MAP kinases est également activée par la phosphorylation de la tyrosine la plus proche du domaine transmembranaire. Un complexe Grb2–SOS (growth factor receptor bound protein 2 ; Son Of Sevenless) est recruté sur la tyrosine phosphorylée, ce qui entraine l'activation de Ras, par échange du GDP par du GTP, favorisé par Sos. Ras pourra ensuite activer la voie des MAP kinases, via Raf (aussi nommée MAP3K) et MEKK, qui phosphorylent en aval la protéine MEK 1/2 (MAPKK), qui active Erk1/2 ; des voies homologues conduisent à l'activation de la p38-MAPK ou de la JNK (Huang and Reichardt, 2003). L'activation de Ras est normalement transitoire, du fait de son activité GTPase intrinsèque, mais lorsqu'elle est mutée, son activité est prolongée et elle se comporte comme un oncogène, associé à la tumorigenèse, notamment pancréatique ou colique (Marshall, 1995).

Après activation du récepteur par les neurotrophines, le complexe est internalisé par endocytose (Patapoutian and Reichardt, 2001). Les récepteurs internalisés peuvent continuer soit d'assurer leur signalisation, soit être dégradés, soit ils seront renvoyés vers la membrane pour être recyclés (Deinhardt and Chao, 2014b).

BY-NC-ND

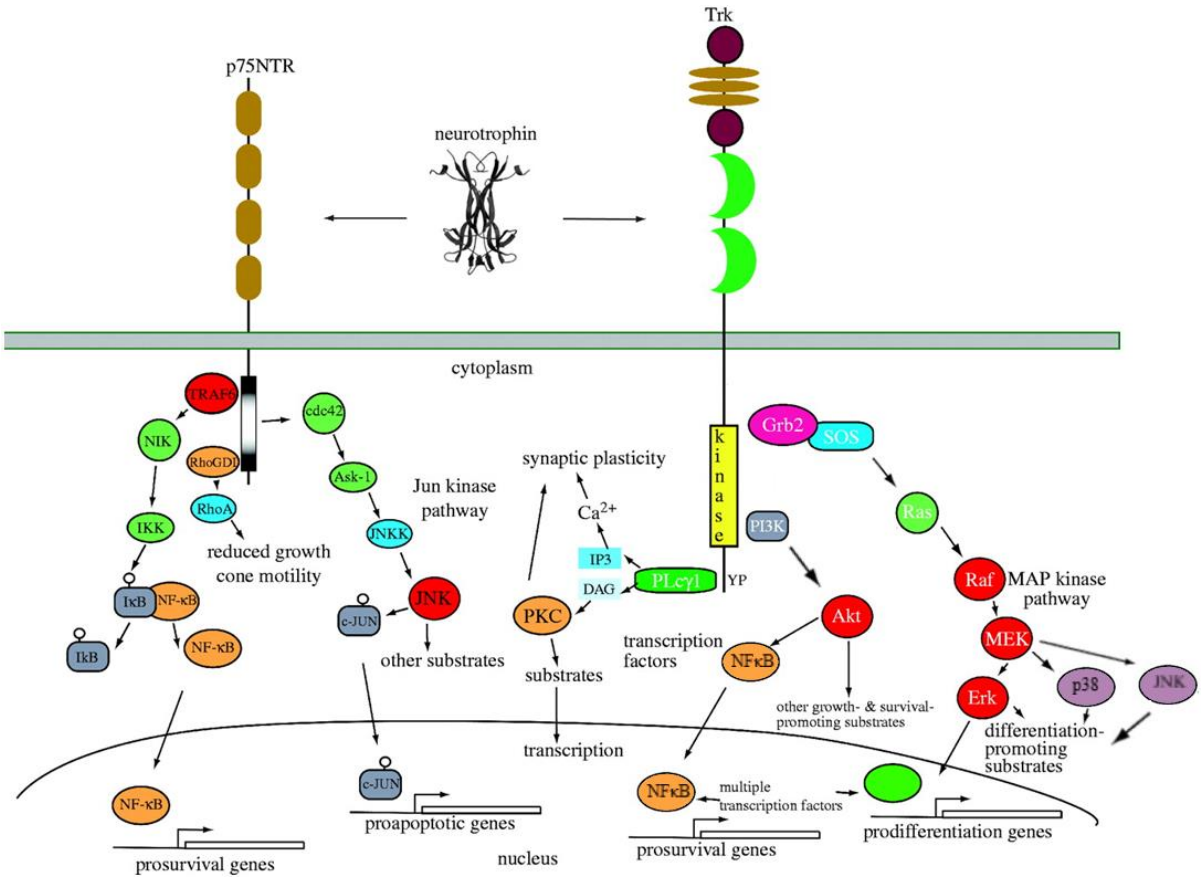


Figure 15 : Voies de signalisation des neurotrophines
D'après (Reichardt, 2006). La fixation des neurotrophines sur leurs récepteurs, Trk ou p75^{NTR} conduit à l'activation de différentes voies qui vont conduire à la transcription de gènes impliqués dans différents processus cellulaires : survie, différenciation, prolifération. Ces voies impliquent principalement les protéines Akt (Protéine Kinase B), Ask-1(Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1), cdc42 (Cell Division Control Protein 42 Homolog), c-JUN (Jun Proto-Oncogene), DAG (DiAcyl Glycérol), ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), Grb2 (Growth factor receptor-bound protein), IKK (IκB Kinase), IκB (Inhibitor of Kappa B), Ip3 (Inositol-1,4,5-triphosphate), JNK (c-Jun N-terminal Kinase), JNKK (Jnk-Activated Kinase), MEK (MAP ERK Kinase), NFκB (nuclear factor kappa B), NIK (NF-kappa-B-Inducing Kinase), p38 (p38 MAP Kinase), PI3K (Phosphatidyl Inositol Triphosphate Kinase), PKC (Protein Kinase C), PLCγ1(Phospholipase C gamma 1), Raf (Raf kinase), Ras (Ras GTPase activating protein), RhoA (Ras Homolog Gene Family, member A), RhoGDI (Rho GDP-Dissociation Inhibitors), SOS (Son Of Sevenless).

III.3.2. Signalisation p75^{NTR}

Il a été montré que le récepteur p75^{NTR} active les voies NF-κB, Akt et JNK (Roux and Barker, 2002). L'activation de JNK conduit à la mort cellulaire car elle induit la phosphorylation du facteur de transcription c-Jun et l'expression des gènes suppresseurs de tumeur p53 et p73. Cela entraine la transcription de gènes pro-apoptotiques comme Bax, PUMA, Bak et la Caspase-6. JNK va également phosphoryler directement des protéines de la famille Bcl-2. Les voies NF-κB et Akt sont quant à elles pro-survie (Kraemer et al., 2014).

BY-NC-ND

Il a été montré que $p75^{NTR}$ et TrkC sont des récepteurs à dépendance, en plus de signaliser lorsqu'ils fixent un ligand ils vont également induire un signal pro-apoptotique en absence de leur ligand (Goldschneider and Mehlen, 2010).

III.4. Neurotrophines et cancer

Il a été mis en évidence que les neurotrophines jouent un rôle dans le développement de tumeurs et favorisent la progression tumorale (Descamps et al., 2001; Kim et al., 2013; Ødegaard et al., 2007).

De nombreux travaux de notre laboratoire ont porté sur cette implication des neurotrophines dans différents types de cancers. Il a par exemple été montré que TrkB intervient dans le transfert d'agressivité dans le modèle du glioblastome, via des vésicules extracellulaires de transport appelées exosomes (Pinet et al., 2016). Il a aussi été mis en évidence que $p75^{NTR}$ et le pro-BDNF participent à la survie des cellules tumorales dans un modèle de cancer rénal (De la Cruz-Morcillo et al., 2016). D'autres travaux ont montré que les cellules tumorales de patients atteints de lymphome diffus à grandes cellules, de même que les lignées de DLBCL (Diffuse Large B-Cell Lymphoma), expriment le BDNF, le NGF, TrkB et $p75^{NTR}$ et que l'expression de ces neurotrophines et de leurs récepteurs ont un effet pro-survie sur les cellules tumorales (Dubanet et al., 2015). Enfin, dans un modèle de cancer colorectal, le ciblage thérapeutique du couple BDNF/TrkB et de l'autophagie a été étudié. L'utilisation conjointe d'inhibiteurs contre ces deux voies a montré un effet synergique qui potentialise les effets observés avec le ciblage d'une seule des deux voies. En effet, la double inhibition conduit à une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales *in vitro* et à une réduction de la croissance tumorale *in vivo* (Mazouffre et al., 2017).

Les neurotrophines ont particulièrement été identifiées comme régulatrices des CSC dont elles assurent le maintien, dans différents types de cancers comme le gliome (Xiong et al., 2013) ou le mélanome (Marchetti et al., 1996). Il a également été montré que les neurotrophines, notamment via les récepteurs TrkB et TrkC, favorisent la croissance et la viabilité des CSC dans le cas du GBM (Lawn et al., 2015).

Le GBM est donc un cancer très agressif, résistant, dont le pronostic est très sombre du fait de la récidive quasi systématique. Deux mécanismes de survie sont connus pour participer à cette agressivité, l'autophagie et la signalisation neurotrophiques. De plus, ces deux processus sont également connus pour être associés aux CSC

BY-NC-ND

Matériel et Méthodes

BY-NC-ND

Chapitre I. Culture cellulaire

I.1. Modèle cellulaire

Les lignées cellulaires humaines de glioblastome utilisées sont les U87-MG, M059K, M059J et LN-18. Elles proviennent de l'American type Culture collection (ATCC®). Ce sont des lignées de référence, fréquemment utilisées dans les études portant sur le GBM. Nous avons également utilisé des lignées modifiées de U87-MG, deux lignées où l'autophagie a été inhibée à l'aide de shRNA ciblant les protéines ATG5 et Beclin1, ce sont les ignées U87-shATG5 et U87-shBeclin1, et une lignée où la signalisation neurotrophique a été inhibée à l'aide d'un shRNA ciblant TrkC, U87-shTrkC. Afin d'éviter tout biais dû à la présence du plasmide dans les cellules, nous avons utilisé comme contrôle une lignée de cellules transformées par le plasmide vide, c'est la lignée U87-pLKO. Les lignées U87-shATG5, U87-shBeclin1 et U87-pLKO nous ont été fournies par le « Experimental Neurosurgery University Hospital Frankfurt » (Frankfurt/Main Germany). La lignée U87-shTrkC a été obtenue au laboratoire par transfection (voir plus loin).

I.1.1. Conditions de culture

Les cellules sont cultivées en milieu DMEM-GlutaMAX™ (Invitrogen®), supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (IDBio®)), préalablement décomplémenté pendant 30 min à 56°C. Pour les lignées transfectées, afin de sélectionner les cellules ayant intégré les shRNA, 1 µg/mL de puromycine est ajoutée au milieu (Fisher Scientific®).
Les cellules sont cultivées en normoxie (5% CO_2, 20% O_2) ou en hypoxie (5% CO_2, 1% O_2, 94% N_2), en atmosphère humide, à 37°C. Pour l'entretien, les cellules sont repiquées lorsqu'elles atteignent environ 70% de confluence. Pour cela les cellules sont dissociées par ajout de versène (PBS-EDTA 0,48mM, Gibco®) pendant 5 minutes à 37°C, puis reprises en milieu complet et centrifugées à 300*xg* pendant 5 minutes. Les cellules sont comptées en présence de bleu trypan (0,1%, Sigma Aldrich®) sur lame de Malassez. Pour les expériences, les cellules sont ensemencées à une densité de 750 000 cellules par flasque de 75 cm^2, soit 10^4 cellules par cm^2.

I.1.2. Transfection

Nous avons transfecté les cellules U87-MG afin de leur faire exprimer un shRNA ciblant l'ARNm codant pour le récepteur TrkC dans le but d'éteindre son expression.
Pour cela, 1 µg de vecteur contenant la séquence du gène codant pour le récepteur TrkC est ajouté à 20 µL de bactéries thermocompétentes GC-α (Sigma), puis le plasmide est introduit

BY-NC-ND

dans les bactéries par choc thermique : après 20 minutes dans la glace, le mélange bactéries-vecteur est transféré pendant 20 secondes dans un bain-marie à 37°C et immédiatement remis sur glace. Les bactéries sont mises en culture et incubées 1 h à 37°C sous agitation pour leur laisser le temps d'exprimer les gènes codés par le vecteur, en particulier le gène de résistance à l'ampicilline qui permet ensuite la sélection des bactéries ayant intégré le vecteur.

Les bactéries sont étalées sur une boîte de pétri contenant de la gélose (15 g d'agar / litre de milieu complet LB, Invitrogen) contenant l'ampicilline (50 µg/mL, Invitrogen). Les cultures bactériennes sont placées dans une étuve à 37°C pendant une nuit. Une colonie (composée de bactéries résistantes à l'ampicilline, ayant intégré le vecteur) est prélevée et déposée dans 200 mL de milieu LB liquide contenant également de l'ampicilline afin d'amplifier les clones. Les cultures sont incubées sous agitation pendant une nuit à 37°C.

Afin de purifier les vecteurs, la culture bactérienne est centrifugée à 6000xg pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et la purification des vecteurs est réalisée à l'aide du kit MaxiPrep TM(Qiagen), selon les instructions du fournisseur. L'ADN plasmidique, obtenu à l'issue de cette purification, est dosé par spectrophotométrie à 260 nm (nanodrop, Thermoscientist).

Les cellules HEK-293T sont ensemencées en boîte de Pétri, à la densité de $2,5.10^6$ cellules par boîte et maintenues en culture pendant 10h. 8 à 16 µg de plasmide d'intérêt sont dilués dans 800 µL de milieu sans SVF ; parallèlement 16 à 20 µL de lipofectamine sont dilués dans 800 µL du même milieu sans SVF. L'ADN et la lipofectamine sont ensuite mélangés délicatement et incubés 15 à 45 minutes à température ambiante. Le mélange est complété de 4,8 mL de milieu sans SVF, puis transféré sur les cellules HEK-293T dont le milieu aura préalablement été retiré, les boites sont délicatement agitées. Les cellules sont incubées pendant 6 à 8h à 37°C puis le milieu est remplacé par du milieu contenant du SVF.

Après 9 à 10h, le surnageant des cellules HEK-293T est récupéré et remplacé par du milieu frais. Afin de récupérer les particules virales, le surnageant est centrifugé à 1500*xg* pendant 45 min à RT (température ambiante) et le surnageant est éliminé. Les particules virales peuvent être utilisées directement pour infecter les cellules ou elles peuvent être stockées à -80°C.

Les cellules U87-MG sont ensemencées en plaque 6 puits à 50 000 cellules par puits, dans 2 mL de milieu complet. Après 24h de culture, 50 µL de particules virales sont ajoutés à chaque puits (sauf le puits contrôle), ainsi que 10 µg/mL de Polybrène. Après 24h, le milieu de culture est remplacé et additionné de puromycine à 1 µg/mL afin de sélectionner les cellules ayant intégré le plasmide.

BY-NC-ND

I.2. Traitements

I.2.1. Incubation avec le témozolomide

En nous basant sur la littérature (Jakubowicz-Gil et al., 2011) nous avons testé une gamme de concentration de témozolomide (TMZ), un agent chimiothérapeutique alkylant de l'ADN. Pour cela nous avons ensemencé des U87-pLKO en plaque 96 puits à une densité de 5 000 cellules par puits, nous les avons laissées en culture 96h avant de les exposer au TMZ. Nous avons ensuite changé le milieu, en ajoutant le TMZ, préalablement dilué en DMSO, aux concentrations de 500, 1 000, 1 500 et 2 000 µM, que nous avons incubé pendant 48h. Afin d'éviter tout biais dus à la présence du solvant, nous avons utilisé, en plus du milieu seul, un milieu contenant du DMSO (moins de 0,1%) comme contrôle pour évaluer la toxicité. Nous avons ensuite mesuré la survie cellulaire à l'aide d'un test XTT (test décrit ci-après). Nous avons souhaité obtenir une mortalité de 50% (IC50, quantité de drogue à utiliser pour obtenir 50% d'efficacité, ici 50% de mort cellulaire), c'est pourquoi dans la suite de l'étude, nous avons sélectionné la concentration de 1 500 µM pour nos traitements.

I.2.2. Test de cytotoxicité XTT

La survie des cellules est mesurée à l'aide du Cell Proliferation Kit II (Roche®). Ce test mesure l'activité déshydrogénase mitochondriale (qui fournit l'énergie aux cellules) et qui reflète l'activité métabolique des cellules. Les cellules sont ensemencées en plaque 96 puits à 5 000 cellules par puits puis incubées 96h et traitées avec les différentes concentrations de drogue pendant 48h. Le milieu est ensuite retiré et les cellules sont rincées avec 500 µL de PBS. On ajoute ensuite un mélange, contenant 100 µL de milieu de culture sans rouge phénol, 50 µL de « XTT labeling reagent » et 1 µL de « electron coupling reagent », dans chaque puits. La plaque est remise à l'incubateur pendant 2h, puis l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 650 nm.

I.3. Tri cellulaire

La SdFFF (Sedimentation Field Flow Fractionation) est une technique de tri qui permet de séparer les cellules en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques (volume, densité, déformabilité…), sans nécessité de marquage préalable à l'aide d'anticorps. Cette technique est basée sur l'application conjointe d'un flux de phase mobile et d'un champ multigravitationnel créé par la mise en rotation du système. Les caractéristiques du canal sont L : 788 mm, l : 12 mm et epaisseur 0,175 mm. Le couplage flux (1,02 mL/min) /force (20 g) va conduire les cellules à se placer selon un gradient en fonction de leur taille et de leur densité et va permettre l'élution des cellules en mode « hyperlayer » grâce aux paramètres pré-établis

BY-NC-ND

(Bertrand et al., 2009), ce qui permet de conserver leur viabilité et leurs propriétés biologiques, en particulier leur état de différenciation. Ainsi les cellules peu denses, de grande taille vont être éluées les premières, il s'agit de la fraction F1, et les cellules plus petites et plus denses seront éluées en dernier, il s'agit de la fraction F3. Cette technique est très adaptée au tri de cellules vivantes et a été utilisée dans ce travail pour séparer les cellules en fonction de leur niveau de différenciation (Faye et al., 2016; Mélin et al., 2014).

Les cellules sont ensemencées 96h avant le tri, à 10^4 cellules par cm^2. Elles sont décollées par le versène, centrifugées puis comptées et reprises dans la phase mobile, constituée de PBS exempt de calcium, à une densité de $2.5x10^6$ par mL. Les cellules sont injectées dans le canal et sont triées selon les paramètres établis de taille et de densité ainsi que critères de déformabilité et de rigidité, ce qui permet d'obtenir une fraction enrichie en cellules souches (petites et denses, dans la fraction F3) par rapport à la fraction F1, contenant davantage de cellules différenciées (grosses et peu denses) (Bertrand et al., 2009). L'ensemble est monitoré par ordinateur afin de récupérer précisément les fractions dont la détection est assurée par spectrophotométrie UV/visible à 254nm. Les résultats obtenus sont convertis en signaux électriques et enregistrés sous forme d'un fractogramme exprimé en unité arbitraire/minute.

BY-NC-ND

Chapitre II. Tests fonctionnels

Les tests fonctionnels ont été réalisés à la fois sur la population totale et sur les fractions issues du tri.

II.1. Test de prolifération BrdU

Nous avons utilisé le BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Cell Signaling®) pour mesurer la prolifération, en suivant le protocole du fournisseur. Le príncipe est basé sur l'utilisation de la bromodésoxyuridine,nucléoside de synthèse, analogue de la thymidine. Lors de la synthèse de l'ADN elle va être incorporée dans le nouveau brin et pourra être détectée à l'aide d'un anticorps. La prolifération est donc proportionnelle à la quantité de BrdU incorporée à l'ADN néosynthétisé. Pour ce test, les cellules sont ensemencées en plaques 96 puits, à raison de 1 000 cellules par puits, dans 200 µL de milieu et incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 96h. On ajoute ensuite 20 µL de solution de BrdU, préalablement dilué à 10X dans du milieu de culture (pour obtenir une dilution finale 1X), puis on incube 3h à 37°C, en hypoxie ou en normoxie. Le milieu est ensuite retiré et on ajoute 100 µL par puits de solution de fixation/dénaturation ; la plaque est incubée 30 minutes à RT. La solution est retirée puis 100 µL d'anticorps BrdU, dilué au 1/200ème dans le diluant fourni, sont ajoutés dans chaque puits. Après 1h d'incubation à RT, on lave 3 fois avec le tampon fourni et on ajoute 100 µL par puits d'anticorps secondaire couplé HRP, pour une incubation de 30 minutes à RT. Les cellules sont de nouveau lavées 3 fois avec le tampon, puis on ajoute 100 µL par puits de substrat TMB permettant la révélation. Le temps d'incubation conseillé est de 30 minutes, nous l'avons adapté à 20 minutes pour ne pas arriver à saturation. La réaction est arrêtée par 100 µL de solution STOP par puits, puis la DO est lue à 450 nm, immédiatement après ajout de la solution STOP, après 15 minutes et après 30 minutes.

II.2. Détection des nucléosomes solubles par ELISA Cell Death

La détection des nucléosomes permet d'évaluer la proportion de cellules en mort apoptotique. En effet, l'apoptose est caractérisée par un fractionnement des cellules et par un clivage de l'ADN qui a lieu entre les nucléosomes, structures de base de l'ADN, constitués de 8 histones autours desquels est enroulé l'ADN. Il en résulte la libération de mono ou oligo-nucléosomes qui vont pouvoir être détectés à l'aide d'anticorps spécifiques. Ce test est basé sur le principe de l'ELISA sandwich (Cell Death Detection ELISA, Roche). Les cellules sont ensemencées à 10 000 cellules par puits et l'expérience est réalisée selon les instructions du fournisseur.

BY-NC-ND

II.3. Formation de colonies

Ce test permet de déterminer la capacité des cellules tumorales à former des colonies. Les cellules sont ensemencées en plaques 6 puits, à 1 000 cellules par puits, en milieu semi-solide. Pour cela, sur une couche-support contenant 1 mL d'un mélange PBS-Agar et 1% et milieu de culture (v/v : 1/1), 1000 cellules sont ajoutées dans 2 mL d'un mélange contenant un volume de PBS-Agarose à 0,7% et de milieu de culture (v/v : 1/1). L'ensemble est recouvert de 1,5 mL de milieu de culture. Les cellules sont incubées à 37°C et le milieu de culture est remplacé tous les trois jours. Après 21 jours, les cellules sont fixées en PFA 4% pendant 15 minutes, colorées à l'aide d'une solution de crystal violet à 0,1% pendant 20 minutes et lavées plusieurs fois en PBS afin d'éclaircir la coloration et de distinguer chaque colonie. Le nombre et la taille des colonies sont analysés à l'aide du logiciel ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)

BY-NC-ND

Chapitre III. Etude Transcriptomique par RT-PCR quantitative

L'étude transcriptomique a été réalisée sur les populations totales et sur les fractions issues du tri.

III.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN sont extraits à l'aide de TRIzol® (Invitrogen™) à partir de culots cellulaires conservés à -80°C. Les culots sont repris dans 500 µL de TRIzol® auxquels sont ajoutés 100 µL de chloroforme (Sigman Aldrich), puis les tubes sont vortexés 15 secondes et incubés à RT 10 à 15 minutes en étant régulièrement mélangés par inversion. Les tubes sont ensuite centrifugés à 16000 g pendant 15 minutes à 4°C, puis la phase aqueuse, située dans la partie supérieure, est transférée dans un nouveau tube (le reste est conservé afin d'extraire l'ADN ou les protéines). 250 µL d'isopropanol sont ajoutés et les échantillons sont incubés 10 minutes à -80°C puis centrifugés à 16000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 1 mL d'éthanol 75% et centrifugé pendant 5 minutes à 4°C et lavé une seconde fois. L'éthanol est aspiré au maximum et le culot séché brièvement à l'air libre puis repris délicatement dans 15 µL d'eau stérile RNase free.
Les ARN sont ensuite dosés par spectrophotométrie (Nanodrop, Fisher Scientific) à 260nm. Afin de vérifier la pureté des ARN obtenus, les rapports d'absorbance 260/280 sont contrôlés, ils doivent être proches de 2.

III.2. Reverse Transcription

Les ARN sont rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) par reverse transcription, à l'aide du kit Applied Biosystem. Selon les indications du fabricant, un mix est préparé ; pour chaque tube, il contient 2 µL de reverse transcriptase Buffer; 0,8 µL de mix dNTP 25X à 100mM; 2 µL de reverse transcriptase; Random Primer 10X; 1 µL d'enzyme Multiscribe Reverse Transcriptase et 4,2 µL d'H_2O exempte de RNase. Chaque tube contient 10 µL de ce mix auxquels sont ajoutés 2 µg d'ARN, complété à 20 µL avec de l'H_2O RNase free pour atteindre un volume final de 20 µL. Ils sont ensuite placés dans le thermocycleur (Techne) ; le protocole établi par le fournisseur commence par une incubation de 10 minutes à 25°C, afin d'hybrider les hexamères aléatoires et empêcher le décrochage des primers de l'ADN matrice au cours de l'étape suivante, s'ensuit une incubation de 120 minutes à 37°C permettant la synthèse de l'ADNc. Pour finir une étape de 5 minutes à 85°C permet d'inactiver l'enzyme.

BY-NC-ND

III.3. PCR quantitative (qPCR)

Les ADNc obtenus sont ensuite dilués avec 60 µL d'H_2O RNase free de façon à pouvoir déposer 4 µL contenant 100 ng d'ADNc. La qPCR est faite en plaque 96 puits. Aux 4 µL d'ADNc sont ajoutés 6 µL de mix contenant 5 µL de Master Mix (Applied Biosystem), 0,5 µL d'un mélange amorces-sonde et 0,5 µL d'H_2O. Les sondes Taqman utilisées sont couplées, en 5', avec le 6-CarboxyFluorescien ou 6 FAM (Reporter) et, en 3', avec le Minor groove Binder-Non Fluorescent Quencher ou MGBNFQ (Quencher). Le gène de référence utilisé pour normaliser les résultats est celui codant la GAPDH, d'autres gènes, codant la 18S, HPRT1, Hsp70, ont également été testés, mais ils montraient une grande variabilité entre les différentes conditions (normoxie/hypoxie) et les différentes lignées. Après une centrifugation rapide, la réaction de qPCR est réalisée à l'aide du StepOne™ System (Life Technologies). Le programme (Fast Thermal Cycling) débute par une dénaturation de 12 secondes à 95°C, cette étape permet également d'activer la Taq polymérase (enzyme dite « Hot Start »). Viennent ensuite 40 cycles comprenant chacun une dénaturation 2 secondes à 95°C, suivie d'une hybridation des amorces et sondes pendant 20 secondes à 60°C. Les mélanges amorces/sondes proviennent de chez Thermo Scientific (Tableaux III et IV).

Gène	**Référence**
BMI1	Hs00995536_m1
GAPDH	Hs02758991_g1
LGR5	Hs00969422_m1
NANOG	Hs04399610_g1
POU5F1	Hs00999634_gH
SOX2	Hs00415716_m1

Tableau III : Amorces et Sondes commerciales utilisées pour la qPCR

Gène		Séquences
NTF3 2 (NT-3) Variants 1 et 2	Forward	TGGCATCCAAGGTAACAACA
	Reverse	TAACGTCCACCATCTGCTTG
	Probe	**TCCCTCATTATTAAGCTGATCCAGGCAGAT**
TrkC (NTRK3)	Forward	TGAGAACCCCCAGTACTTCC
	Reverse	GCTCCCTCACCCAGTTCTC
	Probe	**CGTATGTGCAGCACATTAAGAGGAGAGACA**

BY-NC-ND

TrkC Variant 3 Tronqué	Forward	TCCAGAGTGGGGAAGTGTCT
	Reverse	CATGACGTCCTTTGCTGAAA
	Probe	**ATTCCAAGCCTCTTAACCATGGCATCTATG**
P75^{NTR} (NGF-R)	Forward	CACCACCGACAACCTCATC
	Reverse	AAGCAGAACAAGCAAGGAGC
Sortilin (NTR3 ou NTSR3)	Forward	AGCCAGTGGGTCTCCTACAC
	Reverse	CACTCCACAGACCCTGAAGA
	Probe	**TCCTTGAAAGGAACTGTGAAGAGAAGGACT**

Tableau IV : références et séquences des amorces et sondes

III.4. Analyse des résultats

L'appareil (StepOne, ThermoFisherScientific) mesure la fluorescence émise par la dégradation des sondes au fur et à mesure des cycles de PCR. Lorsqu'elle dépasse le seuil établi automatiuement par l'appareil, un nombre de cycle est déterminé, c'est le « Cycle Threshold » ou « Ct ». On calcule ensuite le dCt = Ct (gène d'intérêt) – Ct (gène de référence), puis le ddCt = dCt (condition contrôle) – dCt (condition traitée), le Rq ou Relative Quantity, RQ = 2^{-ddCt} et pour finir le Log2(RQ)= Ln(RQ)*-1,4427.

BY-NC-ND

IV.1. Western Blot

IV.1.1. Extraction des protéines

Les protéines sont extraites à partir de culots cellulaires conservés à -80°C, par lyse chimique avec un tampon RIPA contenant 50mM de Tris-HCl pH 7,4; 1% de NP-40; 0,5% de Na-deoxycholate; 0,1% de SDS; 150mM de NaCl; 2mM d'EDTA et 50mM de NaF. Avant utilisation, 1mM de PMSF sont ajoutés pour une incubation de 30 minutes sur glace. On complète ensuite la lyse chimique par une lyse mécanique par sonication à 60Hz, amplitude 2s, pendant 1 minute. Les lysats obtenus sont ensuite centrifugés à 4°C pendant 25 minutes à 14 000*xg* puis le surnageant est prélevé. On dose les protéines grâce à la méthode Bradford (Sigma Aldrich®) par spectrophotométrie à 595 nm contre une gamme étalon de BSA.

Une technique alternative d'extraction protéique a été utilisée, elle permet d'extraire les protéines à partir des mêmes échantillons que ceux sur lesquels est extrait l'ARN à l'aide du TRIzol®. Cette technique permet de pouvoir faire plusieurs expériences, lorsque de faibles quantités de cellules sont disponibles, comme c'est le cas après tri par SdFFF. Pour cela, 150 µL d'éthanol absolu sont ajoutés à la phase stockée lors de l'extraction d'ARN et les échantillons sont mélangés par inversion, puis incubés à température ambiante pendant 2-3 minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés à 2000g, pendant 5 minutes, à 4°C. Les protéines sont ensuite précipitées par ajout de 400 µL d'isopropanol. Les tubes sont laissés à RT pendant 10 minutes, puis centrifugés 10 minutes, à 12000*xg*, à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot est lavé avec une solution de guanidine hydrochloride 0,3 M en éthanol 95%. Les protéines sont alors reprises dans 1 mL de la solution de guanidine hydrochloride, incubées 20 minutes à température ambiante et centrifugées 5 minutes, à 7500 g, à 4°C. Le culot est repris dans 500 µL d'éthanol absolu, vortexé et incubé 20 minutes à RT. Les tubes sont ensuite centrifugés 5 minutes, à 7500g, à 4°C. Après avoir retiré le surnageant, les protéines sont séchées à l'air libre pendant maximum 10 minutes et reprises en Laemmli 1X (sans bleu de Bromophénol). Afin de dissoudre correctement le culot, de l'urée est ajoutée pour obtenir une concentration de 8 M et les tubes sont incubés à 50°C. Le dosage ne peut pas se faire par la méthode Bradford, cette technique n'étant pas compatible avec les détergents. Nous utilisons donc le kit DC Protein Assay (BioRad®), selon les instructions du fournisseur. Les protéines sont dosées contre une gamme étalon de BSA, par spectrophotométrie à 750 nm.

BY-NC-ND

IV.1.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide et transfert sur membrane

On ajoute aux protéines obtenues ¼ de tampon laemmli 4X (Biorad®) auquel on a préalablement ajouté 5% de β-mercaptoéthanol. Ce tampon permet aux protéines d'avoir la même charge négative et de migrer uniquement selon leur poids moléculaire dans le gel. Avant d'être déposées sur gel, les protéines sont incubées 5 minutes à 95°C pour être dénaturées. Elles sont ensuite séparées sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel) dont la concentration en acrylamide est adaptée à la taille des protéines recherchées (10 à 15%). La migration se fait en cuve Mini Protean Tetra Cell (Biorad®), dans un tampon Tris-Glycine-SDS (Biorad®), pendant environ 2 h, entre 90 V et 110 V selon la concentration en acrylamide. Afin de localiser les protéines sur le gel, un marqueur de taille est utilisé (PageRuler Prestained Protein Ladder 10-170 KDa, Fisher Scientific). Après séparation par électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Polyvinylidène difluoride) ayant des pores de 0,45µm (Amersham®). Les papiers Wattman sont imbibés dans du tampon de transfert Tris-Glycine (Biorad®), puis à partir de l'anode, sont disposées 4 papiers Wattman, la membrane, le gel et de nouveau 4 papiers Wattman. Le transfert s'effectue à l'aide du Trans-Blot® Semi-Dry (Biorad®) pendant 1h15 à 20 V.

IV.1.3. Saturation de la membrane et incubation avec les anticorps

Afin de limiter la fixation aspécifique, les sites non occupés de la membrane sont saturés pendant au moins 30 minutes, à RT, à l'aide d'une solution de TBS 1X contenant 0,1% de Tween-20 et 5% de BSA (Bovine Serum Albumin). Pour le marquage, les membranes sont incubées pendant la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt (Tableau V). Le lendemain les membranes sont lavées 3 fois en TBS-Tween 0,1% puis incubées avec l'anticorps secondaire correspondant, couplé à la HRP (Horseradish Peroxydase), pendant 1h à température ambiante. Avant la révélation, les membranes sont de nouveau lavées 3 fois avec du TBS.

Proteine	**Reference**		**Dilution**
Actine	A5441	Sigma Aldrich	1/10000
Beclin1	#3738	Cell Signaling	1/1000
BMI1	ab135713	Abcam	1/200
LC3b	#2775	Cell Signaling	1/1000
LGR5	ab75732	Abcam	1/1000

BY-NC-ND

Nanog	#4893	Cell Signaling	1/1000
Oct4	PA1-16943	ThermoFisher	1/500
p38-MAPK	#8690	Cell Signaling	1/1000
Phospho p38-MAPK	#4511	Cell Signaling	1/1000
$p75^{NTR}$	sc-8317	Santa Cruz	1/200
Sortiline	612101	BD biosciences	1/400
Sox2	630801	BioLegend	1/250
TrkC	orb43232	Biorbyt	1/200
Anti-mouse	P044701-2	Dako	1/1000
Anti-rabbit	P044801-2	Dako	1/1000

Tableau V : Anticorps utilisés pour le Western Blot

IV.1.4. . Révélation par chimioluminescence

La révélation repose sur l'oxydation du luminol par l'O_2, produit par l'action de la peroxydase sur l'H_2O_2. Pour cela, la membrane est mise en contact pendant 1 minute avec le mélange du kit Immobion Blot (Millipore®) dans les proportions luminol:H_2O_2, 1:1. Un composé intermédiaire instable se forme. En revenant à l'état stable, il émet de la lumière. Celle-ci est captée par la caméra de la Gbox (Ozyme®) et est visualisée sous forme de bandes plus ou moins intenses. Les images numériques obtenues sont traitées à l'aide du logiciel d'analyse d'image (Genesnap, Syngene®), puis semi-quantifiées grâce au logiciel ImageJ (NIH®).

BY-NC-ND

Chapitre V. Immunofluorescence Indirecte (IFI)

Les cellules sont ensemencées en plaque 24 puits sur des lamelles en verre. A la fin de la cinétique, le milieu est retiré de chaque puits et les cellules sont fixées à l'aide de PFA 4% dilué en PBS (paraformaldéhyde, pour 100 mL de solution, Calbiochem) pendant 30 minutes à RT. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois au PBS puis saturées en PBS-BSA 3% pendant 30 minutes, si les protéines d'intérêt sont intracellulaires, une perméabilisation est effectuée par ajout de 0,1% de Triton x100 pendant 5 minutes. Elles sont de nouveau lavées 3 fois au PBS puis incubées avec l'anticorps primaire (Tableau VI) dilué en PBS-BSA 3% sur la nuit à 4°C. Le lendemain elles sont lavées 3 fois en PBS puis incubées avec l'anticorps secondaire, couplé à un Alexa fluor 488® (Fluorescence verte) ou un Alexa fluor 594® (Fluorescence rouge), pendant 2h à RT et à l'obscurité. Les cellules sont lavées 3 fois en PBS, puis les lamelles sont extraites des puits et rincées à l'eau distillée avant d'être montées sur lame à l'aide d'un milieu de montage contenant du DAPI (Fluoroshield mounting Medium, Sigma Aldrich) qui va colorer les noyaux des cellules en bleu. Les lames sont stockées à 4°C avant d'être observées en épifluorescence ou en microscopie confocale (Zeiss® LSM 880 Confocal Laser Scanning Microscope).

Protein	**Reference**		**Dilution**
Oct4	PA1-16943	ThermoFisher	1/100
Sortiline	612101	BD biosciences	
TrkC	orb43232	Biorbyt	1/200
Anti-rabbit Alexa Fluor™ 488	A11034	Invitrogen	1/5000
Anti-rabbit Alexa Fluor™ 594	A11012	Invitrogen	1/5000

Tableau VI : anticorps utilisés pour l'immunofluorescence

BY-NC-ND

Chapitre VI. Analyses statistiques

Les données sont présentées sous la forme de valeurs moyennes calculées à partir de trois expériences indépendantes au moins (le nombre d'expériences est précisé pour chaque résultat). Pour déterminer s'il existe une différence statistiquement significative par rapport au contrôle, un test de Kruskal-Wallis ou ANOVA est utilisé en fonction de la taille des échantillons. Les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

BY-NC-ND

Objectifs

BY-NC-ND

Mon projet de thèse a porté sur l'étude de l'implication de l'autophagie et de la signalisation neurotrophique dans la survie des cellules de GBM, et également dans l'émergence de cellules souches cancéreuses, supports de la tumorigénicité.

Le GBM est une tumeur très agressive conduisant systématiquement à une rechute, malgré un traitement associant chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie. Du fait de sa croissance rapide limitant la vascularisation du cœur de la tumeur, celui-ci est fortement hypoxique. Pour survivre à cet environnement pauvre en oxygène, les cellules tumorales stabilisent le facteur de transcription HIF-1. Son activation conduit à la mise en place de voies de survie. Il a précédemment été montré qu'elles détournent un mécanisme de survie, l'autophagie (Hu et al., 2012). Les cellules amplifient ce processus de recyclage physiologique afin de pallier l'absence d'apports extérieurs.

Au cours de travaux initiaux, réalisés dans le laboratoire par S Jawhari et auxquels j'ai contribué, il a été mis en évidence une autre voie participant à la résistance des cellules de GBM à ce stress. Il s'agit de la voie neurotrophique passant par le récepteur TrkC, activé par son ligand, la neurotrophine 3. En effet, nos résultats ont montré l'existence d'une coopération entre l'autophagie et la signalisation neurotrophique, afin d'assurer la survie des cellules tumorales face à l'hypoxie. Lorsque l'autophagie est inhibée et que les cellules sont placées en hypoxie, la signalisation neurotrophique est activée, ce qui assure un relais de défense contre le manque d'oxygène. C'est ce que nous exposerons dans la première partie des résultats de ce manuscrit. Nous nous sommes intéressés à ces deux mécanismes et avons cherché à approfondir ces travaux. Dans le travail précédemment exposé, des siRNA étaient utilisés pour diminuer l'expression de protéines de l'autophagie ou de la signalisation de TrkC. Comme cette approche ne permet pas l'obtention d'une extinction stable, nous avons préféré mettre au point une extinction par shRNA. Pour cela nous avons bloqué l'autophagie, à l'aide d'un shRNA contre Beclin1 et la signalisation neurotrophique, à l'aide d'un shRNA contre le récepteur TrkC, dans le modèle cellulaire U87-MG, lignée cellulaire très utilisée pour les études sur le glioblastome. Nous avons donc étudié la modulation de différentes voies métaboliques liées à ces processus, lorsque les cellules sont exposées à un environnement pauvre en oxygène, suite à l'inhibition de l'un ou l'autre des deux mécanismes.

Les résultats que nous avons obtenus sur les prélèvements de tumeurs de patients indiquent que le récepteur TrkC ainsi que la protéine LC3 (marquer de l'autophagie) sont particulièrement exprimés dans le centre de la tumeur, connu pour héberger les cellules souches cancéreuses. De plus, il a été montré que ces deux mécanismes sont associés au phénotype immature dans le cas des cellules de gliome. En effet, les CSC sont connues pour avoir une forte activité autophagique (Bischof et al., 2017; Ojha et al., 2015), et il a également été montré qu'elles sont régulées par les neurotrophines dans différents types de cancers,

BY-NC-ND

notamment le gliome (Lawn et al., 2015). En favorisant son agressivité et sa résistance, les CSC représentent un atout majeur pour la tumeur. Elles partagent des caractéristiques avec les cellules souches embryonnaires, comme la capacité d'auto-renouvellement qui leur permet de maintenir le pool de cellules tumorales et de redonner naissance à une tumeur, lorsque les traitements ont décimé les cellules différenciées, ou à distance de la tumeur primaire. Elles sont également résistantes à la radiothérapie et à la chimiothérapie (Kreso and Dick, 2014). Une étude sélective et approfondie des CSC est donc primordiale puisque ces cellules représentent une origine majeure de résistance aux traitements et de récidive. Il est impossible d'envisager une thérapie ciblée de ce type de cancer, sans trouver un traitement qui éliminerait complètement cette population cellulaire.

C'est la raison pour laquelle, dans la deuxième partie de ce travail, nous avons cherché à déterminer le rôle que jouent l'autophagie et la signalisation neurotrophique (TrkC/NT3) dans la mise en place et le maintien d'un compartiment de cellules souches au sein de la tumeur. Pour cela nous avons tenté de déterminer le phénotype des CSC, à l'aide de marqueurs récemment identifiés, présentes dans les lignées où l'autophagie et la signalisation neurotrophique ont été inhibées. Nous avons également étudié leur fonctionnalité, en termes de prolifération et de résistance au Témozolomide, qui est l'agent chimiothérapeutique classiquement utilisé pour le traitement du GBM.

Devant la difficulté d'étudier ce phénotype « souche » dans une population cellulaire totale (où les CSC ne sont présentes qu'à un faible pourcentage de l'ordre de 3 à 5 % maximum), nous avons complété cette étude par une technique originale de tri cellulaire, appelée fractionnement par couplage flux/force de sédimentation (SdFFF). Cet outil permet de séparer les cellules en fonction de leurs paramètres physico-chimiques tels que la taille et la densité, mais également selon leur déformabilité et leur rigidité. La mise en oeuvre conjointe d'un couple flux de phase mobile/champ multigravitionnel permet d'isoler des sous-populations d'intérêt selon leur état de différenciation. Il s'agit d'une technique rapide, peu agressive et ne nécessitant aucun marquage préalable des cellules, ce qui permet leur remise en culture sans perturbation de leur viabilité et la conservation de leurs caractéristiques biologiques. Nous avons alors étudié le phénotype des sous-populations isolées, ainsi que leurs capacités fonctionnelles.

BY-NC-ND

Résultats

BY-NC-ND

Chapitre I. Place de l'autophagie et de la signalisation TrkC dans la survie des cellules de GBM

I.1. L'autophagie et la signalisation passant par TrkC et NT3 s'associent pour favoriser la survie des cellules de GBM

Le GBM est une tumeur qui présente une croissance rapide conduisant à la formation d'une masse tumorale. Cette structure tridimensionnelle très organisée conduit à des conditions de faible disponibilité en oxygène auxquelles les cellules doivent s'adapter pour survivre. Des travaux précédents ont montré dans des cellules de GBM humain, que l'hypoxie entraine l'activation de l'autophagie (Hu et al., 2012). Dans une première approche, nous avons souhaité élargir cette étude à d'autres lignées cellulaires mais aussi à une voie de survie liée à des facteurs de croissance connus pour leur implication dans le SNC : les neurotrophines.

Pour cela, nous avons utilisé 4 lignées de GBM : U87-MG, M059K, M059J et LN18. Ces lignées ont des caractéristiques génétiques différentes (Tableau VII).

Gène	U87-MG	M059K	M059J	LN18
IDH1	Mutation Exon 2 R132H	WT	WT	WT
IDH2	Mutation Exon 4 R172M	WT	Amplification Exons 10 et 2	WT
TP53	WT	Mutation Exon 8 G286A	Mutation Exon 8 G286A	Mutation Exon 8 C238S
EGFR	WT	WT	Amplification Exon 2	WT
PTEN	Délétion Exon 3	WT	Amplification Exon 6	WT

Tableau VII : Etat des principales mutations/altérations géniques dans les lignées de GBM étudiées (d'après l'ATCC© et des études d'Anatomopathologie).
WT = Wild-Type.

Par ailleurs, il est également connu que les cellules de GBM présentent des profils différents pour l'expression et l'amplification du récepteur à l'EGF. Comme il s'agit d'un récepteur à activité tyrosine kinase, comme les récepteurs Trk des neurotrophines, nous avons souhaité vérifier son état d'amplification dans les lignées cellulaires étudiées. Cette approche a été réalisée par le laboratoire d'anatomo-pathologie du CHU de Limoges en utilisant une technique d'hybridation in situ (figure 17).

BY-NC-ND

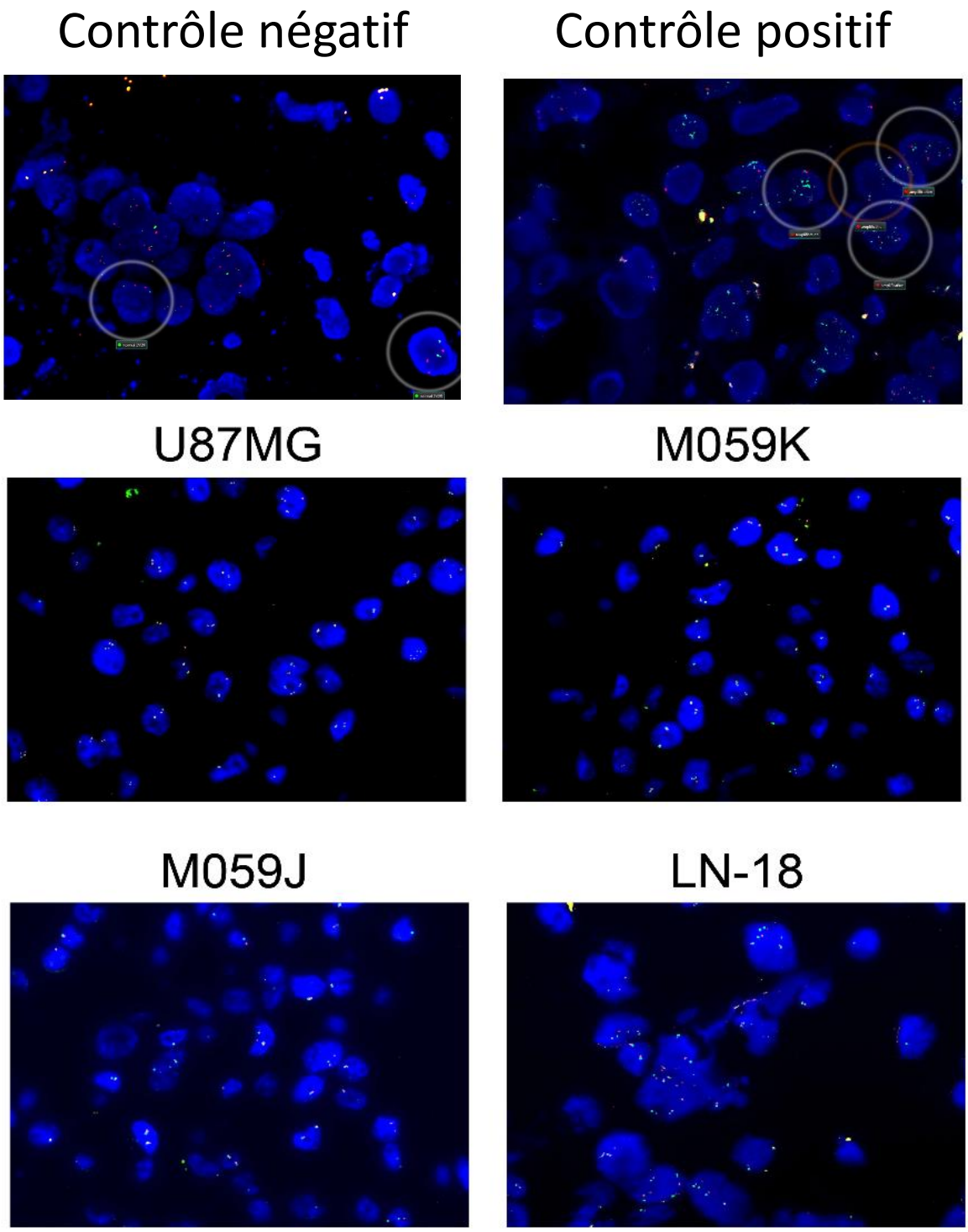


Figure 17 : Hybridation in situ pour la détection d'une amplification du gène codant pour l'EGFR

L'amplification du gène est visible par une augmentation du marquage vert par rapport au marquage rouge.

BY-NC-ND

Les résultats obtenus montrent que les lignées U87-MG, M059J et M059K ne sur-expriment pas le récepteur à l'EGF, seule la lignée LN-18 le surexprime, comme cela avait été précédemment montré (Su et al., 2008). Ainsi, du fait de la diversité d'expression de l'EGFR entre les lignées, nous ne pouvons pas imputer la résistance des cellules de GBM au stress hypoxique à sa seule amplification.

Nous avons exposé ces 4 lignées à un environnement hypoxique (1% O_2) pendant une cinétique allant de 0 à 24h. Puis nous avons analysé la réponse des cellules à ce manque d'oxygène, en nous focalisant sur l'expression et la signalisation des neurotrophines ainsi que sur l'activation de l'autophagie. Après avoir montré l'implication de ces deux voies de survie, nous les avons inactivées pour mettre en évidence les connexions éventuelles existant entre elles. Ce premier travail a été publié en 2017 dans la revue Carcinogenesis.

BY-NC-ND

OXFORD

Carcinogenesis, 2017, 1–12

doi:10.1093/carcin/bgx029
Advance Access publication March 31, 2017
Original Article

original article

Autophagy and TrkC/NT-3 signaling joined forces boost the hypoxic glioblastoma cell survival

Soha Jawhari[1], Barbara Bessette[1], Sophie Hombourger[1], Karine Durand[1], Aurélie Lacroix[1], François Labrousse[1], Marie-Odile Jauberteau[1], Marie-Hélène Ratinaud[1] and Mireille Verdier[1,*]

[1]EA 3842, Cellular Homeostasis and Pathologies, Limoges University, France

*To whom correspondence should be addressed. EA 3842 Faculté de Médecine, 2, rue du Docteur Marcland 87025 LIMOGES cedex, France. Tel: +33 555 43 58 49; Fax: +33 555 43 59 83; E-mail: mireille.verdier@unilim.fr

Abstract

Glioblastoma multiform (GBM), the most common and aggressive primary brain tumor, is characterized by a high degree of hypoxia and resistance to therapy because of its adaptation capacities, including autophagy and growth factors signaling. In this study, we show an efficient hypoxia-induced survival autophagy in four different GBM cell lines (U87MG, M059K, M059J and LN-18) and an activation of a particular neurotrophin signaling pathway. Indeed, the enhancement of both TrkC and NT-3 was followed by downstream p38MAPK phosphorylation, suggesting the occurrence of a survival autocrine loop. Autophagy inhibition increased the hypoxia-induced expression of TrkC and its phosphorylated form as well as the phosphorylation of p38, suggesting a complementary effect of the two processes, leading to cell survival. Alone, autophagy inhibition reduced cellular growth without inducing cell death. However, the double inhibition of autophagy and TrkC signaling was necessary to bring cells to death as shown by PARP cleavage, particularly important in hypoxia. Moreover, a very high expression of TrkC and NT-3 was found in tumor sections from GBM patients, highlighting the importance of neurotrophic signaling in GBM tumor cell survival. These data suggest that a combined treatment targeting these two pathways could be considered in order to induce the death of GBM cells.

Introduction

Glioblastoma (GBM) is a malignant astrocytic tumor, classified as grade IV, according to the World Health Organization (WHO) classification (1), which has recently been updated (2). Indeed, it is the most common and the most aggressive brain tumor (1) occurring at any age (3), even if it is more frequent between ages 45 and 70 (4). Primary GBM are characterized by an ampli- fication of EGFR (Endothelial Growth Factor Receptor) in 36% of cases and TP53 mutations in 30% (5), whereas secondary GBM are characterized by a high incidence of TP53 mutations (65%) and, less frequently, by an amplification of EGFR (8%). GBM con- sists of two histological distinct tumor areas: (i) A very high cell density area associated with atypical nuclei and a high mitotic index and (ii) An area in which isolated cancer cells invade the parenchyma which remains morphologically and functionally intact (6). GBM is characterized by a high degree of hypoxia, due in part to anarchic cell growth, oxygen consumption and aber- rant neovasculature (7). Tumor cells adapt to oxygen deprivation by triggering signaling pathways, enabling the tumor to withstand not only hypoxia (8), but also treatments (9,10). The capacity to bring the cells to a particularly high degree of resistance to apoptosis contributes to tumor aggressiveness and therapy escape. It is currently accepted that up-regulation of autophagy during hypoxia can favor tumor cell survival and growth (11,12). Autophagy, a conserved catabolic process (13) implies engulfment of organelles and macromolecules into double-membrane vesicles termed autophagosomes, which merge with lysosomes to form the autophagolysosome (14). Autophagosome content is dismantled by lysosomal enzymes and further recycled into cellular anabolism (15). Autophagic process involves several specific genes named *ATG* (*A*u*T*opha*G*y related) (13): Atg6 protein (Beclin1 in mammals) participates in autophago-

Received: May 12, 2016; **Revised:** February 22, 2017; **Accepted:** March 18, 2017
© The Author 2017. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

BY-NC-ND

Abbreviations

BNIP3	BcL-2/Adenovirus E1B-19K-interacting protein 3 CQ chloroquin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium EGFR Endothelial Growth Factor Receptor
GBM	Glioblastoma multiform
LC3	Microtubule-Associated Protein Light Chain 3
MAPK	mitogenic activated protein kinase
NT	Neurotrophin
RT	room temperature
SDS	sodium dodecyl sulfate
Trk	tropomyosin-related kinase

some initiation, Atg5 in elongation and Atg8 (Microtubule-Associated Protein Light Chain 3 named LC3 in mammals) in the achieve- ment of autophagosome formation (13). During this process, the LC3I protein, the free cytosolic form of LC3, is converted into the phosphatidylethanolamine-linked autophagosomal form LC3II (16). LC3 is the most widely used autophagic marker (17). Another important event is the degradation of the p62 protein, which allows the recognition of ubiquitinated aggregates by the autophagosome (18). It has been demonstrated that, in basal conditions, the low rate of autophagy, which is important for maintaining homeostasis, could be greatly enhanced under stress including hypoxia (12,19,20). Indeed, the hypoxia-induci- ble factor HIF1 induces BNIP3 expression (BcL-2/Adenovirus E1B- 19K-interacting protein 3), which in turn increases autophagy through activation of Beclin1 (20,21).

In addition to enhanced autophagy, growth factors often show abnormal expression in human glioblastoma (22). Neurotrophins (NTs), which play an important role in the nervous system, belong to this growth factor family. They are involved in the differentiation, proliferation, survival, apoptosis as well as axonal growth and synaptic plasticity of neuronal cells and astrocytes (23). Furthermore, NTs exhibit an overexpression in several cancers and could be associated with either poor (24) or good (25), especially by induction of autophagic cell death. NT family is primarily composed of three members: the nerve growth factor (NGF) (26), the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (27) and neurotrophin-3 (NT-3) (28), which bind the tropomyosin-related kinase (Trk) receptors TrkA, TrkB and TrkC, respectively (29). After binding NT, three major intracellular signaling pathways can be activated, i.e. the PI3K/Akt (phos- phatidylinositide 3 kinase/Akt) pathway, the MAPK (mitogenic activated protein kinase) pathway, and/or the PLC-γ (phospholi- pase C gamma 1) pathway, promoting primarily cell survival and differentiation (29). Whereas the dysregulation of NT signaling, especially TrkB/BDNF (30), is shown to be associated with tumo- rigenesis, little is known about TrkC implication in GBM.

Herein, we show that, under hypoxic stress, human GBM cells induce efficient survival autophagy and increase TrkC expres- sion, along with p38MAPK activation. Inhibition of this MAPK induces a discrete PARP cleavage, which is further enhanced upon inhibition of autophagy, suggesting a new possible therapeutic field.

Materials and methods

Cell culture and transfection

U87MG, the most frequently studied GBM cell line, M059K, M059J and LN-18 GBM cells were obtained from American Type Culture Collection. All cell lines were authenticated and characterized by the supplier and we checked EGFR and TP53 status by FISH and MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) technics, respectively. The four cell lines exhibited different gene amplifications and mutations (lack of amplified EGFR in U87MG, M059K and M059J and amplified EGFR in LN-18, mutation in exon 8 of TP53 in M059J, M059K and LN-18 and TP53 wild type in U87MG, data not shown). After immediate expanding, multiple aliquots were cryopreserved and cells were used within 6 months after thawing, not exceeding 10 passages. Cells were cultured either in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; U87MG cell line) or in DMEM / F12 (M059K cell line; Gibco Life Technologies, Saint-Aubin, France). Both media contained GlutaMAXTM and were supplied with 10% Fetal Bovine Serum (Lonza, Verviers, Belgium), 1% Non-Essential Amino Acids and 1% Penicillin/

Streptomycin (Gibco Life Technologies), under normoxia (5% CO_2, 20% O_2) or hypoxia (5% CO_2, 1% O_2) in a humidified incubator (Binder, Gennevilliers, France) never opened during incubation. Incubation was done for 4, 8, 12, 16 and 24 hours with or without 40 µM of chloroquine (CQ, Gibco Life Technologies), an inhibitor of lysosomal activity.

GBM cells lines were infected with virions produced in HEK cells after transfection with either pCT-Autophago-GFP (System Biosciences, Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) or its counterpart without LC3 DNA sequence, pLKO or shRNA TrkC (Clones TRCN 194821, TRCN 2313 and TRCN 2309 from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), using jetPEI (Polyplus, Strasbourg, France). Transfected cells were selected with puromycin (1 µg/mL, Sigma-Aldrich). Furthermore, cells with high copies of GFP-LC3 vector were separated by cell sorting (FACSAria SORP 5 colors, Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France).

For siRNA transfection, cells were transfected using INTERFERIN Transfection Reagent (Polyplus, Ozyme) with 20 nmol/L of negative con- trol, Beclin1, Atg5 or p38MAPK siRNAs (Cell Signaling Technology, Ozyme). After 48 h, knockdown was confirmed by western blotting.

Primary and secondary antibodies

Primary antibodies used for western blotting were to PARP, Beclin1, Atg5, p62, LC3, p38, phospho-p38, Akt, phospho-Akt, mTOR, phospho-mTOR (1/1000, Cell Signaling Technology), TrkC (1µg/mL, R&D, Lille, France), ERK1/2, phospho-ERK1/2 (0.1 µg/mL, R&D Biosystem), phospho-TrkC (1/500 Abcam, Paris, France), α-tubulin (1/200 Santa Cruz Biothechnology, CliniSciences, Nanterre, France). Primary antibodies used for indirect immunofluorescence were to GFP (1/200, Cell Signaling Technology), and TrkC (2.5 µg/mL, R&D). Primary antibodies for immunohistochemistry were used as follows: LC3 (1/200, Nanotools, Teningen, Germany), BNIP3 (1/50, ThermoFisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France), TrkC (1/50, Novus Biologicals), Ki67 (1/100, Dako, Les Ulis, France) and NT-3 (1/50, R&D). Secondary antibodies were from Dako for western blot and from Molecular Probes for immunofluorescence.

Cytotoxicity XTT assay

The cytotoxic effect of hypoxia, CQ and different siRNAs was determined using XTT assay (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazo- lium-5-carboxanilide; Cell Proliferation Kit II from Roche diagnostics, Meylan, France). XTT formazan production is proportional to mitochon- drial succinate dehydrogenase activity and indirectly reflects cell viability. The test was performed according to the manufacturer's instructions on 8000 cells/well. Absorbance (A) at 490 nm (in reference to 690 nm) was determined in a Multiskan FC (Thermo Scientific) absorbance reader. Hypoxia cytotoxicity was evaluated by the ratio of A developed by hypoxic cells to A developed by normoxic ones; siRNAs cytotoxicity was evaluated by the ratio of A from cells transfected with a specific siRNA to A from cells transfected with a control one.

Western blotting and semi-quantification

Cells cultured in normoxia or hypoxia were collected at each incu- bation time. They were lysed for 5 min at 4°C in Cell Lysis Buffer (Cell Signaling) added with 1 mM PMSF, proteases and phosphatases inhibitors (Sigma Aldrich). Cells were then disrupted by sonication and centrifuged at 14000*g* for 20 min at 4°C. After protein concentration determination (Bradford protein assay, Sigma Aldrich), 30 or 60 µg of protein were loaded and separated by gradient SDS-polyaccrylamide gel (Biorad, Marnes- la-Coquette, France) for 50 min at 150 V, then electroblotted on PVDF

BY-NC-ND

membrane (Biorad). After a blocking step in 5% fat-free milk or BSA for phosphorylated proteins (1 h, Room Temperature RT), membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies (see above) diluted in blocking solution, followed by incubation with the appropriate secondary HRP-conjugated antibodies (1 h, RT). After washing in 1X TBS-0.1% Tween- 20 solution, blots were developed with Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate (Millipore SAS, Molsheim, France) and analyzed with G-Box (Ozyme, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Band intensities were determined by densitometry using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA http://rsb.info.nih.gov/ij/).

Indirect immunofluorescence

Cells were grown in Lab-Teck chamber slides (0.8 cm^2, Thermo Scientific Nunc) in supplemented DMEM under normoxia or hypoxia conditions for different times. After washing once in PBS at 4°C, cells were fixed and permeabilized in cold methanol for 5 min at RT. After the blocking step in 3% PBS–BSA, cells were incubated with monoclonal primary antibody diluted (1/200) in blocking solution overnight at 4°C under gentle agitation, followed by incubation with the appropriate Alexa™-labeled (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) secondary antibody (1/500) for 2 h at room temperature (RT) in the dark; nuclei counterstaining with DAPI (1 µg/mL, ThermoFisher Scientific) was finally performed for 15 min at RT. Slides were mounted with special fluorescent mounting medium (Dako) before analysis under epifluorescence (Eclipse E800, Nikon, Champigny sur Marne, France) or confocal microscopy (LSM 510 META, Zeiss, Göttingen, Germany). Relative quantification of green fluorescence was assessed by surface plot analysis using ImageJ software program (NIH).

Quantitative RT-PCR

After culture in normoxia or hypoxia, cells were collected at each incu- bation time. RNA extraction was performed using RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf) and reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystem). PCR reactions were conducted in triplicate with TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem ThermoFisher Scientific) using 100 ng cDNA per reaction. Samples were pre-incubated at 95°C for 12 s and then subjected to amplification over 40 cycles consisting of a 2 s melting step (94°C) and a 20 s extension step (60°C). Amplification was measured using a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Primers and probes (Life technologies) used are shown in Supplementary Table 1. All Ct (Cycle Threshold) obtained were normalized to *HPRT1* transcripts and then transcripts relative quantities (RQ) in hypoxic samples versus nor- moxia were calculated.

Tumor samples from patients, processing and staining

Paraffin-embedded human tumors sections of 5 cavernoma and 20 glioblastoma have been provided by the "Service d'Anatomo-Pathologie" of the Limoges CHU. After antigen retrieval treatment, endogenous peroxi- dase quenching and non-specific blocking, sections were stained with pri- mary antibody for 2 h RT (LC3, Ki67) or overnight at 4°C (BNIP3, TrkC and NT-3). Subsequently, Dako EnVision kit was used for revelation. A coun- terstaining was done with hematoxylin (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and lithium carbonate. Immunohistochemistry staining density was determined using ImageJ (NIH).

Statistics

All experiments were done independently at least three times. Data were statistically analyzed by ANOVA test with STATVIEW 5.0 (Abaccus).

Results

Hypoxia activates a functional autophagy in GBM cells

The overall study was realized with four different GBM cell lines, U87MG, M059K, M059J and LN-18 cultured up to 16 h in hypoxic conditions (1% O_2), comparatively to normoxia. The hypoxic condition was checked by detection of the translocation of HIF-1 into the nucleus and the subsequent up-regulation of BNIP3 expression, a well-known target of HIF-1. As expected, HIF-1 was translocated into the nucleus as early as after 2 h of hypoxia (data not shown), ahead of BNIP3 expression enhancement, which happened after 4 h of hypoxia, and remained at a high level overall the stress period (Figure 1A, left panels and Supplementary Figure 1A). It has been previously reported that such low oxygen environment induced autophagy in GBM cells (7) and we monitored LC3II conversion (a classical autophagic marker) along the incubation. Cells constitutively exhibited an important basal level of autophagy in normoxia, already reported as a hallmark of GBM cells (31). The process signifi- cantly increased with hypoxia: for example in U87MG, the LC3II band displayed a relative intensity of 1.43 after 16 h in hypoxia versus 1 in normoxia, $P < 0.001$ (Figure 1A, left panels); simi- lar results were observed with the three other GBM cell lines (Supplementary Figure 1A). Stress-induced autophagy was also evidenced by changes in p62 degradation (Figure 1A, left panels and Supplementary Figure 1A), which was significantly reduced in U87MG cells at 16 h hypoxia comparatively to normoxia (0.55 versus 1 respectively, $P < 0.001$); this event serves as an index of autophagic degradation (32).

In order to check the autophagic flux, the same analyses were achieved in the presence of chloroquine (CQ), an autophagic inhibitor known to inhibit lysosomal acidification and fusion with autophagosome (33). As CQ inhibits autophagy after LC3II formation, it also caused a significant increase of this form (Figure 1A, right panels and Supplementary Figure 1B). Yet, we observed a hypoxia-induced p62 accumulation enhance- ment, higher in U87MG cell line (Figure 1A, right panels and Supplementary Figure 1B). In these cells, the event appeared significantly as early as after 4 h of hypoxia (2.39 versus 1 in normoxic conditions, $P < 0.001$) and this level was maintained all along the experiment (2.38 at 16 h hypoxia versus 1 in normoxic conditions, $P < 0.001$).

These results were confirmed by the punctate localization of LC3 to autophagosomes in GFP-LC3-transfected cells, whose intensities were largely enhanced by hypoxia in the four studied cell lines. Surface plot analysis of cytoplasmic green fluores- cence as well as evaluation of the numbers of GFP-LC3 puncta per cell and of GFP-LC3-punctate-containing cells highlighted this increase in U87MG cells (Figure 1B). Similar results were observed with the three other GBM cell lines (Supplementary Figure 1C). Study of GFP-LC3-transfected cells where inhibition of autophagy was performed with CQ, also exhibited amplifying punctate localization of LC3 to autophagosomes (Figure 1B and Supplementary Figure 1D). These data confirm the occurrence of a functional autophagic process in response to hypoxia in the four GBM cell lines.

We then analyzed the impact of hypoxia-induced autophagy inhibition on GBM cell fate, presuming that this process greatly contributes to cell survival. Thus, viable cell number was evalu- ated in normoxia and hypoxia in the presence, or not, of CQ, and the obtained values were normalized to hypoxia (Figure 1C and Supplementary Figure 1E). Hypoxic stress significantly slowed down cellular proliferation either in the presence or absence of CQ at 4 and 8 h in the four studied cell lines. Proliferation rose after 12 h to approach normal values by 24 h while autophagy was actually working, supporting the conclusion that this pro- cess helped cell survival in hostile conditions. However, even if CQ-treated cells were unable to resume normal growth, the pro- liferation rate never fell below 80%, even after 48 h (Figure 1C and Supplementary Figure 1E), suggesting that an additional protective process did occur in hypoxic conditions.

BY-NC-ND

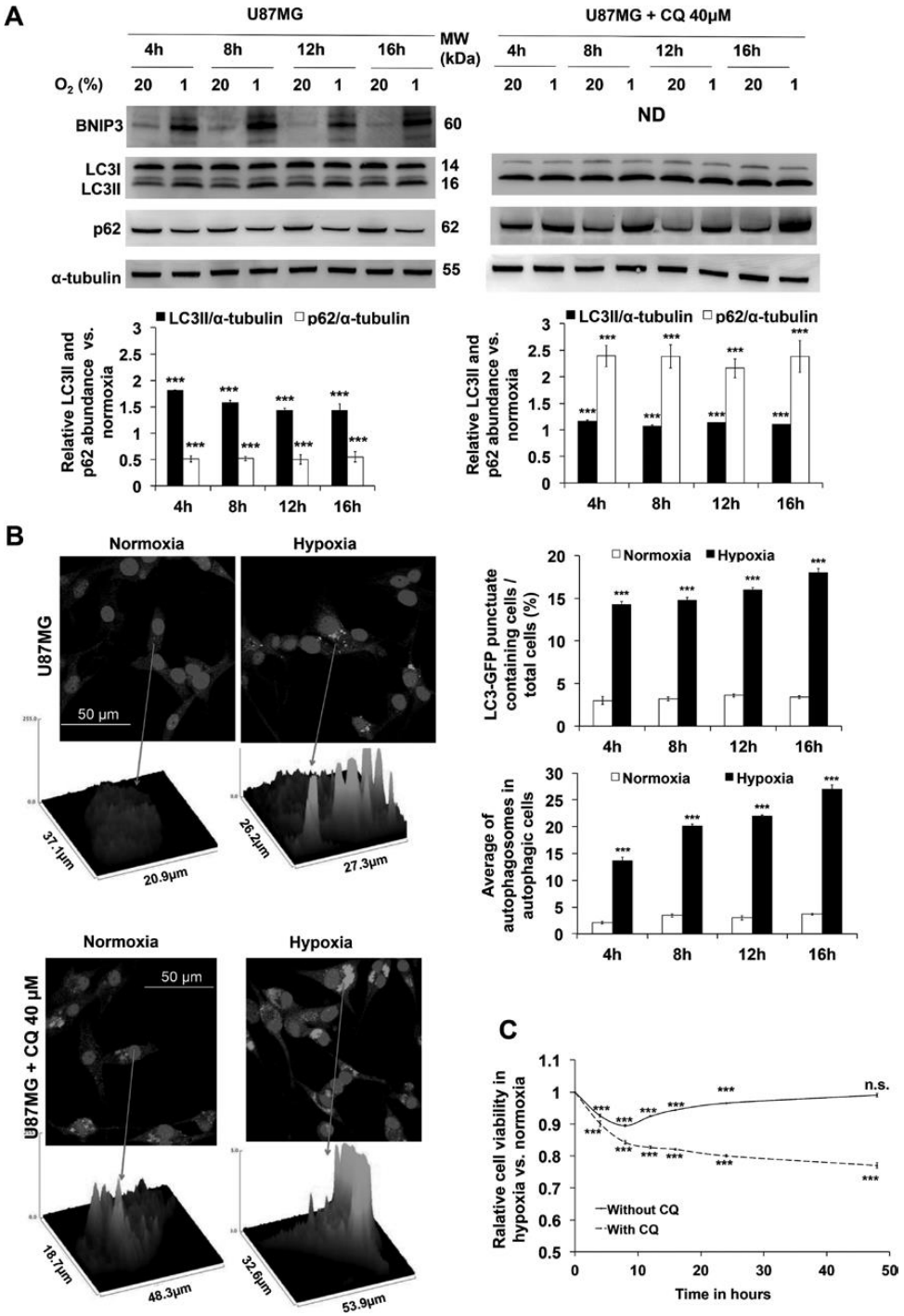


Figure 1. Hypoxia induced efficient autophagy in U87MG cell line. (**A**) Cells were cultured in normoxia or hypoxia for up to 16 h. As shown in cropped western blot, BNIP3 expression increased, as well as the LC3I-LC3II conversion and p62 degradation in hypoxic conditions. In histograms, LC3II/α-tubulin ratio and p62 level were normalized to normoxia (left panel). Autophagic flux inhibition by CQ accumulated LC3II and p62 proteins consistent with a functional autophagy; the accumulation was higher under hypoxic conditions (right panel) (mean of three independent experiments, $*P < 0.05$; $***P < 0.001$). (**B**) Culture of GFP-LC3 transfected U87MG cells in hypoxia increased the punctuate fluorescent staining reflecting autophagosome nucleation. The number of GFP-LC3 punctuate stained cells was quantified in at least 10 random fields (mean of three separate experiments, $***P < 0.001$). An additional relative quantification was assessed by positive fluorescence surface plot. CQ increased the fluorescent staining in this GFP-LC3 transfected cell line, highlighting the blockade of autophagosome degradation. Relative quantification was assessed by positive fluorescence surface plot. (**C**) U87MG cell line was cultured in normoxia or hypoxia in the presence, or not, of CQ for up to for up to 48 h. Cellular viability was assessed by Trypan Blue exclusion. The solid curve represents the values obtained at different times in hypoxic conditions (relative to normoxia), and the dotted curve represents the same analysis, when autophagy was inhibited (+CQ); (mean of three independent experiments, $***P < 0.001$).

Hypoxia and autophagy inhibition increase expression and activation of TrkC

It is well known that human glioma cells exhibit abnormali- ties in relation with their sensitivity to growth factor pathway. Since the neurotrophin family is particularly implied in the nervous system (24), we focused our analyses on the expres- sion of these growth factors and their receptors, including high and low affinity receptors (more precisely TrkA, TrkB, TrkC and $p75^{NTR}$).

BY-NC-ND

NT-3 was the only neurotrophin whose transcriptional expression was strongly enhanced in hypoxia comparatively to normoxia in U87MG cells (Figure 2A, $P < 0.001$ for the three exposition times), whereas changes failed to appear in M059K and were weaker in M059J and LN-18 (Supplementary Figure 2). This increase was not accompanied by an enhancement of the NT-3 protein band (Figure 2B). This discrepancy could be explained by the fact that western blot analyses were done with cell lysates while neurotrophins, indeed, are actually secreted molecules. In accordance with these data, TrkC, the NT-3 specific receptor, was also the only member of this receptor family to be enhanced by hypoxia in the U87MG cell line (Figure 2A), confirmed with the three other cell lines (Supplementary Figure 2). It is notewor- thy that TrkC levels (both transcript and protein) were signifi- cantly higher compared to normoxia (Figure 2A and B, $P < 0.001$). Furthermore, the fact that phospho-TrkC was also increased, especially at 12 and 16 h of hypoxia (Figure 2B) suggested the involvement of a survival autocrine loop implying TrkC/NT-3 signaling in U87MG cells. Thus, hypoxic stress seems to boost two survival processes, autophagy and TrkC/NT-3.

Since we hypothesized a synergistic effect of the two survival pathways, we checked the possible impact of autophagy inhibi- tion on TrkC expression in U87MG cells, in which this receptor was the most prominent. Expression and phosphorylation of TrkC were increased following CQ treatment, and these increases were further enhanced when cells were cultured under hypoxia (2.3 at 16 h hypoxia versus 1 in normoxic conditions, $P < 0.001$, Figure 2C). Similar results were obtained when autophagy was inhibited by siRNA transfection (whose validation was checked by western blotting, Supplementary Figure 3A) against Beclin1 and Atg5 transcripts (Figure 2D). These results ensure that the TrkC enhancement was a consequence of autophagy inhibition and not to a possible side effect of CQ. Immunofluorescence results of GFP-LC3-transfected U87MG cells failed to show any co-localization between TrkC and autophagosomes (Figure 2E). This result contradicted the assumption of TrkC degradation by autophagy and supported a role of TrkC in offsetting the lack of autophagy, instead. The enhancement of both total and phos- phorylated TrkC forms suggested that the receptor is actually functional.

Hypoxia and autophagy inhibition increase the p38MAPK activation as a downstream target of TrkC signaling

Phosphorylated TrkC could engage in a downstream signal- ing and we found that this was the case in hypoxic conditions (Figure 2B). Classically, the PI3K/Akt/mTOR and the MAP kinases pathways could be downstream activated (29). We evaluated by western blot the expression of the major proteins involved in these signaling pathways (Figure 3A). Statistical analyses showed that phospho-Erk1/2 levels decreased slowly, whereas phospho-p38MAPK level increased with hypoxia since 4 h, sug- gesting that this kinase could mediate cell survival in response to the environmental stress. As in the case with TrkC and phospho-TrkC, we checked p38 activation as a consequence of autophagy inhibition. We found that CQ upregulated the phos- phorylated form of p38, and more especially in hypoxia, under- scoring the commitment of TrkC signaling (Figure 3B). However, since p38MAPK could respond to a variety of upstream signaling regulators, we checked the phosphorylation status of p38MAPK, when TrkC was inhibited by shRNA. After confirmation of TrkC inhibition by Q-RT-PCR (Supplementary Figure 3B), the reversal of p38MAPK was evidenced, especially in hypoxia as shown in Figure 3C. These results emphasize the TrkC compensation role involving p38 pathway, in response to hypoxia, when autophagy is inhibited.

Neurotrophin and autophagy twin inhibition is required to trigger cell death

We have already shown that, in hypoxia, the slowing down of cellular proliferation is only transient and is followed by growth resuming whereas CQ-induced autophagy inhibition avoided this recovery (Figure 1C and Supplementary Figure 1E). In order to complete this study, we assessed the cellular metabolic activ- ity after autophagy inhibition, by using CQ or transfection with siBeclin1 or siAtg5, in hypoxic conditions compared to normoxia in U87MG cell line. Both CQ treatment and autophagy- specific siRNA induced a significant time-dependent decrease of the metabolic process in hypoxia-cultured cells, as observed in Figure 4A. The loss reached almost 30% with CQ inhibition, 20% and 40% with Beclin1 and Atg5 siRNA respectively, at 16 h of hypoxia. Similar results were obtained with the three other cell lines when using CQ (Supplementary Figure 4A) and in M059K cells when using siRNA (Supplementary Figure 4B and C). The cell viability, assessed by trypan blue exclusion, decreased to 80% (Figure 1C). In order to link this observation to the apop- totic pathway activation, we analyzed PARP cleavage during the stress in the presence of autophagy inhibitors. Neither CQ nor siRNA induced such event in the treated hypoxic U87MG cells (Figure 4B, respectively left and right panels). Similar results were obtained with the 3 others cell lines used (Supplementary Figure 4D and E). Thus, inhibition of the hypoxia-induced autophagy failed to cause cell death in the four tested cell lines, thus reinforcing the role of TrkC as additional survival pathway of GBM cell lines in response to hypoxia. To check this assump- tion, we inhibited p38MAPK, whose phosphorylation increased in hypoxic U87MG cell line, by using specific siRNA (of which we ensured efficiency, Supplementary Figure 3C). Following p38 impairment, the cellular metabolic activity was unchanged in cells cultured in normoxia whereas it significantly decreased after 16 h in hypoxic condition (Figure 4C, left panel, $P < 0.001$). Co-inhibition of p38 and autophagy in the presence of CQ further affected the mitochondrial activity, thereby increasing the cellular cytotoxicity in normoxia as well as hypoxia (Figure 4C, left panel, 0.31 and 0.24 respectively versus 1). These events were accompanied by a decrease of viable cells (Figure 4C, right panel), which fell to almost 40% after double inhibition compar- atively to the control ($P < 0.001$). In order to link this cytotoxicity and proliferation reduction to apoptotic cell death, we evaluated PARP truncation in the same conditions (Figure 4D). With sip- 38MAPK, we observed a slight PARP cleavage in hypoxic condi- tion, which was further enhanced upon CQ treatment. Moreover, twin inhibition of TrkC and autophagy decreased significantly colonies formation and size in U87-MG cell line (Supplementary Figure 5), suggesting the relevance of both pathways to support aggressiveness of GBM cells. These data underline the impor- tance of both autophagic and neurotrophin signaling pathways for GBM cell survival under hypoxia.

Patient tumors exhibit both autophagic marker and TrkC/NT-3 expression enhancement

The overall results reported here were obtained with four differ- ent GBM cell lines and showed a cooperative effect of autophagy and TrkC signaling that ensured cell survival in response to hypoxia. In the last part of this work, we wanted to deter- mine the autophagy and neutrophin characteristics of tumors from patients, in order to extend the data obtained *in vitro*. To this end, we checked BNIP3, LC3, TrkC and NT-3 expression by immunohistochemistry.

BY-NC-ND

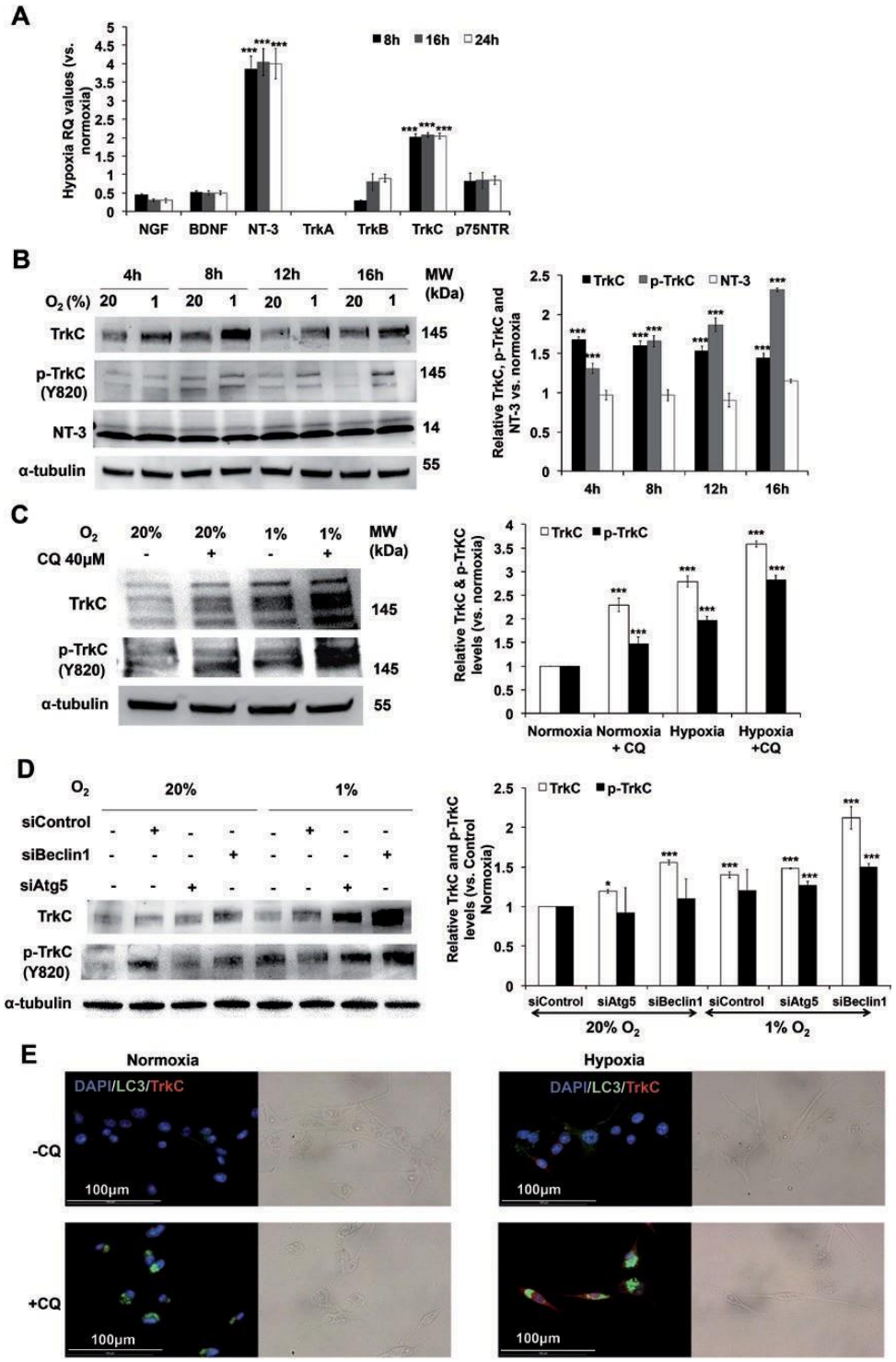


Figure 2. Hypoxia and autophagy inhibition increased TrkC expression and phosphorylation. (**A**) Quantitative RT-PCR analyses of neurotrophins and their receptors were realized on U87MG cell line cultured in normoxia or hypoxia. Relative quantities (RQ) for all transcripts were obtained after normalization to *HPRT1* in hypoxia relative to normoxia for 8, 16 and 24 h. Error bars represent mean deviation (mean of 3 separate experiments, n.s.: not significant, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$). (**B**) Expression of TrkC and NT-3 was analyzed by western blot in U87MG cells cultured in normoxia or hypoxia for up to 16 h and cropped images are shown. Phosphorylated (activated) form of TrkC was also checked. Histogram quantification was obtained after normalization to tubulin in hypoxia relative to normoxia (mean of three independent experiments, n.s.: not significant, $^{***}P < 0.001$). (**C**) U87MG cells were cultured in normoxia or hypoxia in the presence or absence of CQ during 16 h, TrkC and phospho- TrkC were then analyzed by western blot (mean of three independent experiments, $^{***}P < 0.001$). (**D**) Autophagy was inhibited in the U87MG cell line by using specific siRNA against Beclin1 and Atg5 transcripts and TrkC and phospho-TrkC expression were checked by western blot after 16 h of hypoxia. Histogram quantifications were obtained after normalization relative to tubulin and to siControl in normoxia. Error bars represent mean deviation (mean of three independent experiments, n.s.: not significant, $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$). (**E**) TrkC expression (red) was monitored by immunofluorescence in GFP-LC3 transfected U87MG cells in normoxia or after 16 h hypoxia with or without CQ treatment.

BY-NC-ND

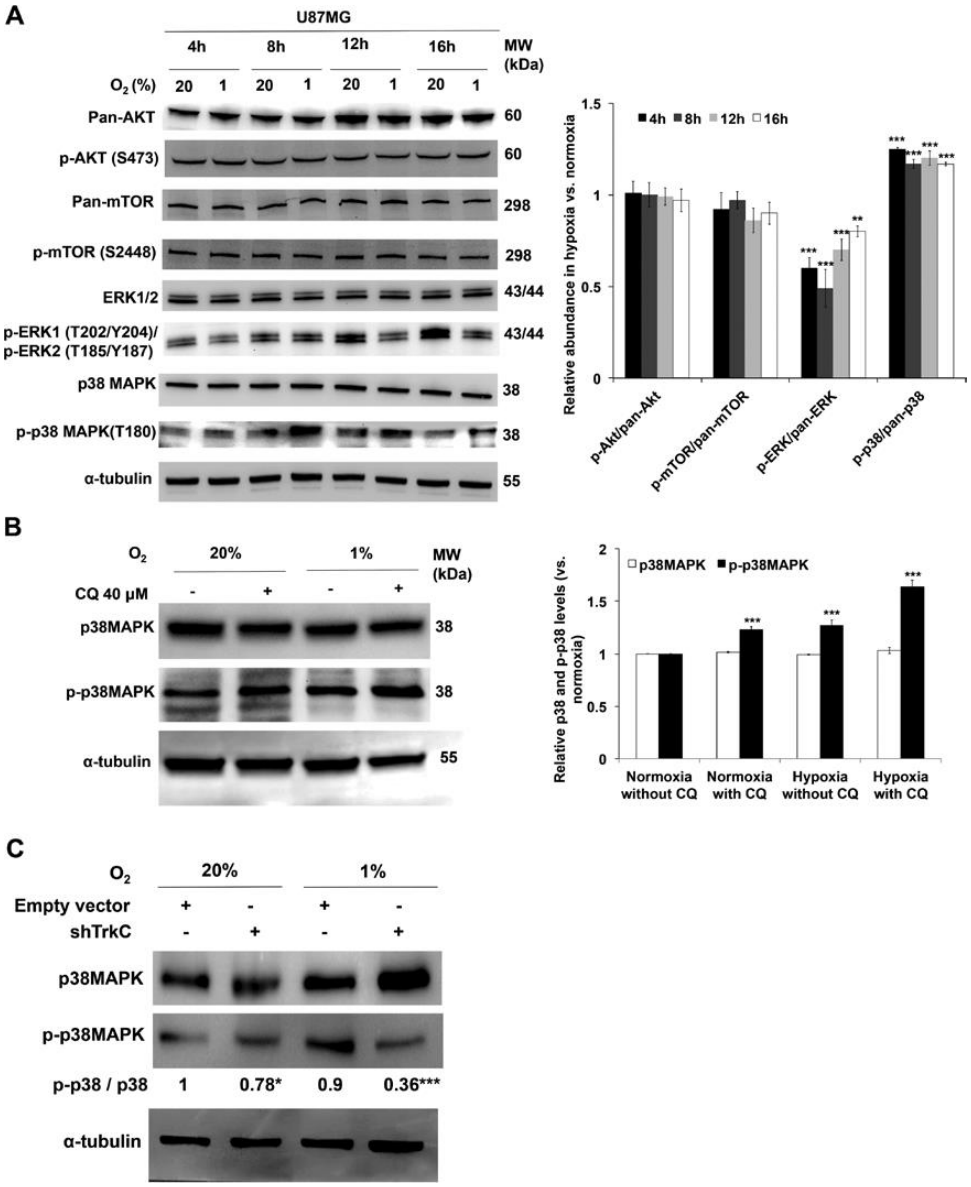


Figure 3. Hypoxia increased p38 activation as a downstream TrkC signaling pathway in U87MG cells. (**A**) Cells were cultured in normoxia or hypoxia for up to 16 h. Downstream TrkC signaling was analyzed by checking total and phosphorylated forms of Akt, mTOR, ERK1/2 and p38MAPK by western blot as shown in cropped images. (**B**) Autophagy was inhibited by using CQ and TrkC signaling was checked by immunoblotting of the phosphorylated form of p38. Histograms were obtained after normalization relative to tubulin in normoxia. Error bars represent mean deviation (mean of three independent experiments, n.s.: not significant, $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$). (**C**) Decrease of phospho-p38 was evaluated in shTrkC-transfected cells cultured in hypoxia in reference to normoxia.

The analysis was done on tumor sec- tions from 20 patients with GBM compared with 5 cavernoma (used as a non-tumoral cerebral tissue control) (Figure 5A). A high BNIP3 expression level was found in both tissues, con- firming the hypoxic character of GBM. The high value obtained in cavernoma was not surprising, due to the blood vessel mal- formation characteristic of this disease. However, it is notewor- thy that BNIP3 expression is cytosolic in cavernoma, whereas it is mainly nuclear in GBM, which could explain in part the high degree of GBM malignity as previously described (34). The hypoxic microenvironment could also probably explain the similar LC3 labeling we obtained in both pathologies. However, the expression pattern of TrkC and NT-3 was greatly different between GBM and cavernoma tissues (Figure 5A). Patients with GBM showed a high TrkC and NT-3 expression in comparison with cavernoma (respectively 96.93 ± 17.55 and 6.36 ± 2.18 for TrkC and 58.01 ± 7.13 and 6.74 ± 0.21 for NT-3, $P < 0.001$). These data highlight the importance of neurotrophic expression in GBM tumor and support the existence of a TrkC/NT-3 signaling loop that favors cell survival.

Being aware that cavernoma samples are not the best con- trols, we resolved to hunt the same markers in serial sections of GBM tumors, including tumoral and peri-tumoral tissues, (Figure 5B). We confirmed a very high expression of TrkC and nuclear BNIP3, overlaying the proliferation area as indicated by Ki67 staining. These labelings were especially localized in the tumoral cells since proliferating areas were only present in adult tumor brain whereas they were absent from normal tissue. A faint LC3 autophagy staining was also observed in this zone. Gradually as one moves away from the heart of the tumor, the different labelings became weaker.

BY-NC-ND

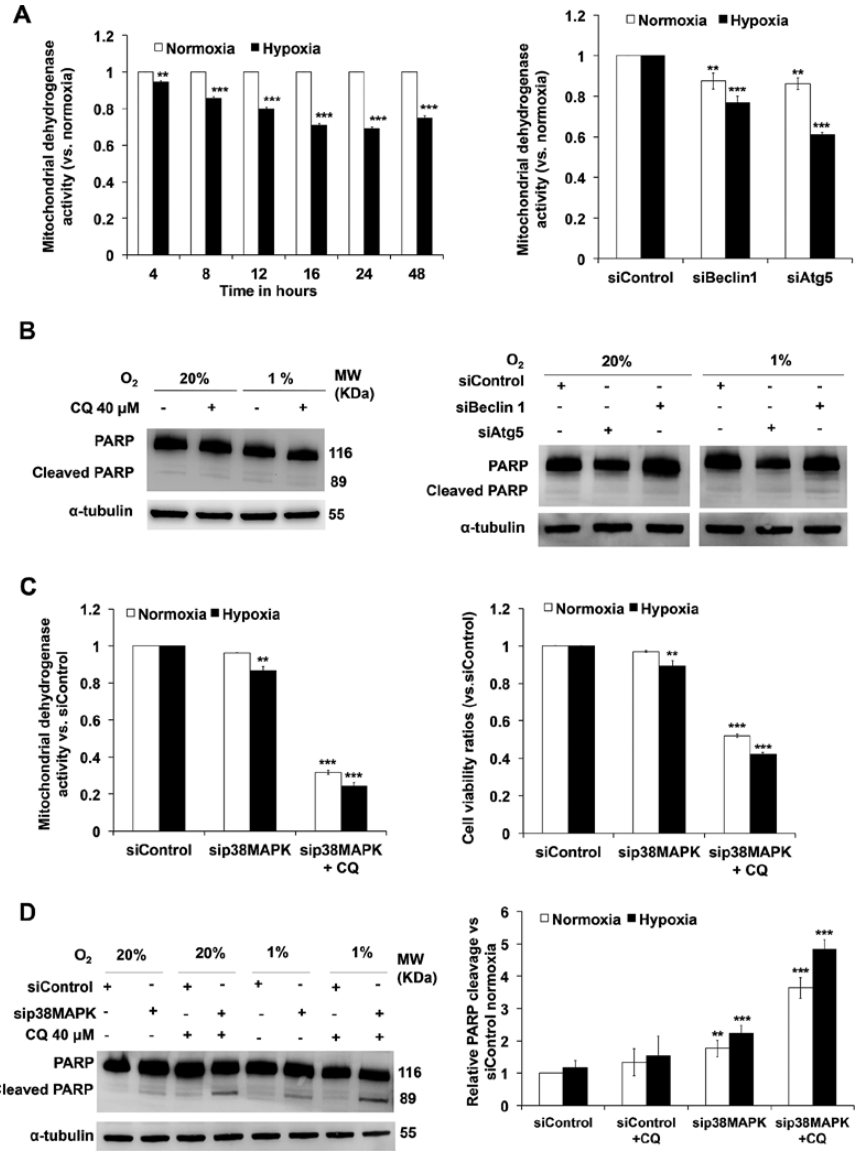


Figure 4. The double inhibition of hypoxia-induced autophagy and TrkC signaling decreased U87MG cell proliferation and triggered PARP cleavage. (**A**) Cells were treated by CQ (left panel) or transfected with autophagy-specific siRNA (right panel) then cultured in normoxia or hypoxia for 16 h. Mitochondrial succinate dehydrogenase activity was normalized to normoxia after autophagy inhibition. Using CQ, siBeclin1 or siAtg5 decreased cellular metabolic activity especially in hypoxia (mean of three independent experiments, ***$P < 0.001$). (**B**) Cells were treated with CQ or transfected with indicated siRNA and cultured in normoxia or hypoxia for 16 h. PARP expres- sion analyzed by western blot (cropped image) did not show any enhancement of PARP cleavage. (**C**) TrkC signaling was inhibited by using siRNA against p38MAPK. CQ was added for additional inhibition of autophagy. Metabolic activity and cell viability were assessed by XTT assay (left panel) and blue trypan exclusion (right panel). Histogram quantification was obtained after normalization relative to siControl. Error bars represent mean deviation (mean of 3 indepen dent experiments, n.s.: not significant; ***$P < 0.001$). (**D**) PARP cleavage was visualized by western blot in the same conditions and quantified (right panel; n.s.: not significant; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$).

These data emphasize the specific high level of autophagy and TrkC expression in tumoral cells and corroborate the potential role of these signaling pathways in resistance to hypoxia and in GBM aggressiveness.

Discussion

Hypoxia constitutes a frequent stress encountered in solid tumors such as GBM. This feature is mainly based on the vasculature network inability to supply appropriate amounts of nutriment and oxygen (35). Whereas this stress is lethal to most cells, tumor cells display adaptive solutions, which overcome these issues. Among them, autophagy takes place. This survival process, evolutionarily conserved and genetically controlled, is defined as an intracellular degradation system addressing cytoplasmic constituents to the lysosome (36,37). Thanks to its recycling function of unfolded or altered proteins and organelles, it contributes to cellular resistance against metabolic or oxidative environmental stress. In cancer cells, this process has been described as a double edge issue, acting either as a tumor-promoting factor or a tumor suppressor (14,38). Furthermore, depending on stress (and its level) and cellular types, autophagy also could lead to cell death. In a previous study, we reported that autophagic pathway activation in response to $CoCl_2$ (a hypoxia mimetic drug) induced death in neuroblastoma cell line harboring a mutated p53 (19). In glioblastoma, it has been previously shown that hypoxia could induce an autophagy-dependent tumoral cell survival (12). The present study corroborated data

BY-NC-ND

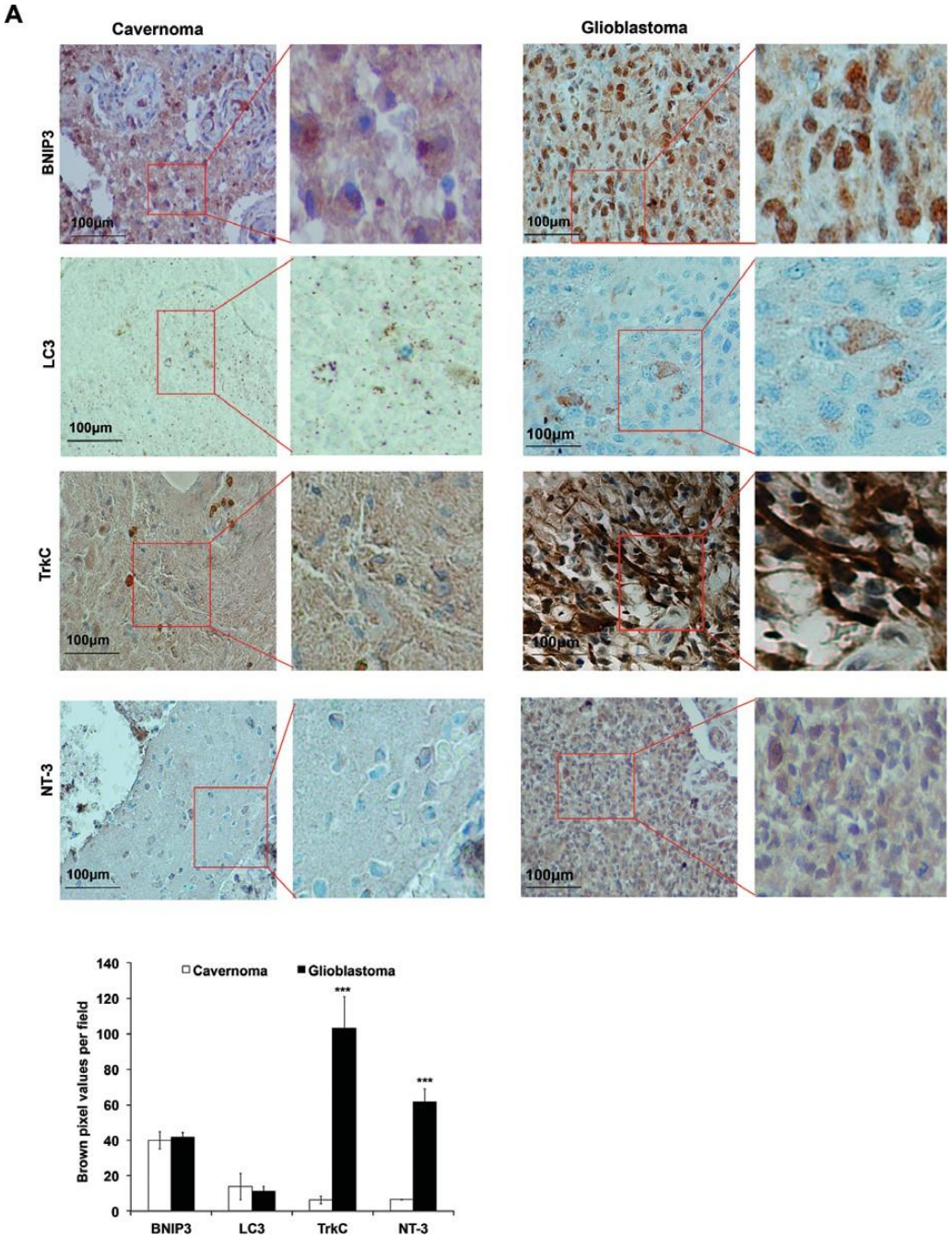


Figure 5. Patients with GBM exhibited autophagy and TrkC/NT-3 expression. (**A**) Immunohistochemical staining was performed on paraffin-embedded sections (4 µm), using anti-BNIP3, LC3, TrkC and NT-3 antibodies. Nuclei were visualized in blue and the specific staining in brown. Quantification of at least five fields per patient (5 cavernoma and 20 GBM) was achieved by ImageJ (NIH). Magnification, ×60. Error bars represent mean deviation (n.s.: not significant; ***$P < 0.001$). (**B**) Immunohisto- chemical stains were performed on serial sections of the same GBM tissue, using anti-Ki67, BNIP3, LC3 and TrkC antibodies. Specific staining appeared in dark whereas nuclei were counterstained and appeared clearer.

in two different GBM cell lines: we evidenced a functional autophagic process as shown with LC3II enhancement and p62 decrease under oxygen deprivation. This accumulation is particularly significant in the presence of the lysosome inhibitor, chloroquine (CQ), supporting the efficient recycling function of the process.

GBM are especially apoptosis-resistant tumors that constitute a hallmark of cancer (39), probably due to their enhanced propensity to develop autophagy. Yet, in several models, including glioma (40), it appears that apoptosis and autophagy are mutually exclusive processes (15). That is why we inhibited the survival pathway either pharmacologically or by using siRNA against transcripts of autophagy-involved proteins. In both cases, the mitochondrial metabolic activity (succinate dehy- drogenase, assessed by XTT assay) was largely reduced whilst no substantial cell loss could be evidenced, probably support- ing an entrance into a quiescent state rather than a cell death process. We failed to induce an apoptotic response as indicated by the absence of PARP cleavage in the studied cell lines. Even if we cannot exclude another cell death pathway, these results indicated that autophagy

BY-NC-ND

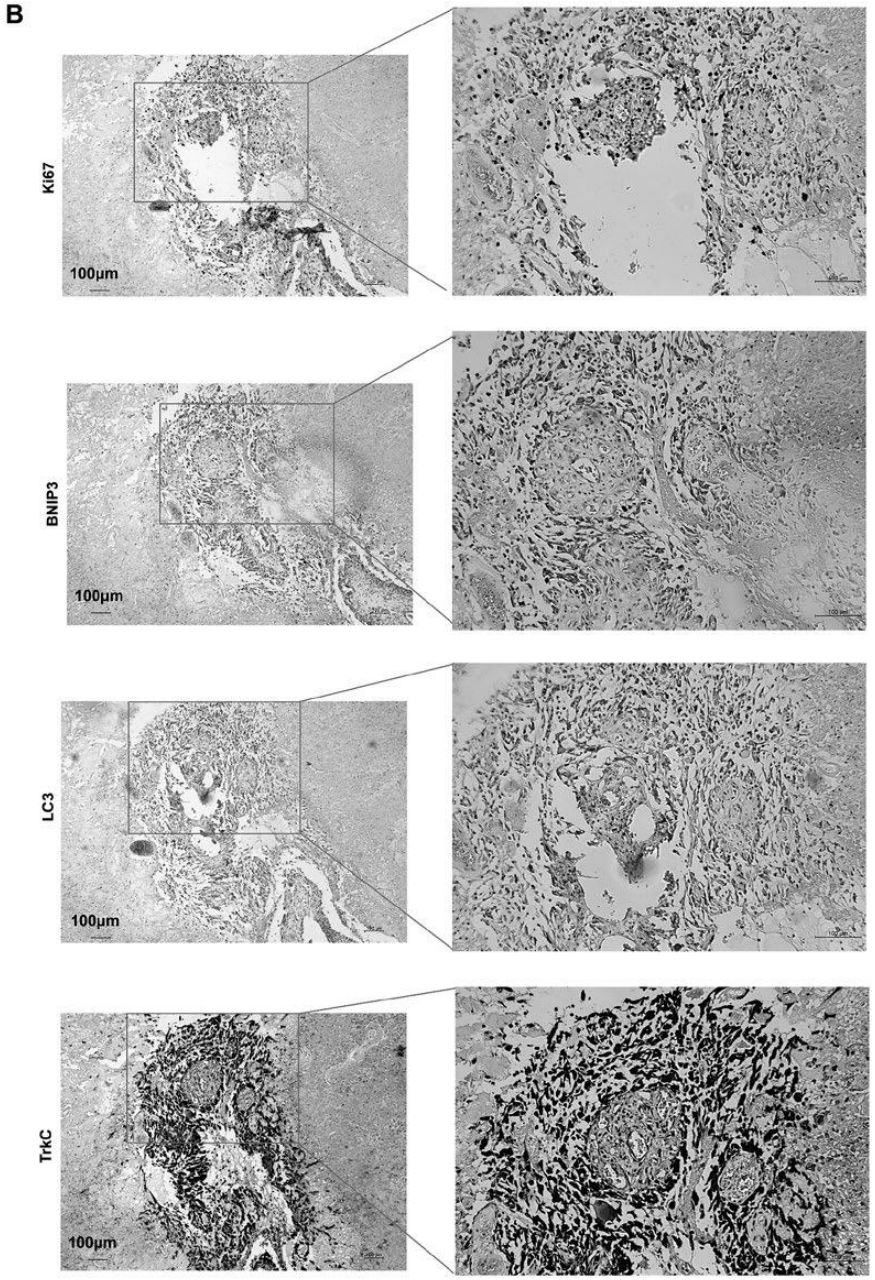


Figure 5. *Continued*

inhibition is not enough to restore an apoptotic death of hypoxic GBM cells, as already published (41). Neurotrophins and their receptors constitute growth factor signaling pathways initially involved in cell physiology of neural cells (42) and present in numerous cell types. Although recent studies highlight their roles in cancer biology and progression (43,44), the precise function of Trk receptor expression in GBM is not fully understood. We hypothesized that this growth factor receptor family could be involved in the resistance of glioblas- toma cells to hypoxia, in complement of autophagy activation. Indeed, hypoxia-cultured GBM cells exhibited an enhancement of both TrkC and NT-3 expressions when compared to normoxia. This increase did not involve either TrkB/BDNF, whose level remained unchanged, or TrkA/NGF, absent from these cell lines. Hypoxia induced overexpression of TrkC and a downstream potentiation of p38MAPK, a well-known stress-associated pathway. This enhancement was even more prominent when autophagy was inhibited, corroborating a pro-tumoral function of this kinase (45). This highlights the powerful role of TrkC/NT-3 in GBM cell survival with a compensatory effect of autophagy defect. Links between p38MAPK and the autophagic process have been previously studied in several cancer models (46–48). It is well known that p38MAPK plays an important role in the regulation of apoptosis, cell cycle arrest, growth inhibition and differentiation. Previous studies, dealing with the molecular process of this interaction, demonstrated that p38 MAPK can negatively regulate both starvation and senescence-induced autophagy through a negative regulation of the mAtg9/p38IP complex formation (48,49). These authors argued on reduced amino-acid levels, driving inactivation of p38, in order to provide metabolic precursors by means of autophagy, which was not the case in hypoxia. However, other studies reported a positive role of p38 activation in autophagy

BY-NC-ND

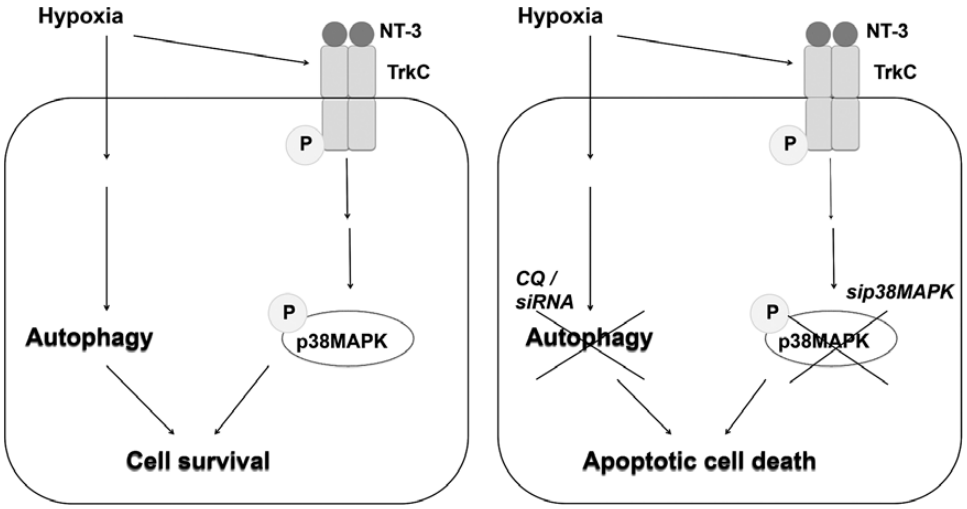


Figure 6. Graphical abstract presenting data on autophagy and neurotrophin activation during hypoxia in glioblastoma cells.

induction in cancer cells after treatments (50,51). Such contradictory works are of little help in determining the exact role of this MAP kinase in the regula- tion of autophagy, which seems to be both a positive or negative regulator (47). These conflicting results may suggest that the role of p38α in autophagy is dependent on the cell type or the stimu- lus responsible for its activation. Our results indicate that both processes may exist within the same GBM cell type and promote survival in response to hypoxic stress. However, further analysis is needed to elucidate the possible links between these two pathways in this tumor model.

Finally the relevance of TrkC/NT-3 pathway was also supported by *ex vivo* observations, established on 20 patients. Indeed, strong expressions of both neurotrophin and its receptor were found specifically in tissues from GBM patients. Furthermore, within the same tumor, we observed a differential expression level, low in the infiltrated parenchyma and high in the tumoral area. Under hypoxic stress, the simultaneous expression of hypoxic, autophagic and neurotrophic markers (respectively BNIP3, LC3 punctiform staining and TrkC) suggests a cooperative effect, allowing cell proliferation (supported by Ki67 staining) contributing to GBM aggressiveness. These data agree in part with Lawn et al (43) who reported, in tumor samples, a strong expression of TrkB and TrkC as well as BDNF and NT-3, which is particularly significant in relation to the survival of brain-tumor initiating cells.

Finally, in order to try to kill tumor cells, inhibition of both survival pathways was performed and succeeded to induce an apoptotic cell death as indicated by PARP cleavage and cell loss. Although autophagic inhibition is often sufficient to restore apoptotic cell death in several models (14,19,52), GBM are strongly hypoxia-resistant tumors and combined treatments are necessary to inhibit proliferation, as previously reported (41,53). In an earlier study, Hansen *et al*. (25) targeted neurotrophin pathway to induce an autophagic cell death. However, this was dependent on overexpression of TrkA, which is absent in U87MG and M059K cell lines. Bassili *et al*. also described an incidence of neutrophin expression and autocrine loop in brain tumors cell fate (54), potentially contributing to cell stress resistance. For these last years, Trk inhibitors became available (55); so, a promising future GBM therapy could consist in a combination of CQ and Trk inhibition.

In conclusion (Figure 6), these data support that both autophagy and neurotrophin pathway (i.e. TrkC/NT-3) cooperate to induce a strong hypoxia resistance of GBM cells, that probably contribute to aggressiveness. The dual inhibition of both signaling pathways is necessary to induce cell death, which suggests that combined treatment is mandatory.

Supplementary Material

Supplementary data are available at *Carcinogenesis* online.

Acknowledgements

The authors express thanks to A.Chaunavel for providing different patients' tumors, all the members of "Anathomo-Pathologie" service of the CHU of Limoges for achieving different tumors' sections, Dr F.Terro for his technical help in fluorescence microscopy and Dr M.Guilloton for manuscript editing. S.J. and S.H. were supported by fellowships from the 'Conseil Régional du Limousin'.

Conflict of Interest Statement: None declared.

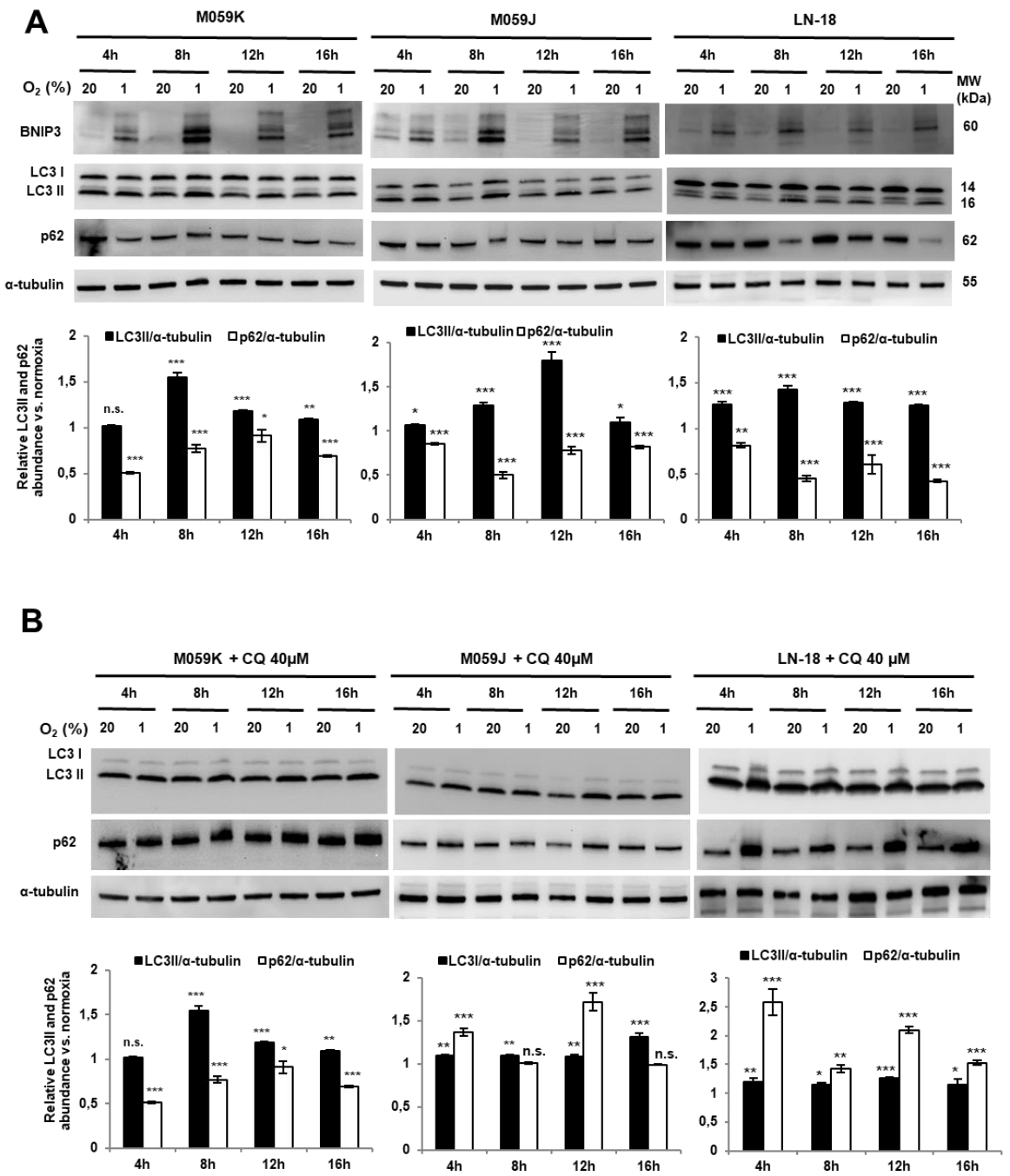
References

1. Louis, D.N. *et al*. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol., 114, 97–109.
2. Louis, D.N. *et al*. (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol., 131, 803–820.
3. Sturm, D. *et al*. (2014) Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi) genomic culprits emerge. Nat. Rev. Cancer, 14, 92–107.
4. Kleinschmidt-DeMasters, B.K. et al. (2005) Glioblastomas in the older old. Arch. Pathol. Lab. Med., 129, 624–631..
5. Ohgaki, H. *et al*. (2004) Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. Cancer Res., 64, 6892–6899.
6. Figarella-Branger, D. *et al*. (2005) [Histological classification of human gliomas: state of art and controversies]. Bull. Cancer, 92, 301–309.
7. Pouysségur, J. *et al*. (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. Nature, 441, 437–443.
8. Papandreou, I. *et al*. (2005) Cellular reaction to hypoxia: sensing and responding to an adverse environment. Mutat. Res., 569, 87–100.
9. Wouters, B.G. *et al*. (1997) Cells at intermediate oxygen levels can be more important than the "hypoxic fraction" in determining tumor response to fractionated radiotherapy. Radiat. Res., 147, 541–550.
10. Kaur, B. *et al*. (2005) Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. Neuro. Oncol., 7, 134–153.
11. Mazure, N.M. *et al*. (2010) Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? Curr. Opin. Cell Biol., 22, 177–180.

BY-NC-ND

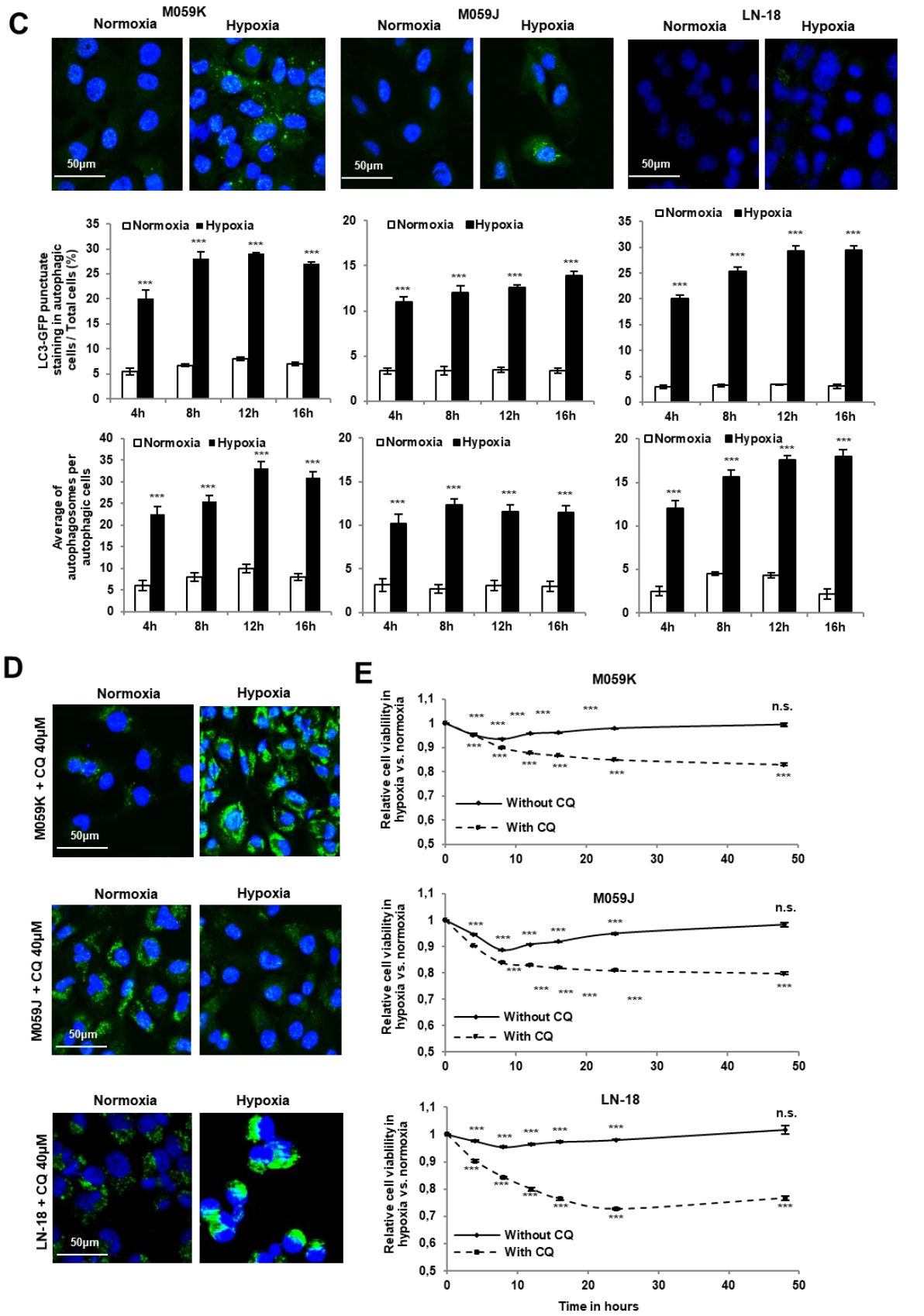
12. Hu, Y.L. *et al*. (2012) Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. Cancer Res., 72, 1773–1783.
13. Levine, B. *et al*. (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? J. Clin. Invest., 115, 2679–2688.
14. Hait, W.N. *et al*. (2006) A matter of life or death (or both): understanding autophagy in cancer. Clin. Cancer Res., 12(7 Pt 1), 1961–1965.
15. Kroemer, G. *et al*. (2010) Autophagy and the integrated stress response. Mol. Cell, 40, 280–293.
16. Kirisako, T. *et al*. (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. J. Cell Biol., 151, 263–276.
17. Kabeya, Y. *et al*. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J., 19, 5720–5728.
18. Pankiv, S. *et al*. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. J. Biol. Chem., 282, 24131–24145.
19. Naves, T. *et al*. (2013) Autophagy takes place in mutated p53 neuroblastoma cells in response to hypoxia mimetic CoCl(2). Biochem. Pharma- col., 85, 1153–1161.
20. Viry, E. *et al*. (2014) Autophagy: an adaptive metabolic response to stress shaping the antitumor immunity. Biochem. Pharmacol., 92, 31–42.
21. Sridharan, S. *et al*. (2011) Regulation of autophagy by kinases. Cancers (Basel)., 3, 2630–2654.
22. Hamel, W. *et al*. (2000) Growth factors in gliomas revisited. Acta Neurochir. (Wien)., 142, 113–37; discussion 137.
23. Arévalo, J.C. *et al*. (2006) Neurotrophin signaling: many exciting surprises! Cell. Mol. Life Sci., 63, 1523–1537.
24. Kim, M.S. *et al*. (2013) TrkC promotes survival and growth of leukemia cells through Akt-mTOR-dependent up-regulation of PLK-1 and Twist-1. Mol. Cells, 36, 177–184.
25. Hansen, K. *et al*. (2007) Autophagic cell death induced by TrkA receptor activation in human glioblastoma cells. J. Neurochem., 103, 259–275.
26. Cohen, S. *et al*. (1956) A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 42, 571–574.
27. Barde, Y.A. *et al*. (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. EMBO J., 1, 549–553.
28. Hohn, A. *et al*. (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. Nature, 344, 339–341.
29. Kaplan, D.R. *et al*. (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. Curr. Opin. Neurobiol., 10, 381–391.
30. Akil, H. *et al*. (2011) Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. PLoS One, 6, e25097.
31. Golden, E.B. *et al*. (2014) Chloroquine enhances temozolomide cytotoxicity in malignant gliomas by blocking autophagy. Neurosurg. Focus, 37, E12.
32. Klionsky, D.J. *et al*. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy, 12, 1–222.
33. Kimura, T. *et al*. (2013) Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. Cancer Res., 73, 3–7.
34. Burton, T.R. *et al*. (2006) The pro-cell death Bcl-2 family member, BNIP3, is localized to the nucleus of human glial cells: Implications for glioblastoma multiforme tumor cell survival under hypoxia. Int. J. Cancer, 118, 1660–1669.
35. Cosse, J.P. *et al*. (2008) Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. Anti-cancer. Agents Med. Chem., 8, 790–797.
36. Mizushima, N. (2007) Autophagy: process and function. Genes Dev., 21, 2861–2873.
37. Lorin, S. *et al*. (2013) Autophagy regulation and its role in cancer. Semin. Cancer Biol., 23, 361–379.
38. Chen, N. *et al*. (2009) Role and regulation of autophagy in cancer. Biochim. Biophys. Acta, 1793, 1516–1523.
39. Hanahan, D. *et al*. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144, 646–674.
40. Li, J. *et al*. (2009) The prosurvival role of autophagy in Resveratrol-induced cytotoxicity in human U251 glioma cells. BMC Cancer, 9, 215.
41. Zanotto-Filho, A. *et al*. (2015) Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastomas. Cancer Lett., 358, 220–231.
42. Reichardt, L.F. (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 361, 1545–1564.
43. Lawn, S. *et al*. (2015) Neurotrophin signaling via TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells. J. Biol. Chem., 290, 3814–3824.
44. Ivanov, S.V. *et al*. (2013) TrkC signaling is activated in adenoid cystic carcinoma and requires NT-3 to stimulate invasive behavior. Oncogene, 32, 3698–3710.
45. Wagner, E.F. *et al*. (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. Nat. Rev. Cancer, 9, 537–549.
46. de la Cruz-Morcillo, M.A. *et al*. (2013) Abrogation of the p38 MAPK α signaling pathway does not promote radioresistance but its activity is required for 5-Fluorouracil-associated radiosensitivity. Cancer Lett., 335, 66–74.
47. Sui, X. *et al*. (2014) p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. Cancer Lett., 344, 174–179.
48. Webber, J.L. *et al*. (2010) Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. EMBO J., 29, 27–40.
49. Henson, S.M. *et al*. (2014) p38 signaling inhibits mTORC1-independent autophagy in senescent human $CD8^+$ T cells. J. Clin. Invest., 124, 4004–4016.
50. Xu, L. *et al*. (2016) Neferine induces autophagy of human ovarian can- cer cells via p38 MAPK/ JNK activation. Tumour Biol., 37, 8721–8729.
51. Innajak, S. *et al*. (2016) Goniothalamin induces apoptosis associated with autophagy activation through MAPK signaling in SK-BR-3 cells. Oncol. Rep., 35, 2851–2858.
52. He, C. *et al*. (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu. Rev. Genet., 43, 67–93.
53. Efferth, T. *et al*. (2004) Combination treatment of glioblastoma multiforme cell lines with the anti-malarial artesunate and the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor OSI-774. Biochem. Pharmacol., 67, 1689–1700.
54. Bassili, M. *et al*. (2010) Differential roles of Trk and p75 neurotrophin receptors in tumorigenesis and chemoresistance ex vivo and in vivo. Cancer Chemother. Pharmacol., 65, 1047–1056.
55. Choi, H.S. *et al*. (2015) (R)-2-phenylpyrrolidine substituted imidazopyridazines: a new class of potent and selective pan-TRK Inhibitors. ACS Med. Chem. Lett., 6, 562–567.

BY-NC-ND



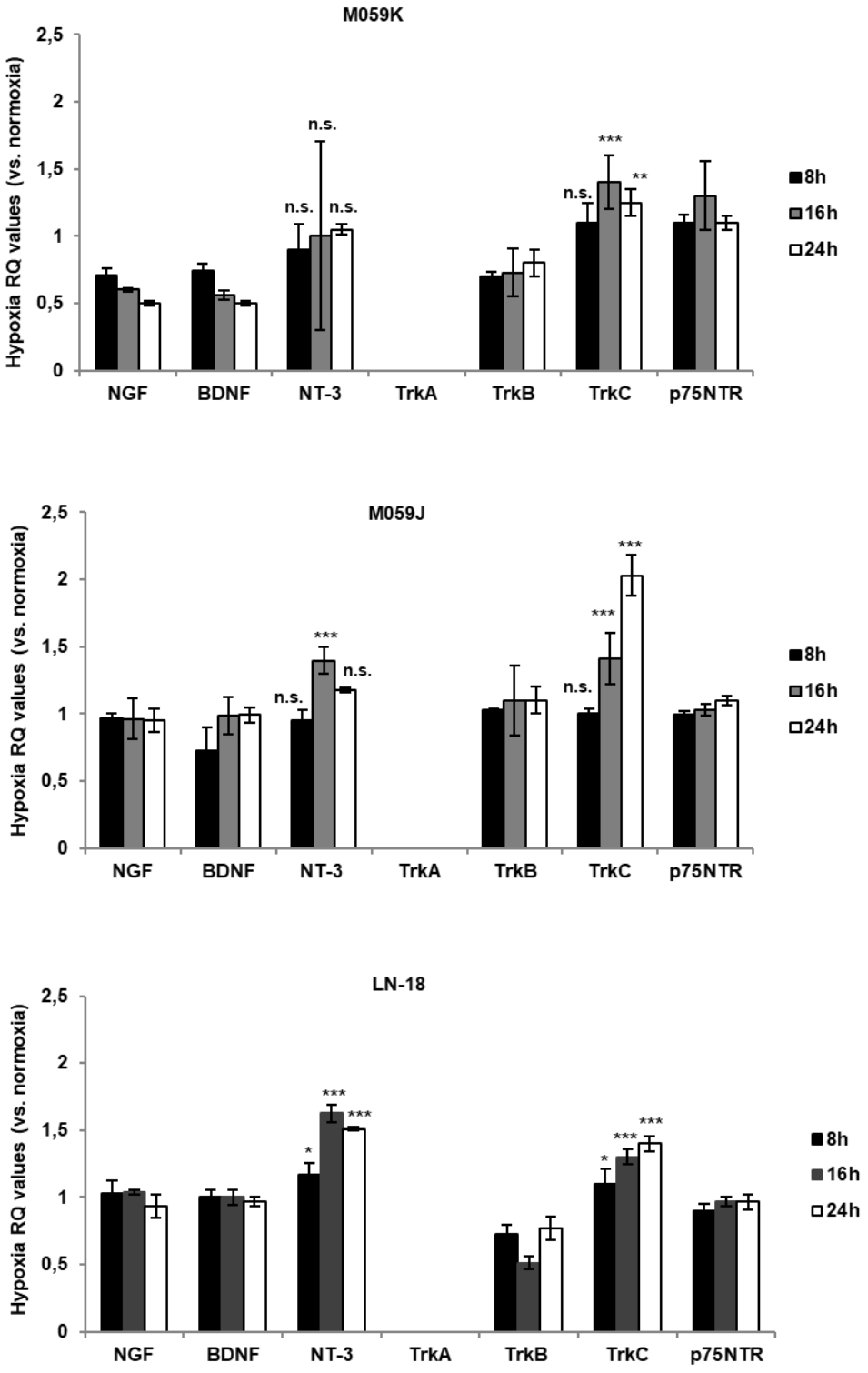
Supplemental Figure 1

BY-NC-ND



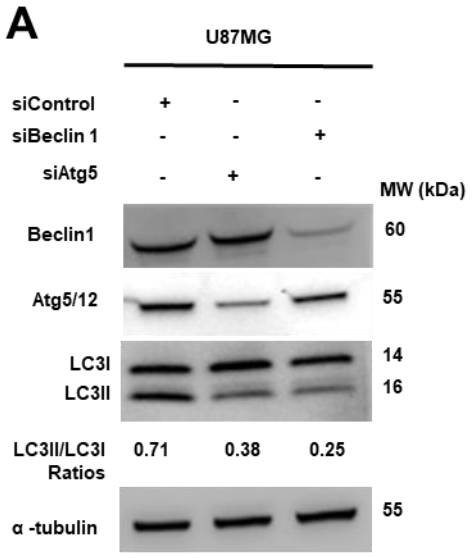
Supplemental Figure 1

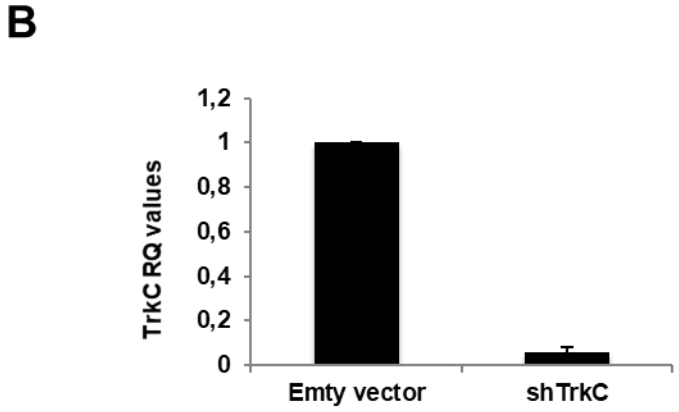
BY-NC-ND

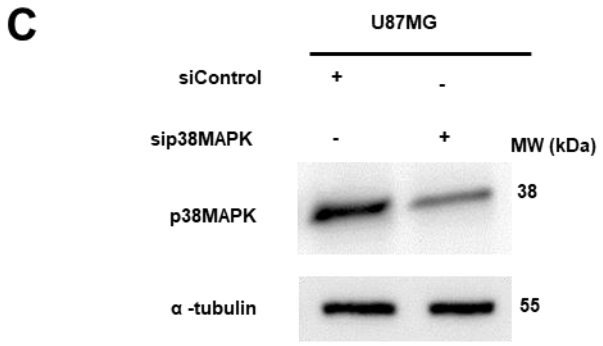


Supplemental Figure 2

BY-NC-ND

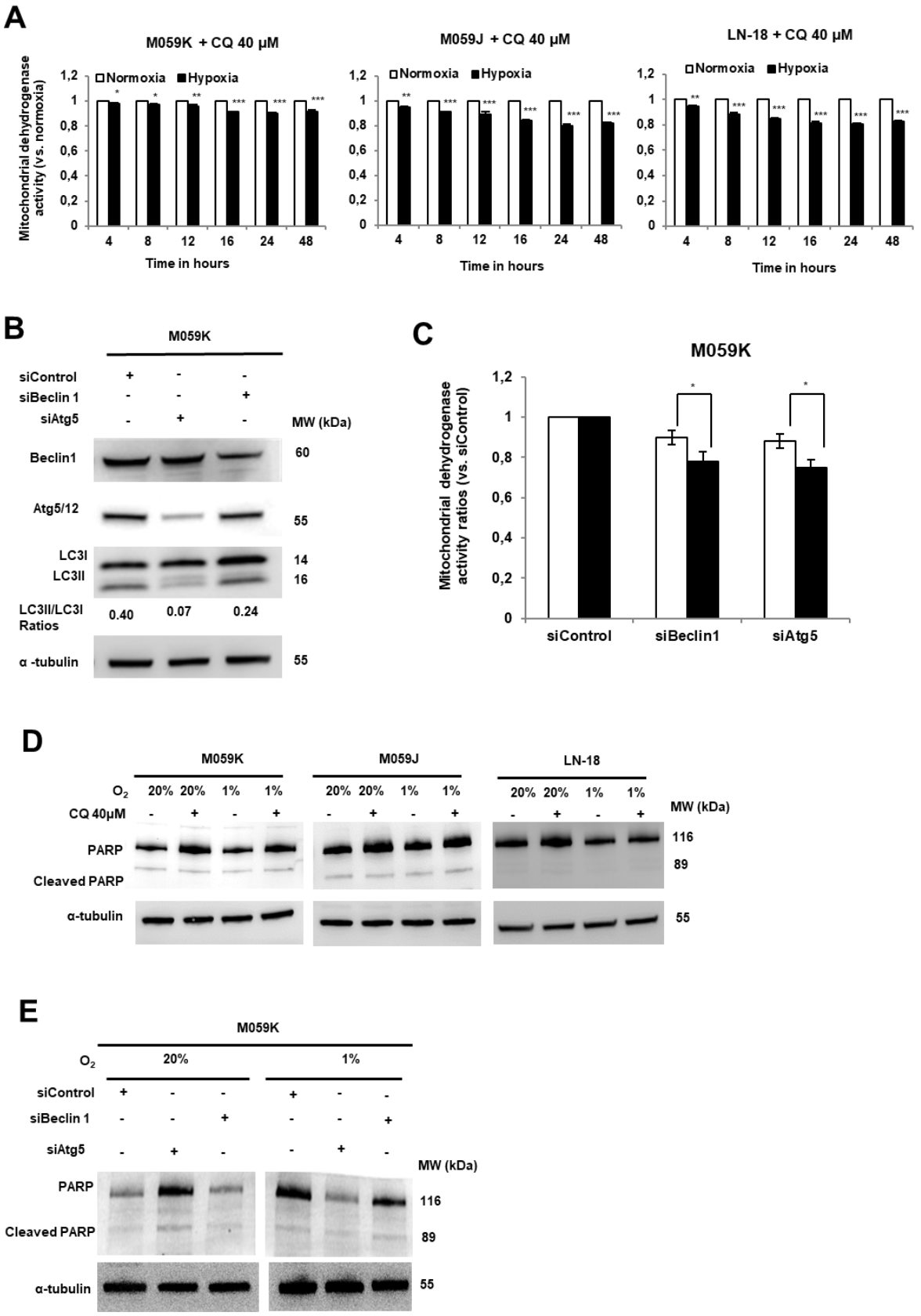






Supplemental Figure 3

BY-NC-ND



Supplemental Figure 4

BY-NC-ND

Supplemental data

Supplemental Figure 1: Hypoxia induced efficient autophagy in M059K, M059J and LN-18 cell lines. (A) Cells were cultured in normoxia or hypoxia for up to 16 h. As shown in cropped western blot, BNIP3 expression increased, as well as the LC3I-LC3II conversion and p62 degradation in hypoxic conditions. In histograms, LC3II/α-tubulin ratio and p62 level were normalized to normoxia. (B) Autophagic flux inhibition by CQ induced the accumulation of proteins LC3II and p62 which is consistent with functional autophagy; the accumulation was higher under hypoxic conditions (mean of 3 independent experiments, *p<0.05; ***p<0.001). (C) Culture of GFP-LC3 transfected M059K and M059J cells in hypoxia increased the punctuate green fluorescent staining reflecting autophagosome nucleation. Similar results were obtained with endogenous LC3 in LN-18 cells. (D) M059K, M059J and LN-18 cell lines were cultured in normoxia or hypoxia in the presence or not of CQ for up to 24 h. CQ increased the LC3 green fluorescent staining in the three cell lines, highlighting the blockade of autophagosome degradation. (E) M059k, M059J and LN-18 cells were cultured in normoxia or hypoxia in the presence, or not, of CQ for up to for up to 48 hours. Cellular viability was assessed by Trypan Blue exclusion. The solid curve represented the values obtained at different times for the hypoxic conditions (reported to normoxia), and the dotted curve represented the same analysis, when autophagy was inhibited (+ CQ, mean of 3 independent experiments ***p<0.001 (mean of 3 independent experiments ***p<0.001).

Supplemental Figure 2: Hypoxia induced a TrkC increase in M059K, M059J and LN-18 cell lines. Quantitative RT-PCR analyses of neurotrophins and their receptors were realized on the three cell lines cultured in normoxia or hypoxia. Relative quantities (RQ) of all transcripts were obtained after normalization to *HPRT1* in hypoxia relative to normoxia for 8, 16 and 24 h. Error bars represent mean deviation (mean of 3 separate experiments, n.s.: not significant, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Supplemental Figure 3: Validation of siRNA and shRNA used against Beclin1, Atg5 and TrkC transcripts. (A) U87MG cells were transfected with siControl, siBeclin1 or siAtg5. Proteins were extracted and Beclin1 and Atg5 proteins were checked by western blot (cropped images). The decrease of LC3II/LC3I conversion was also assessed by western blot. (B) U87MG cells were transfected with empty vector or shTrkC. RNA were extracted and TrkC was checked by Q-RT-PCR. Relative quantities (RQ) for TrkC transcripts were obtained after normalization to *HPRT1* in cells transfected with shTrkC relative to those transfected with the empty vector. (C) U87MG cells were transfected with siControl or sip38MAPK. Proteins were extracted and p38MAPK protein was checked by western blot.

Supplemental Figure 4: Inhibition of hypoxia-induced autophagy in M059K, M059J and LN-18 cells decreased cellular metabolic activity but did not induce cell death. (A) The

BY-NC-ND

three cell lines were treated by CQ then cultured in normoxia or hypoxia for up to 16 h. After a XTT assay, mitochondrial succinate dehydrogenase activity was normalized to normoxia. (B) M059K cells were transfected with siControl, siBeclin1 or siAtg5. Proteins were extracted and Beclin1 and Atg5 proteins were checked by western blot as shown on cropped images. (C) 48 h after transfection with siControl, siBeclin1 or siAtg5, M059K cells were cultured in normoxia or hypoxia for 16 h. After a XTT assay, mitochondrial succinate dehydrogenase activity was normalized to siControl. Using siBeclin1 or siAtg5 decreased cellular metabolic activity especially in hypoxia (mean of 3 independent experiments, **$p<0.01$; ***$p<0.001$). (D) Analyzing PARP in the three cell lines by western blot upon CQ treatment did not show any enhancement of PARP cleavage. (E) Similar results were obtained with M059K cells when transfected with siBeclin1 or siAtg5, confirming the lack of cell death when autophagy was inhibited.

BY-NC-ND

Les principaux résultats de ces travaux sont résumés ci-dessous.

Les quatre lignées ont montré une stabilisation et une translocation d'HIF-1 du cytoplasme vers le noyau et une augmentation de l'expression de $BNIP_3$, une de ses protéines cibles, qui valident l'hypoxie cellulaire. Nous avons ensuite montré que l'autophagie et la signalisation TrkC sont deux voies qui collaborent dans la protection des cellules de GBM contre l'hypoxie. En effet, dès les premières heures de stress (4h), les cellules mettent rapidement en place une réponse autophagique. Cela est révélé par la conversion de LC3I en LC3II et par la dégradation de la protéine p62, lorsque les cellules sont cultivées en hypoxie, et, au contraire, par l'accumulation de la LC3II et de la p62 lorsque le flux autophagique est bloqué par la chloroquine, un inhibiteur de la fusion lysosome-autophagosome. L'hypoxie provoque un ralentissement de la prolifération cellulaire, mais après 24h, celle-ci redevient identique à celle des cellules cultivées en normoxie, ce qui souligne que l'autophagie permet à la cellule de s'adapter au manque d'oxygène, notamment dans les premières heures du stress.

L'inhibition de l'autophagie par la chloroquine empêche ce retour à la normale, le taux de prolifération ne descend cependant pas en dessous de 80% de celui des cellules cultivées en normoxie, laissant supposer un second mécanisme de protection capable de prendre le relais. Du fait de la dérégulation des voies impliquant les facteurs de croissance, nous nous sommes intéressés aux neurotrophines, facteurs de croissance spécifiques du SNC. L'étude, réalisée par RT-PCR quantitative (q-RT-PCR) montre que la réponse à l'hypoxie s'accompagne spécifiquement d'une augmentation d'expression de la NT3 et de son récepteur TrkC. Nous avons pu mettre en évidence que la voie de signalisation située en aval de TrkC est activée pour la survie des cellules de glioblastome en conditions hypoxiques. En effet, après 16h d'hypoxie, nous observons une augmentation de l'expression et de la phosphorylation du récepteur TrkC, traduisant son activation. Celle-ci est amplifiée lorsque l'autophagie est inhibée, que ce soit par la CQ ou par siRNA dirigés contre Beclin1 ou ATG5. Nous avons ensuite étudié les voies de signalisation activées en aval du récepteur TrkC et nous avons mis en évidence la phosphorylation d'une cible particulière, la protéine p38-MAPK, MAP kinase dont l'engagement est classiquement associé à un signal de stress. Cependant, la protéine ERK1/2, également impliquée dans la voie des MAP kinases est, au contraire, moins phosphorylée lors de cette activation suite au stress hypoxique. Ces résultats suggèrent que l'activité de la voie TrkC en réponse à l'autophagie passe par la p38-MAPK. L'inhibition de l'autophagie par la chloroquine accentue l'augmentation de la phosphorylation de p38MAPK. Ceci suggère une compensation par la voie des neurotrophines, favorisant la survie des cellules cancéreuses soumises à un stress hypoxique, en cas de défaillance de l'autophagie.

BY-NC-ND

Cependant, la p38-MAPK peut être activée par différentes voies de signalisation, afin de confirmer qu'ici son activation a lieu suite à l'activation de TrkC, nous avons inhibé l'expression de ce récepteur à l'aide d'un shRNA. Cette inhibition entraine une diminution de l'activation de la p38MAPK, particulièrement lorsque les cellules sont en hypoxie, ce qui confirme l'implication de cette voie dans la réponse neurotrophique à l'hypoxie. Nous avons complété cette étude en analysant l'activité métabolique, à travers l'activité déshydrogénase mitochondriale, des cellules dans ces mêmes conditions. Il apparait que l'inhibition de l'autophagie par la CQ ou des siRNA, dirigés contre les protéines ATG5 et Beclin1, entraine une diminution de l'activité métabolique des cellules cultivées en hypoxie, celle-ci s'accentuant au cours du temps. Cependant cette inhibition, qu'elle soit pharmacologique ou génique, n'induit pas d'augmentation de l'apoptose. De la même manière, l'inhibition de la voie TrkC par un siRNA dirigé contre la p38MAPK conduit également à une baisse de l'activité métabolique des cellules cultivées en hypoxie. Seule la double inhibition, de la voie TrkC et de l'autophagie, entraine en plus d'une diminution plus forte de l'activité métabolique, une baisse de la viabilité cellulaire, associée au clivage de la PARP (signe d'une mort apoptotique), principalement pour les cellules cultivées en hypoxie. La double inhibition entraine également une baisse de la clonogénicité (réduction du nombre et de la taille des colonies lorsque les cellules sont cultivées en milieu semi-solide). Ces éléments confirment l'importance des deux mécanismes, l'autophagie et la signalisation neurotrophique, dans la survie et la tumorigénicité des cellules de GBM en conditions hypoxiques.

Ces résultats concordent avec le marquage de LC3 (indiquant l'activation de l'autophagie) et la surexpression du récepteur TrkC ainsi que de NT3, observés sur les coupes de tumeurs des patients atteints de GBM. Cette surexpression de TrkC est associée à une forte expression nucléaire de BNIP3, ainsi qu'à une expression élevée du marqueur de prolifération Ki67. Ce qui est particulièrement intéressant dans les résultats obtenus sur les coupes de patients est que lorsque l'on s'éloigne du cœur de la tumeur (zone particulièrement hypoxique, comme en atteste le marquage BNIP3), l'expression de TrkC et de LC3 diminuent. Comme cette zone centrale, pauvre en oxygène, est connue pour héberger de façon préférentielle les CSC, cela semble indiquer un lien entre ce compartiment cellulaire et les deux signalisations de survie étudiées ici. Outre assurer la survie des cellules tumorales, ces deux mécanismes pourraient également contribuer à l'agressivité et à la résistance des tumeurs cérébrales.

BY-NC-ND

I.2. Travaux complémentaires

Pour ce premier travail, nous avions utilisé des siRNA pour diminuer l'expression de protéines de l'autophagie ou de la signalisation de TrkC. Comme cette approche ne permet pas l'obtention d'une extinction stable, nous avons préféré mettre au point une extinction par shRNA pour les études ultérieures. En effet, les siRNA ne sont pas intégrés à un plasmide, seule la quantité transfectée permettra l'extinction du gène ciblé. Les shRNA, au contraire, sont intégrés à un plasmide capable de se répliquer et d'exprimer le shRNA de façon continue. De plus, la séquence codant pour le shRNA contenue dans le plasmide va être intégrée au génome de la cellule, ce qui assure une extinction stable dans le temps. Pour la suite de nos travaux, nous avons donc bloqué l'autophagie ou la signalisation TrkC, à l'aide de shRNA contre Beclin1, ATG5 ou TrkC dans le modèle cellulaire U87-MG.

Nous avons également modifié le temps d'exposition des cellules à l'hypoxie, en effet, l'autophagie est un processus qui se met en place plutôt rapidement, c'est pourquoi les premiers travaux ont été réalisés après des temps d'expositions courts à l'hypoxie (maximum 24h). Mais la signalisation neurotrophique nécessite des délais plus longs pour se mettre en place (Rajagopal et al., 2004). C'est également le cas pour l'émergence des CSC (Sehl et al., 2015). C'est pourquoi la deuxième partie de ce travail est réalisée après une exposition des cellules à 96h d'hypoxie.

I.2.1. Validation/mise en place des modèles

I.2.1.1. Modulation de l'autophagie

Afin de moduler l'autophagie nous avons utilisé des shRNA ciblant les ARN codant les protéines Beclin1 et ATG5. Comme présenté dans l'introduction ces protéines sont impliquées dans la phase d'initiation de l'autophagie. Leur expression relative a été évaluée par Western Blot (figure 18). Pour l'intégralité de ces travaux, les résultats obtenus avec les U87-MG ayant reçu les vecteurs contenant les shRNA seront comparés à ceux obtenus sur des U87-MG ayant reçu un vecteur ne contenant pas de shRNA dans le but de ne pas introduire de biais dû à la présence du vecteur. Cette lignée sera désignée U87-pLKO.

BY-NC-ND

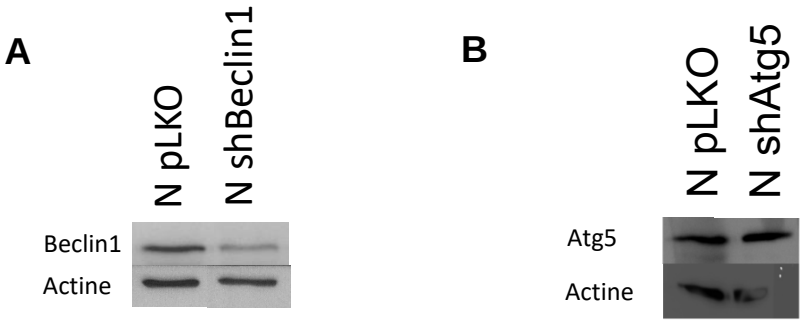


Figure 18 : Vérification de l'extinction de l'expression des protéines Beclin1 (A) et Atg5 (B), après 96h de culture en normoxie (N), par Western Blot. n=5

Lorsque l'expression protéique est inhibée par shRNA, nous observons une diminution de l'expression de la protéine Beclin1 d'environ 55% par rapport aux cellules contrôle. Le shRNA inhibant la traduction d'ATG5 ne permettant pas, quant à lui une extinction efficace (moins de 20%), nous avons choisi de ne garder que le shRNA ciblant Beclin1 pour la suite des travaux.

Pour nous assurer que la diminution de l'expression de Beclin-1 entraine bien une diminution de l'autophagie, nous avons ensuite évalué l'expression de la protéine LC3 par Western Blot (figure 19) et la conversion de LC3I (forme libre et cytoplasmique) en une forme LC3II conjuguée aux phosphatidyléthanolamines, associée à la membrane des autophagosomes. L'augmentation du ratio LC3II/LC3I est un marqueur fiable de l'autophagie (Klionsky et al., 2016).

BY-NC-ND

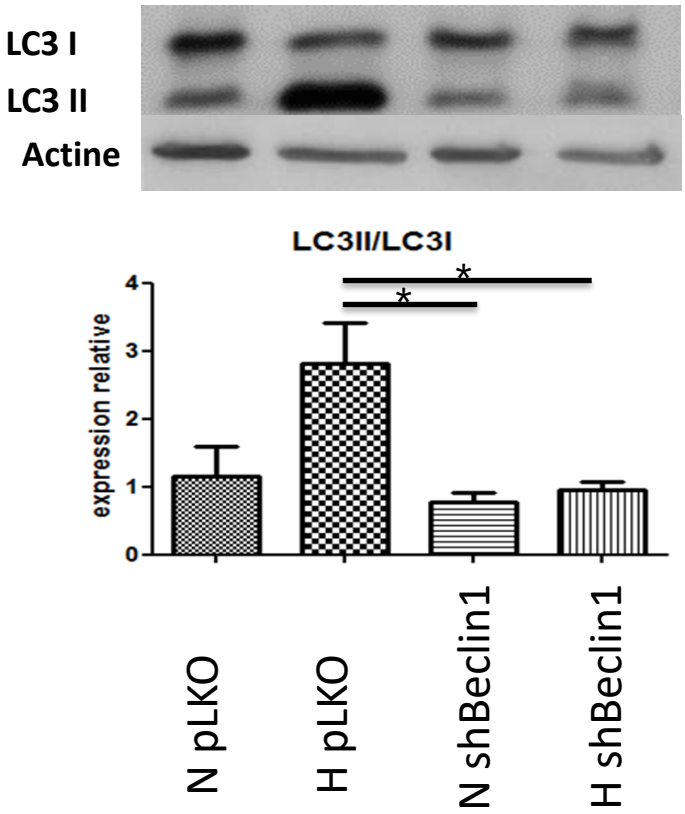


Figure 19 : Expression des deux formes LC3I et II dans la lignée contrôle U87-pLKO et la lignée U87-shBeclin1 en normoxie (N) et en hypoxie (H), par Western Blot. n=3 (* p<0,05)

Pour la lignée U87-pLKO nous observons une conversion de LC3I en LC3II particulièrement visible lorsque les cellules sont cultivées en conditions hypoxiques (x 2,5 par rapport à la normoxie) (figure 19), ce qui corrobore nos observations précédentes. Celle-ci est considérablement diminuée pour la lignée U87-shBeclin1, puisqu'on observe une diminution de 34% du ratio LC3II/LC3I en normoxie (p<0,05), par rapport au contrôle normoxie, et de 66% en hypoxie (p<0,5), par rapport au contrôle hypoxie. L'utilisation du shRNA-Beclin1 permet donc bien d'inhiber l'autophagie.

I.2.1.2. Modulation de la voie TrkC

Afin de moduler la signalisation TrkC nous avons utilisé un shRNA ciblant le transcrit codant pour le récepteur TrkC (celui-ci a été utilisé dans la publication présentée précédemment). Ce shRNA cible les isoformes a, b et d, qui correspondent à trois variants du récepteur TrkC entier « full length » et l'isoforme c, qui correspond au variant tronqué du récepteur TrkC. Seul le TrkC entier présente un domaine kinase intracellulaire. Le TrkC tronqué a cependant une activité, il est capable de signaliser dans les neurones, notamment

BY-NC-ND

via la protéine Arf6 (Esteban., 2006). Nous avons validé l'extinction des différentes isoformes de Trkc par q-RT-PCR (figure 20).

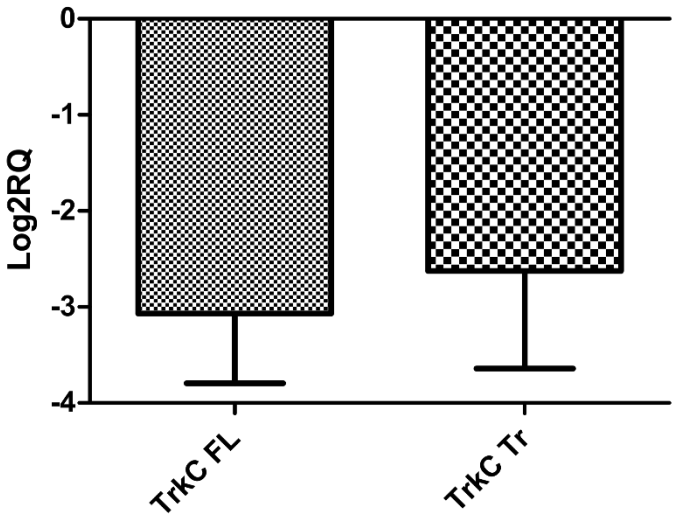


Figure 20 : Expression relative de TrkC entier (Full Lenght -FL) et TrkC Tronqué (Tr) par la lignée U87-shTrkC en normoxie, par q-RT-PCR.
L'expression des deux formes de TrkC a été normalisée par rapport à la GAPDH, puis par rapport à leur expression par les cellules contrôle (qui a été rapportée à 0) (n=4).

Comme attendu, nous observons une diminution de l'expression des deux types de récepteur TrkC, Full length (TrkC FL) (91%) et tronqué (TrkC Tr) (87%), avec le shRNA-TrkC par rapport aux cellules contrôles (figure 20).

Pour nous assurer que la diminution de l'expression de TrkC entraine bien une diminution de la signalisation en aval, nous avons ciblé notre travail sur l'étude de la protéine p38-MAPK et sa phosphorylation (figure 21). En effet, comme nous l'avons montré dans nos travaux précédents, la p38-MAPK est une cible directe de l'activation du récepteur TrkC FL, sa phosphorylation marque donc l'activation de cette voie.

BY-NC-ND

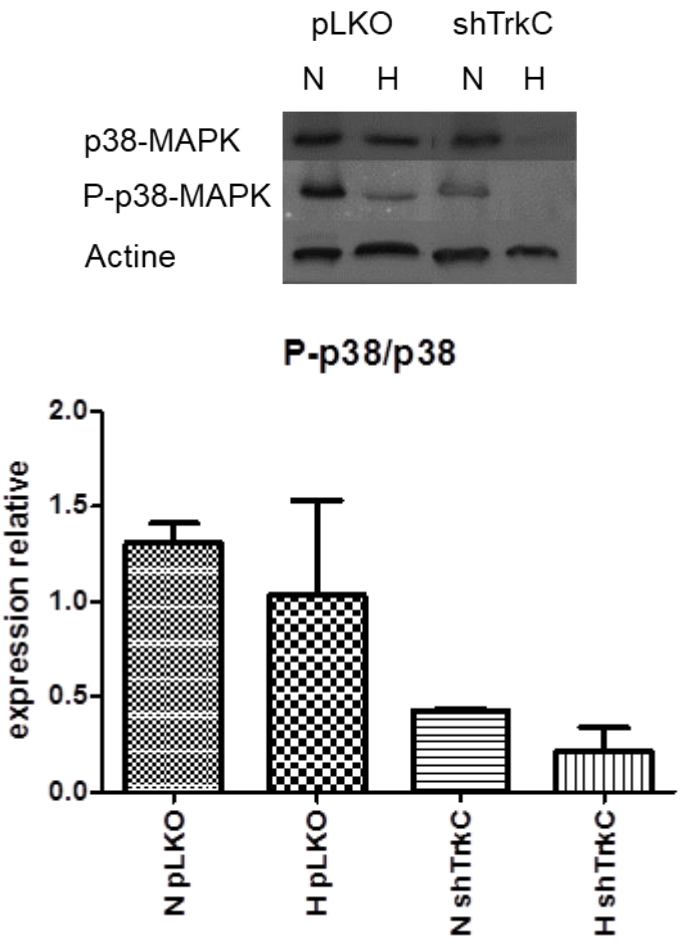


Figure 21 : Expression de la protéine p38-MAPK et de sa forme phosphorylée dans les lignées U87-pLKO et U87-shTrkC après 96h de culture en normoxie ou en hypoxie, par western blot (n=4).

Comme attendu, nous observons une diminution de l'activation de la p38-MAPK pour la lignée U87-shTrkC de 65% en normoxie et de 80% en hypoxie, par rapport à la lignée contrôle (figure 21).

I.2.2. Inhibition de l'autophagie et de TrkC : effets à long terme

Il a été montré précédemment, sur des temps plus courts (ne dépassant pas 24h), que l'inhibition de l'autophagie et de la signalisation TrkC modifient la réponse des cellules aux stress comme l'hypoxie. Nous avons cherché à déterminer si ces modifications étaient toujours observables à plus long terme et si elles impactaient le devenir cellulaire. En effet, l'autophagie est un processus qui se met rapidement en place, mais l'étude des voies métaboliques, en particulier celles affectant le compartiment des cellules souches, nécessite des temps d'exposition plus longs.

BY-NC-ND

I.2.2.1. Collaboration autophagie-signalisation TrkC

Dans le travail initial, nous avons mis en évidence qu'un lien existait entre la signalisation autophagique et la signalisation TrkC. En effet, à court terme (16h d'hypoxie), le blocage de l'autophagie entraine l'activation de la voie de signalisation passant par le récepteur TrkC. Les temps courts ont initialement été choisis pour l'étude de l'autophagie qui est un processus qui se met en place en quelques heures. Nous avons voulu vérifier ces résultats sur des temps plus longs (96h) car la signalisation neurotrophique ainsi que l'émergence et la sélection des cellules souches ne commencent que plus tardivement. Pour cela, nous avons évalué l'activation de l'autophagie à 96h de culture en hypoxie, par l'analyse en Western Blot, de l'expression des différentes formes de LC3 (figure 22).

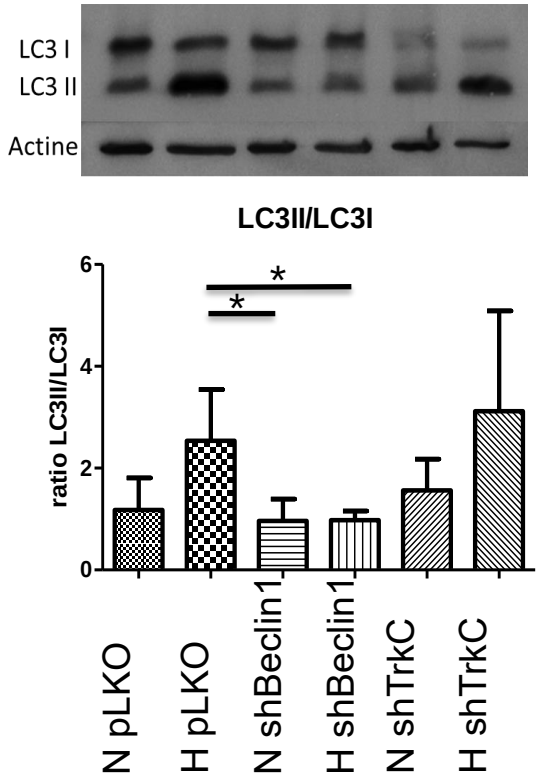


Figure 22 : Etude de l'expression des deux formes LC3I et II par Western Blot sur les différentes lignées après 96h de culture en Normoxie et en Hypoxie (n=3). (* p<0,05)

Comme cela avait été montré sur des temps plus courts, l'hypoxie active l'autophagie dans les U87-pLKO ; en effet nous observons une augmentation du ratio LC3II/LC3I, par rapport à la normoxie, d'environ 140%. Cette augmentation est également observée pour les U87-shTrkC cultivées en hypoxie (en moyenne 96% de plus par rapport aux cellules U87-shTrkC cultivées en normoxie et 18% de plus par rapport aux cellules U87-pLKO cultivées en

BY-NC-ND

hypoxie). Ce résultat montre et confirme l'importance de la compensation entre les deux voies de survie, puisque même après 4 jours de culture en hypoxie, l'activation de l'autophagie est toujours à un niveau élevé quand la signalisation TrkC est inhibée, ce qui souligne la nécessité d'une voie alternative. En revanche, comme attendu, la diminution de l'expression de Beclin1 par shRNA empêche la mise en place du processus autophagique en réponse à l'hypoxie (figure 22).

Nous avons poursuivi avec l'étude de la signalisation TrkC en commençant par l'expression du récepteur sous ses deux formes, totale et tronquée, ainsi que celle de son ligand, la NT3. L'expression des transcrits a été évaluée par q-RT-PCR (figure 23).

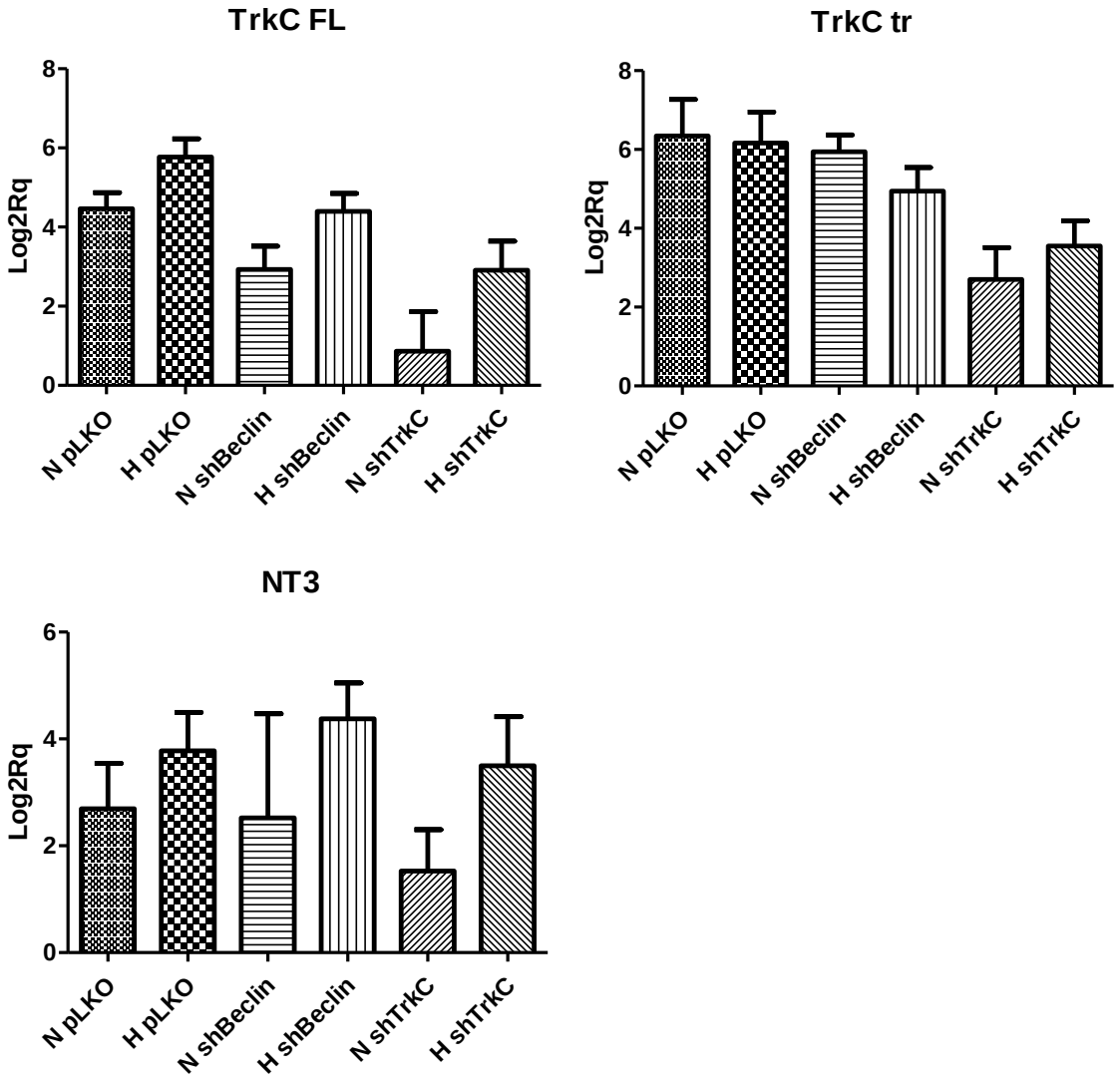


Figure 23 : Etude par q-RT-PCR des transcrits des récepteurs aux neurotrophines TrkC (forme totale et tronquée) et de la neurotrophine NT3 par les différentes lignées après 96h de culture en normoxie ou en hypoxie.
Expression normalisée par rapport à la GAPDH, n=4.

BY-NC-ND

L'exposition à l'hypoxie entraine dans toutes les lignées une augmentation de la transcription du récepteur TrkC sous sa forme totale, mais pas de variation pour sa forme tronquée. On note, comme attendue, une importante diminution de la transcription de la forme complète de ce récepteur (TrkC FL) pour les U87-shTrkC par rapport aux U87-pLKO en normoxie (- 80%) et en hypoxie (- 40%), de même que pour le récepteur tronqué (- 60% en normoxie et - 50% en hypoxie). Les U87-shBeclin montrent également une diminution de l'expression des deux récepteurs, en particulier pour TrkC FL (- 40% en normoxie et - 35% en hypoxie), contrairement à ce qui avait été observé sur des temps courts. Il est possible que la compensation de l'inhibition de l'autophagie par la sur-expression du récepteur TrkC soit un phénomène cinétique-dépendant. Il semble également y avoir une augmentation de la transcription de la NT3 en hypoxie au sein des lignées U87-shBeclin (+ 70%) et U87-shTrkC (+ 130%), et plus faible pour la lignée U87-pLKO (+ 35%) (figure 23).

Nous nous sommes également intéressés à deux co-récepteurs de TrkC, p75^{NTR} et la sortiline (récepteur de la neurotensine) qui pourraient participer à la compensation de l'inhibition de l'autophagie ou de la signalisation TrkC (figure 24).

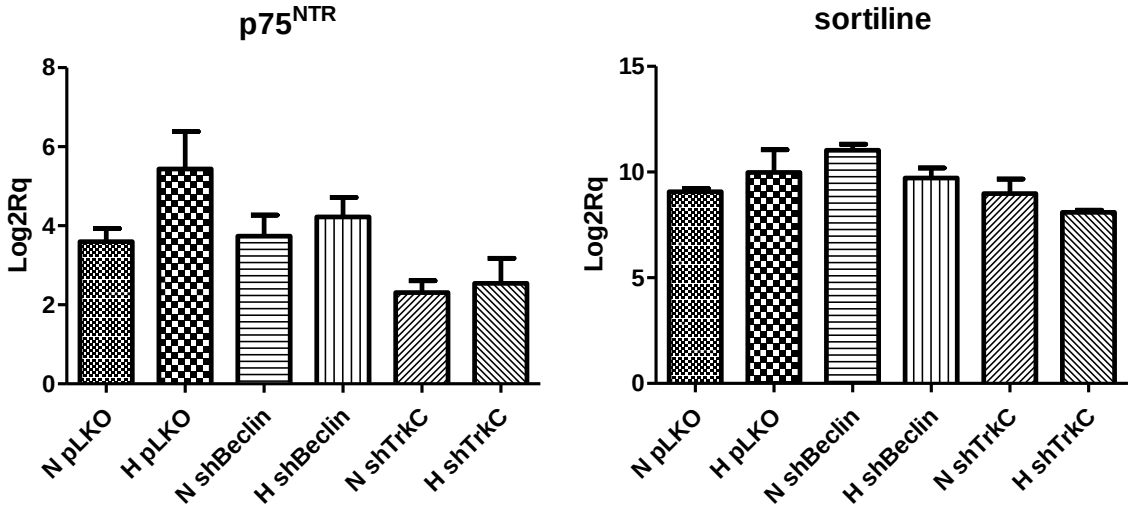


Figure 24 : Etude par q-RT-PCR des transcrits du récepteur aux neurotrophines p75^{NTR} et du récepteur à la neurotensine, la sortiline par les différentes lignées après 96h de culture en normoxie ou en hypoxie.
Expression normalisée par rapport à la GAPDH, n=3.

La transcription de p75^{NTR} varie avec l'hypoxie uniquement pour le U87-pLKO (+ 50%), mais elle semble être moins importante pour les U87-shTrkC que pour les deux autres lignées (- 35% en normoxie). La transcription de la sortiline ne varie pas en hypoxie, quelle que soit la lignée et ne varie pas non plus entre les lignées (figure 24)

Pour compléter cette étude nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression protéique de TrkC et de la NT3 par Western Blot (figure 25).

BY-NC-ND

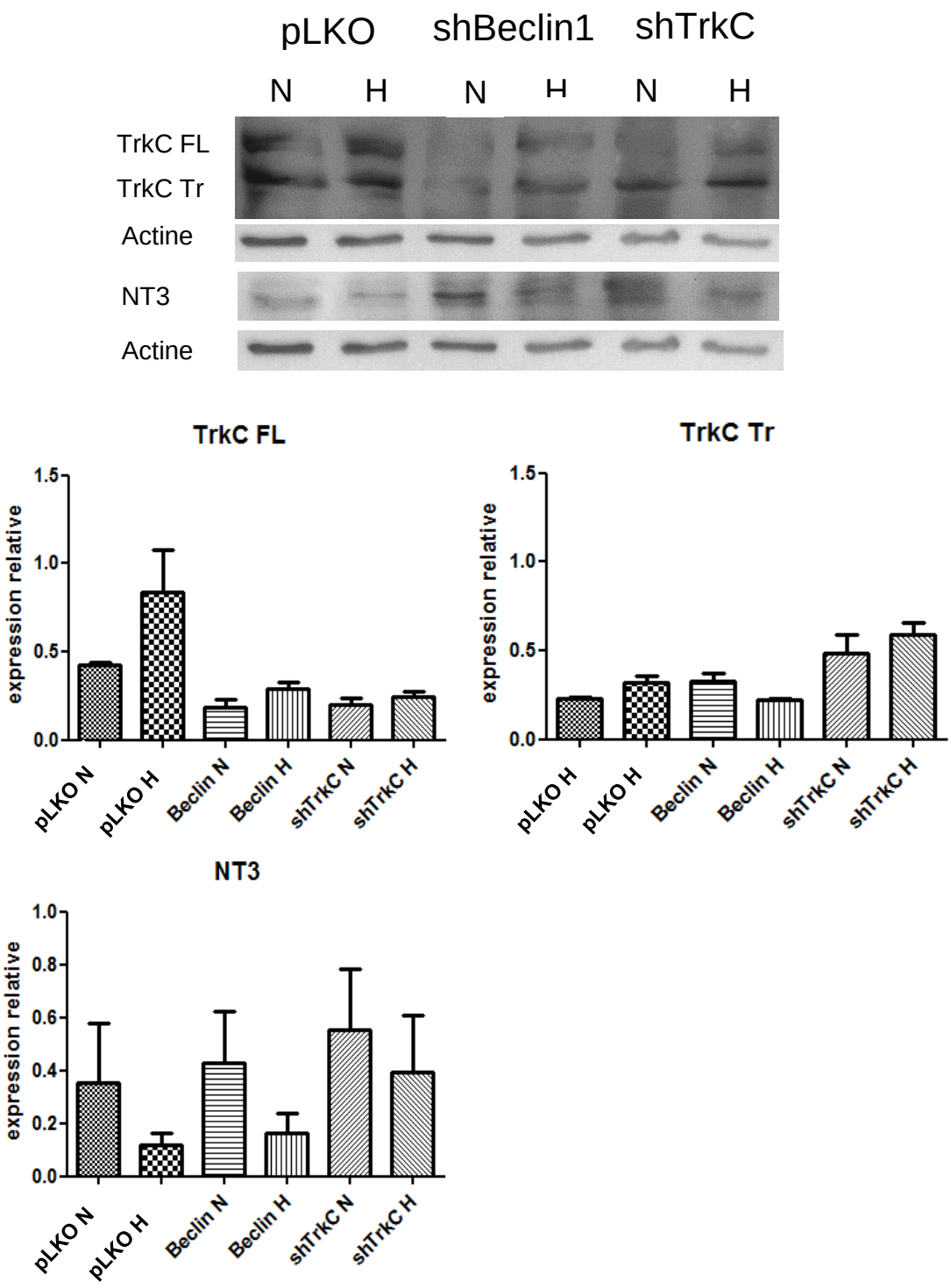


Figure 25 : Etude par Western Blot de l'expression de TrkC FL, TrkC Tr et NT3 par les différentes lignées après 96h de culture en Normoxie et en Hypoxie.
(TrkC : n=4 ; NT3 : n=2)

BY-NC-ND

La forme entière du TrkC est sous-exprimée dans les lignées U87-shBeclin1 et U87-shTrkC par rapport à la lignée U87-pLKO, à la fois en normoxie (- 60% et - 50%) et en hypoxie (- 65% et - 70%). Seules les U87-pLKO montrent une augmentation de l'expression du TrkC FL lorsqu'elle sont exposées à l'hypoxie (+ 80%). L'expression du récepteur tronqué en revanche est identique entre les U87-pLKO et les U87-shBeclin1, mais elle est augmentée pour les U87-shTrkC à la fois en normoxie (+ 55%) et en hypoxie (+ 75%), ce qui est inattendu du fait de l'inhibition de l'expression du récepteur TrkC par le shRNA. De plus, là encore, la sur-expression du récepteur TrkC par les cellules dont l'autophagie a été inhibée n'est plus observée, ce qui va également dans le sens d'une réponse compensatoire cinétique-dépendante. Contrairement aux résultats obtenus en q-RT-PCR, ici la NT3 est sous-exprimée en hypoxie par rapport à la normoxie pour les lignées U87-pLKO et U87-shBeclin1 et plus légèrement pour les U87-shTrkC (figure 25).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation des récepteurs TrkC et sortiline. Comme expliqué plus haut, ces récepteurs sont capables de s'hétérodimériser. La sortiline pourrait participer à la compensation des inhibitions, en s'associant au récepteur TrkC. De plus, il est possible que l'hypoxie et l'inhibition de l'autophagie et de la signalisation TrkC entrainent une modification de la localisation des récepteurs. Nous avons étudié la localisation de TrkC et de la sortiline par immunofluorescence (figure 26).

BY-NC-ND

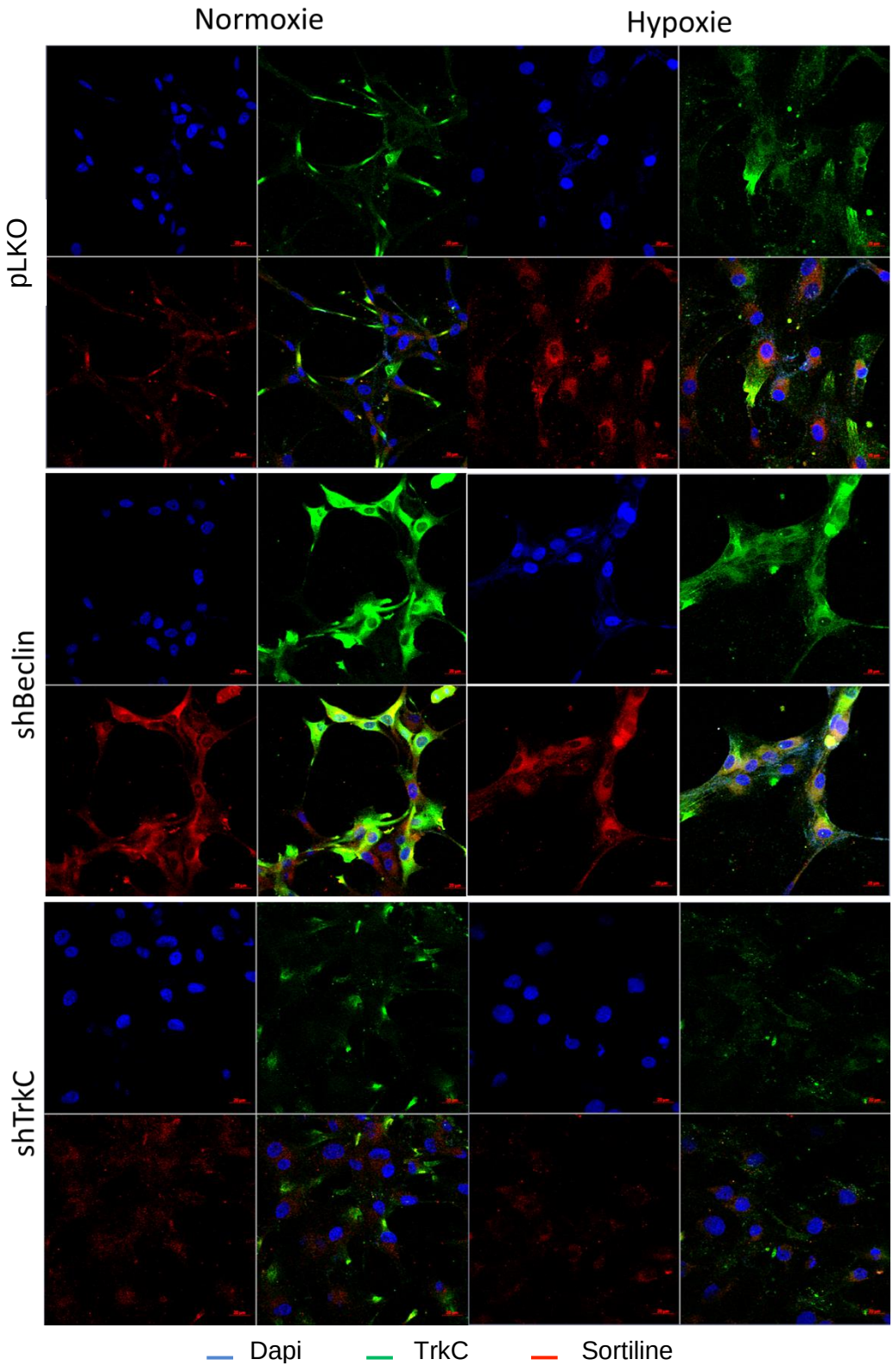


Figure 26 : Marquage par immunofluorescence en microscopie confocale de TrkC (vert) et de la sortiline (rouge) dans les différentes lignées, après 96h de culture en normoxie ou en hypoxie (n=1).

BY-NC-ND

L'intensité de la fluorescence verte observée pour la lignée U87-shBeclin1 indique une expression plus forte du récepteur TrkC par rapport aux deux autres lignées. En effet, contrairement à ce qui a été observé précédemment, la lignée contrôle semble exprimer plus faiblement le TrkC. Il semble toutefois y avoir une augmentation de l'expression de TrkC et de la sortiline lorsque les cellules sont cultivées en hypoxie, ce qui avait été également observé en q-RT-PCR pour TrkC. En ce qui concerne la lignée U87-shTrkC nous observons bien une extinction de l'expression du TrkC, la fluorescence étant très faible, mais, contrairement à ce qui a été observé en q-RT-PCR, son expression diminue lorsque les cellules sont cultivées en hypoxie. Cette lignée exprime également très peu la sortiline, mais son expression augmente en hypoxie. A l'inverse, pour la lignée U87-shBeclin1, Nous observons plutôt une diminution de la fluorescence des deux protéines en hypoxie. De même que pour TrkC, la sortiline semble plus exprimée par les U87-shBeclin1 que par les deux autres lignées. Il semble également y avoir une colocalisation entre TrkC et la sortiline pour les U87-shBeclin par rapport aux U87-pLKO (figure 26).

L'inhibition de l'autophagie et de la signalisation TrkC entraine des modifications métaboliques qui tendent à confirmer la compensation de la perte de la voie TrkC par l'autophagie observée avec une courte exposition à l'hypoxie (moins de 24h), mais pas l'inverse. Il semblerait cependant que l'inhibition de l'autophagie favorise la co-localisation du récepteur TrkC avec la sortiline.

I.2.2.2. Effet des inhibitions sur les signalisations cellulaires

Après avoir étudié le niveau d'expression des acteurs de la voie TrkC, nous nous sommes ensuite intéressés à l'activation cette voie, après 96h de culture en hypoxie. Pour cela, nous avons étudié la phosphorylation de différents acteurs de la cascade de signalisation en aval de TrkC. Nous avons étudié l'implication et l'état d'activation des protéines Akt et ERK, intervenant respectivement dans les voies PI3K et MAPK. De plus, nos travaux précédents ayant montré une activation de la protéine p38-MAPK lors de l'hypoxie à court terme, nous avons recherché les variations de son expression et de sa phosphorylation à plus long terme, afin de déterminer si l'activation de la voie TrkC varie au cours du temps. Ces analyses ont été réalisées par Western Blot (figure 27)

BY-NC-ND

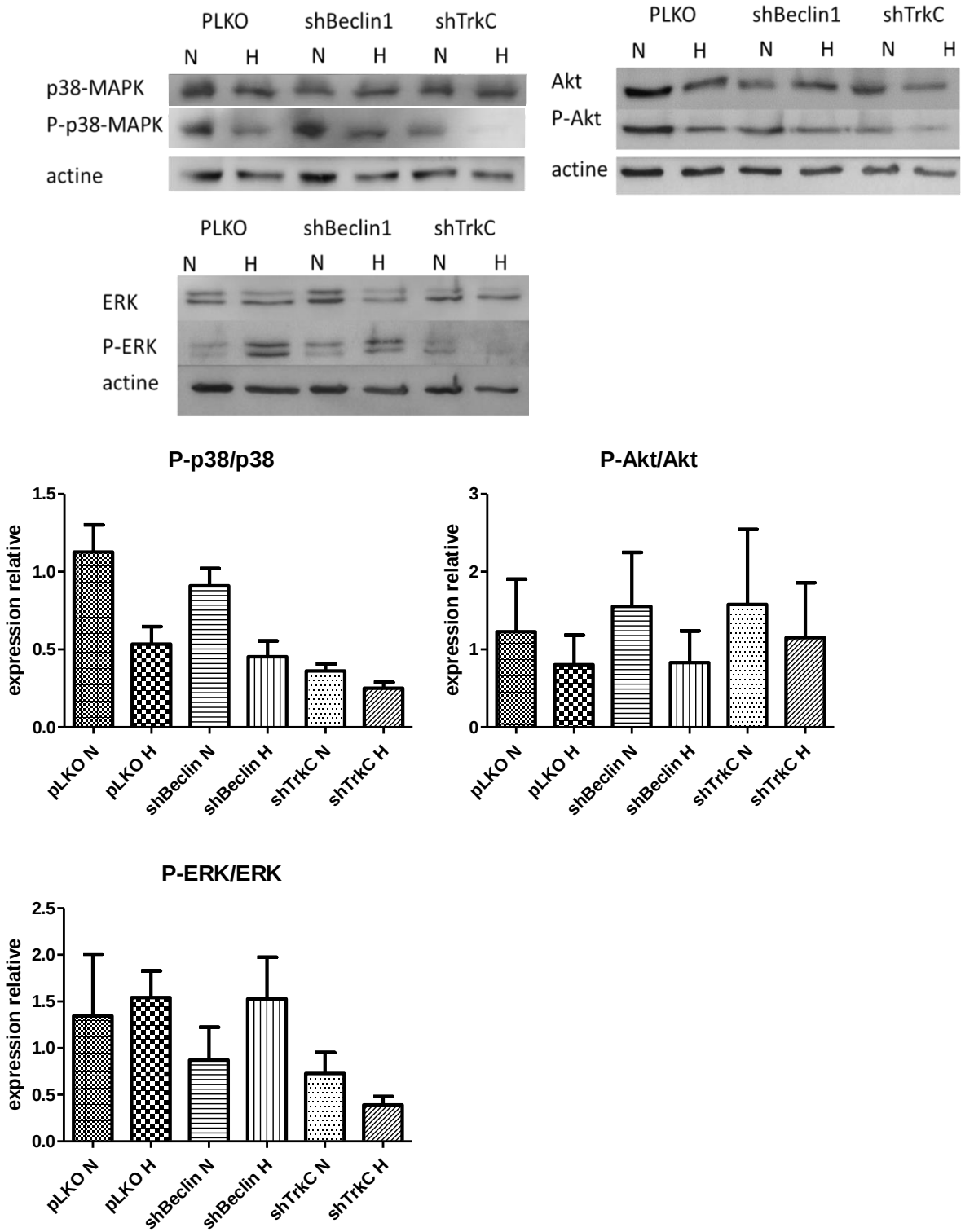


Figure 27 : Expression et activation de p38-MAPK, ERK et Akt, (formes totales et phosphorylées), dans les différentes lignées après 96h de culture en normoxie et en hypoxie par Western Blot (n=4 pour p38 et Akt et n=3 pour ERK).

BY-NC-ND

Il semblerait que l'hypoxie sur un temps de 96h entraine une diminution de l'activation de la p38-MAPK pour toutes les lignées (- 55% pour les U87-pLKO, - 50% pour les U87-shBeclin1 et - 30% pour les U87-shTrkC). De plus, l'activation de la p38-MAPK est beaucoup plus faible dans la lignée U87-shTrkC (- 70% en normoxie et - 55% en hypoxie), ce qui était attendu du fait de l'inhibition de l'expression du récepteur TrkC. L'hypoxie entraine également une diminution de la phosphorylation de Akt (- 35% pour les U87-pLKO, - 50% pour les U87-shBeclin1 et - 30% pour les U87-shTrkC). Contrairement à ce qui était observé dans les expériences réalisées sur des temps courts, l'hypoxie semble ici entrainer une augmentation de la phosphorylation d'ERK pour la lignée U87-pLKO (+ 15%) et pour la lignée U87-shBeclin1 (+ 75%), mais une diminution pour la lignée U87-shTrkC (- 45%) (figure 27). Compte tenu des différences observées entre les résultats obtenus après des temps courts d'exposition à l'hypoxie (moins de 24h) et ceux obtenus après des temps plus longs (96h), il est possible que la compensation de l'inhibition de l'autophagie par la voie TrkC évolue avec le temps. En effet, il semblerait qu'en réponse à l'hypoxie, lorsque l'autophagie est inhibée, l'activation du récepteur TrkC conduise d'abord à l'activation de la voie des MAPkinases via la p38-MAPK, pour faire face au stress aigu, puis ensuite via la protéine ERK, quand le stress s'installe dans la chronicité. De même, la voie PI3K n'est pas activée dès le début de l'hypoxie, mais plus tard, comme le montre la phosphorylation d'Akt.

Nous nous sommes ensuite intéressés au récepteur de l'EGF, qui comme TrkC est un récepteur à activité tyrosine kinase. Il n'est pas sur-exprimé par les U87-MG, mais pourrait intervenir dans une voie alternative de survie pour pallier l'inhibition de l'autophagie ou de la voie TrkC (figure 28), notamment lors de stress hypoxique prolongé.

BY-NC-ND

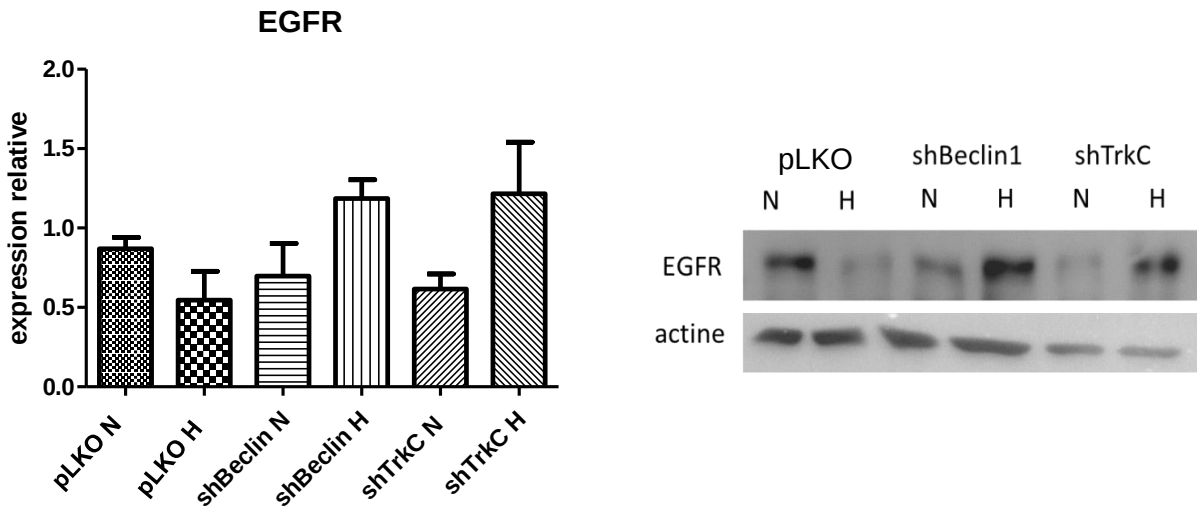


Figure 28 : Expression de l'EGFR par les différentes lignées après 96h de culture en Normoxie et en Hypoxie (n=5).

L'hypoxie entraine dans les cellules U87-pLKO une diminution de l'expression de l'EGFR (- 45%), alors que les cellules dont l'autophagie ou la signalisation TrkC ont été inhibées, montrent plutôt une augmentation de son expression (+ 70% pour les U87-shBeclin1 et + 50% pour les U87-shTrkC) (figure 28). Cependant, malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pas détecté la forme phosphorylée du récepteur.

L'inhibition de l'autophagie et de la signalisation TrkC module donc la réponse des cellules au stress. Il semble que les cellules activent des voies de survie alternatives lorsque l'une ou l'autre est inhibée afin de survivre en conditions de stress. De plus, ces voies semblent varier au cours du temps. Lors d'une exposition courte à l'hypoxie (moins de 24h) seule la p38MAPK est activée en complément de l'autophagie. Au contraire, ERK est moins activée qu'en normoxie, tandis qu'Akt n'est pas affectée par le changement de disponibilité en oxygène. A l'inverse, lorsque l'exposition à l'hypoxie est prolongée (96h), p38MAPK et Akt sont moins activées dans les cellules U87-shBeclin1 et U87-pLKO, alors que ERK est plus activée.

Il a été montré dans la littérature que l'autophagie et la signalisation des neurotrophines sont associées au phénotype des cellules souches cancéreuses (CSC). Les deux mécanismes sont amplifiés dans les cellules de GBM, il est donc possible qu'ils impactent le compartiment des CSC. En effet, ces cellules constituent un paramètre majeur dans l'agressivité de la tumeur, la progression, la résistance et la récidive du cancer. Elles sont capables de s'auto-renouveler, ce qui maintient le pool de cellules tumorales, elles sont résistantes aux traitements, notamment grâce à leur activité autophagique intense, et sont capables de

BY-NC-ND

reformer une tumeur. C'est pourquoi dans la suite de notre travail, nous nous sommes spécifiquement intéressés à cette population de cellules.

BY-NC-ND

Chapitre II. Autophagie, signalisation TrkC et cellules souches cancéreuses dans le GBM

II.1. Etude de la population cellulaire totale

Comme l'a montré l'étude précédente, l'inhibition de l'autophagie ou de la signalisation TrkC entraine des modifications du comportement des cellules de GBM. Nous avons observé une compensation entre ces deux voies, lorsque l'une ou l'autre est inhibée, assurant la survie des cellules en condition de stress, en particulier lorsqu'elles se trouvent dans un environnement pauvre en oxygène, ce qui est fréquent dans le GBM. Afin d'approfondir, ces travaux nous avons étudié l'impact de ces inhibitions sur des caractéristiques déterminant l'agressivité de la tumeur, associées notamment à la présence de cellules souches cancéreuses. Pour cela, différents aspects de la fonctionnalité cellulaire ainsi que l'expression de marqueurs connus pour être associés à « l'état souche » ont été analysés.

II.1.1. Effet de l'inhibition de l'autophagie sur les cellules souches cancéreuses :

II.1.1.1. Aspects fonctionnels

Une des caractéristiques du compartiment des cellules souches (physiologiques ou cancéreuses) est leur faible index de prolifération. En effet, représentant une réserve cellulaire à partir de laquelle l'organe ou la tumeur peut se régénérer, ces cellules ont (en général) un cycle cellulaire long, proche de la quiescence. Dans un premier temps, nous avons étudié la prolifération cellulaire en suivant l'incorporation du BrdU dans les cellules de la lignée cellulaire U87-MG, où l'expression de Beclin1 a été réduite par shRNA (figure 29).

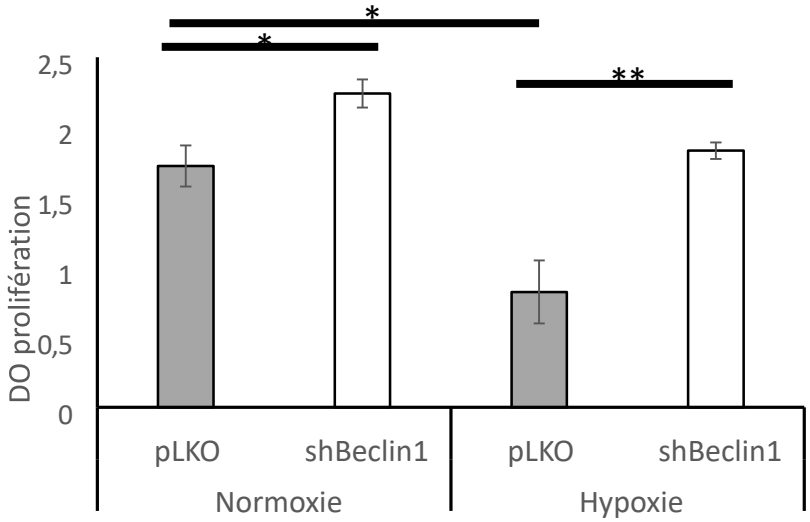


Figure 29 : Impact de l'inhibition de l'autophagie sur la prolifération cellulaire.
Etude de la prolifération des cellules par incorporation du BrdU après 96h de culture en normoxie ou en hypoxie. n=4 (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

BY-NC-ND

Il apparait que les cellules où l'autophagie a été inhibée, prolifèrent davantage que les cellules U87-pLKO, que ce soit en normoxie ou en hypoxie (+ 30% en normoxie ($p<0,05$) et + 120% en hypoxie ($p<0,01$)). De plus, l'hypoxie entraine une baisse significative de la prolifération des U87-pLKO (moins 50%, $p<0,05$), mais pas des U87-shBeclin1. L'inhibition de l'autophagie favorise donc une population de cellules plus proliférantes, en particulier en hypoxie (figure 29).

Les cellules souches sont caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement, ainsi, bien que peu nombreuses, elles participent au maintien du pool de cellules tumorales. Nous nous sommes donc intéressés à la capacité clonale des cellules, c'est-à-dire leur capacité à former des colonies en milieu semi-solide, après inhibition de l'autophagie (figure 30).

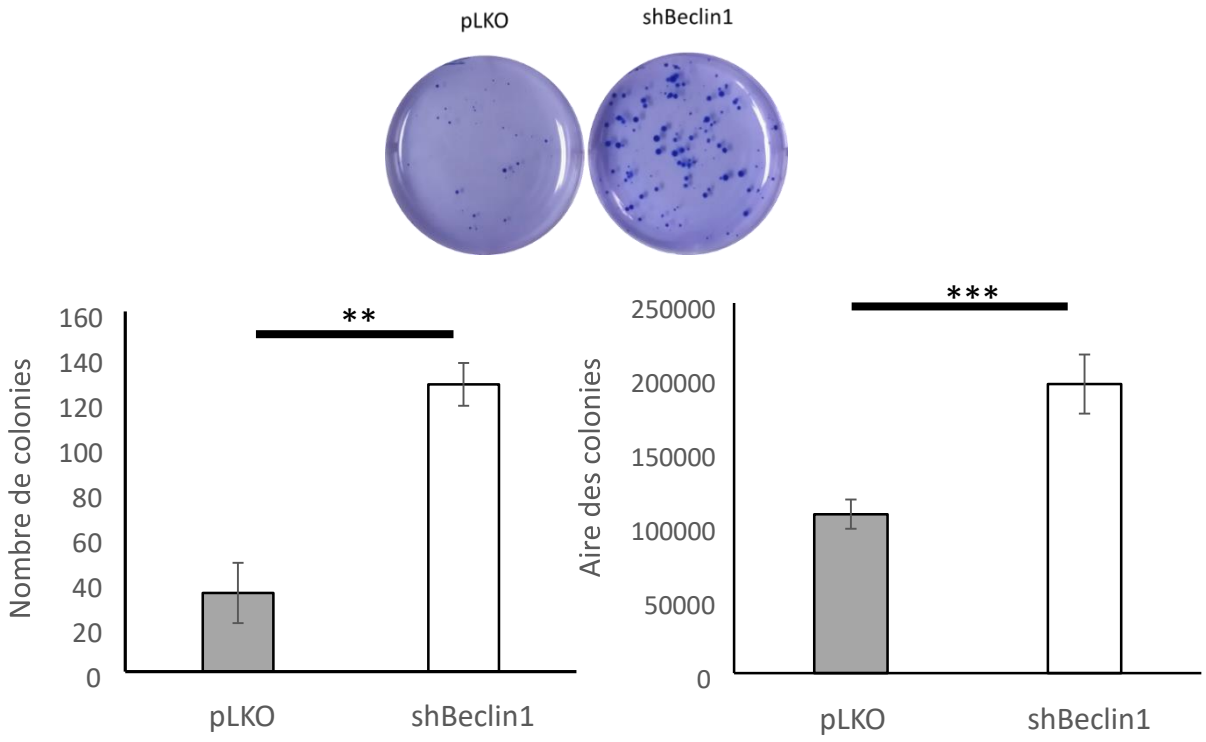


Figure 30 : Impact de l'inhibition de l'autophagie sur la capacité clonale des cellules. La capacité des cellules à former des colonies a été étudiée par un test de croissance en milieu semi-solide, après 21 jours de culture en normoxie, n=3**.** Le nombre et l'aire des colonies formées ont été mesurés à l'aide du logiciel ImageJ (** $p<0,01$; *** $p<0,005$).

BY-NC-ND

L'augmentation de la prolifération des U87-shBeclin1 s'accompagne d'une forte activité clonale, à la fois en ce qui concerne le nombre (plus 250% par rapport aux U87-pLKO, $p<0,01$), mais également la taille des colonies (plus 100% par rapport aux U87-pLKO, $p<0,005$) (figure 30). Ces résultats montrent la présence d'une population de cellules ayant des propriétés clonales élevées lorsque l'autophagie est inhibée, ce qui constitue une caractéristique des CSC. Ainsi, ces deux premiers éléments seraient en faveur d'une modification du comportement des cellules souches, passant d'un état quiescent à un état prolifératif, lorsque l'autophagie est inhibée.

Comme cela a été mentionné en introduction, le traitement de routine d'un glioblastome passe par une exérèse, lorsqu'elle est possible, puis une radiochimiothérapie concomitante, suivie d'une chimiothérapie au Témozolomide selon le protocole de Stupp (Stupp et al., 2005). Le Témozolomide est un agent alkylant de l'ADN, qui empêche sa réplication et provoque des cassures, ce qui entraine l'apoptose des cellules tumorales. Malheureusement les résistances sont fréquentes car les CSC de GBM sont peu sensibles à ce traitement. C'est pourquoi nous avons étudié la réponse des cellules ayant subi l'inhibition de l'autophagie à un traitement au Témozolomide.

Pour commencer nous avons déterminé la dose de Témozolomide, ainsi que la durée du traitement, par un test XTT reflétant la cytotoxicité à travers l'activité deshydrogénase des mitochondries (figure 31). Pour cela, nous avons travaillé sur la lignée parentale (U87-MG) ainsi que sur la lignée U87-pLKO.

BY-NC-ND

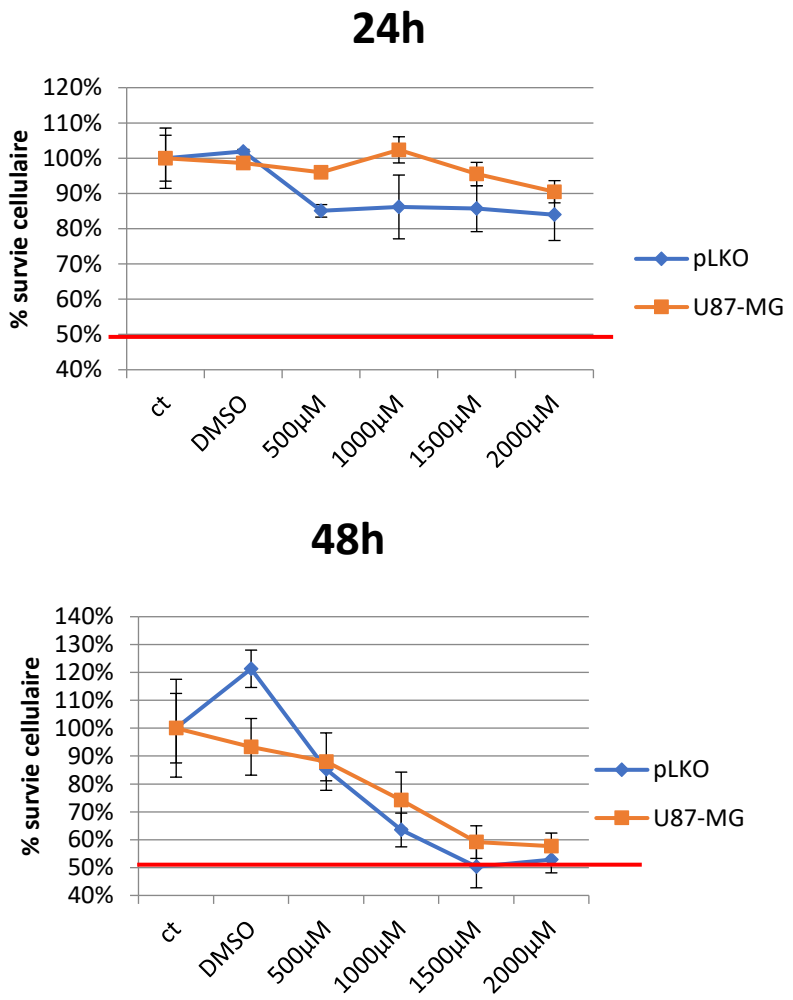


Figure 31 : Cytotoxicité de différentes doses de Témozolomide évaluée sur des cellules U87-MG parentales et des U87-pLKO.
Les cellules ont été cultivées 96h en normoxie avant de recevoir le traitement, pendant 24h ou 48h. Le Témozolomide a été repris en DMSO, les cellules ont reçu au maximum 0,5% de DMSO, nous avons inclus un contrôle avec des cellules n'ayant reçu que cette dose de DMSO afin d'écarter tout biais. n= 3

Notre but est de travailler à la valeur de l'IC50, correspondant à la concentration provoquant une perte cellulaire de 50%, de sorte à visualiser les modulations dues au traitement, que la mortalité augmente, ou qu'elle diminue. Aucune des doses testées pendant 24h n'ont permis d'obtenir 50% de mortalité. Nous avons donc choisi de traiter les cellules pendant 48h, avec une dose de 1500 µM de TMZ, ce qui se rapproche de l'IC50 (figure 31).

Les expériences précédentes montrent que l'inhibition de l'autophagie par le shRNA-Beclin1 entraine une activation des cellules, caractérisée notamment par une augmentation de la prolifération en conditions hypoxiques. Cela sous-entend que les cellules sont devenues cyclantes et qu'elles devraient alors présenter une augmentation de la sensibilité au TMZ.

BY-NC-ND

Nous avons donc étudié la réponse des cellules U87-shBeclin1 au TMZ en référence à la lignée pLKO, en normoxie (figure 32). Pour cela, nous avons évalué la prolifération cellulaire ainsi que la mort cellulaire par apoptose en réponse au traitement, à la concentration préalablement établie, appliqué pendant 48h.

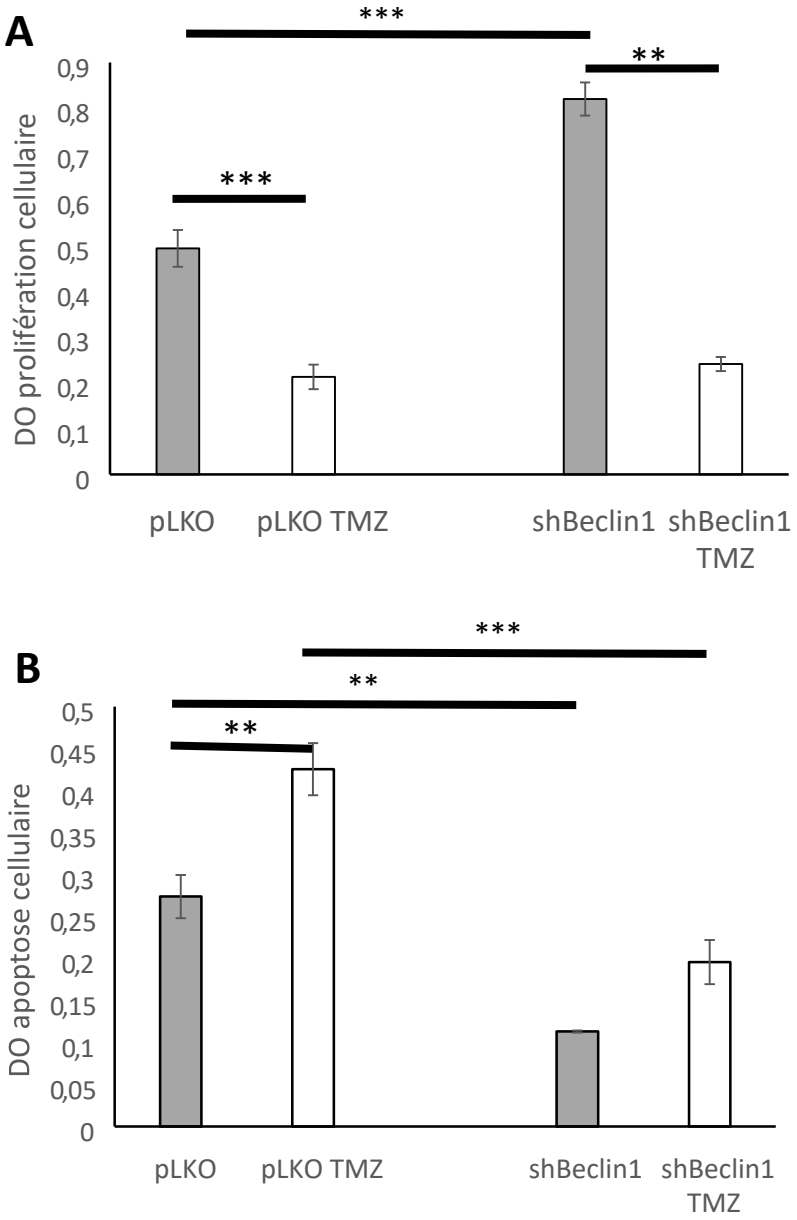


Figure 32 : Impact de l'inhibition de l'autophagie sur la résistance des cellules au Témozolomide.
La prolifération et l'apoptose des cellules ont été mesurées respectivement à l'aide d'un test d'incorporation du BrdU (A) et d'un test ELISA cell death (B). Les cellules ont été cultivées 96h en normoxie et exposées 48h à 1500µM de TMZ, n=3 (** $p<0,01$; *** $p<0,005$).

Comme observée lors des premières expériences, la prolifération des U87-shBeclin1 est plus importante que celle des cellules U87-pLKO. De plus, l'exposition au TMZ entraine

BY-NC-ND

une forte diminution de la prolifération des cellules, mais cette diminution est plus importante pour les cellules U87-shBeclin1 (moins 70%, $p<0,005$) que pour les cellules U87-pLKO (moins 55%, $p<0,005$). Il semblerait que l'inhibition de l'autophagie rende les cellules plus sensibles au TMZ, ce qui peut s'expliquer par le fait que ces cellules sont davantage cyclantes, ce qui favorise l'action de l'agent chimiothérapeutique (figure 32A).

Le TMZ agit en entrainant l'apoptose des cellules cyclantes. Nous nous sommes donc intéressés à la mortalité des cellules par apoptose. Il apparait que l'apoptose des cellules U87-shBeclin1 est beaucoup plus faible que celle des U87-pLKO (moins 60%, $p<0,01$), et cela même en présence de TMZ (moins 50%, $p<0,005$) (figure 32B). Ainsi, bien que les cellules U87-shBeclin1 prolifèrent davantage que les U87-pLKO, elles ne présentent pas la même sensibilité au TMZ, puisque, même s'il permet de diminuer fortement leur prolifération, il n'augmente que très peu leur mortalité par apoptose. Il n'est pas exclu que le traitement ait un effet cytostatique, provoquant une entrée en quiescence ou qu'il induise la mort par une autre voie que l'apoptose, par exemple la nécrose.

II.1.1.2. Expression des marqueurs des CSC après inhibition de l'autophagie

Les CSC peuvent être identifiées par l'expression de marqueurs spécifiques qu'elles partagent avec les cellules souches adultes et embryonnaires non-pathologiques. Nous avons choisi de baser la détection des CSC sur l'expression de 5 marqueurs : Oct4 (codé par le gène *POU5F1*), Sox2, Nanog, BMI1 et LGR5. Oct4, Sox2 et Nanog sont des facteurs de transcription connus pour leur implication dans l'auto-renouvellement et le maintien de la pluripotence. Ils agissent comme co-régulateurs. BMI1 est un répresseur transcriptionnel, il empêche l'expression de gènes favorisant la différenciation des cellules, il est impliqué dans la quiescence des cellules souches. LGR5 est un acteur de la voie Wnt, il favorise l'activation de la β-caténine qui entraine la transcription de gènes impliqués dans le phénotype souche, il est exprimé par les cellules souches ayant une forte activité proliférative. Afin de préciser la proportion de CSC dans les U87-MG natives et dans la lignée où l'autophagie a été inhibée, nous avons ensuite étudié l'expression de marqueurs spécifiques de ce compartiment par q-RT-PCR (figure 33).

BY-NC-ND

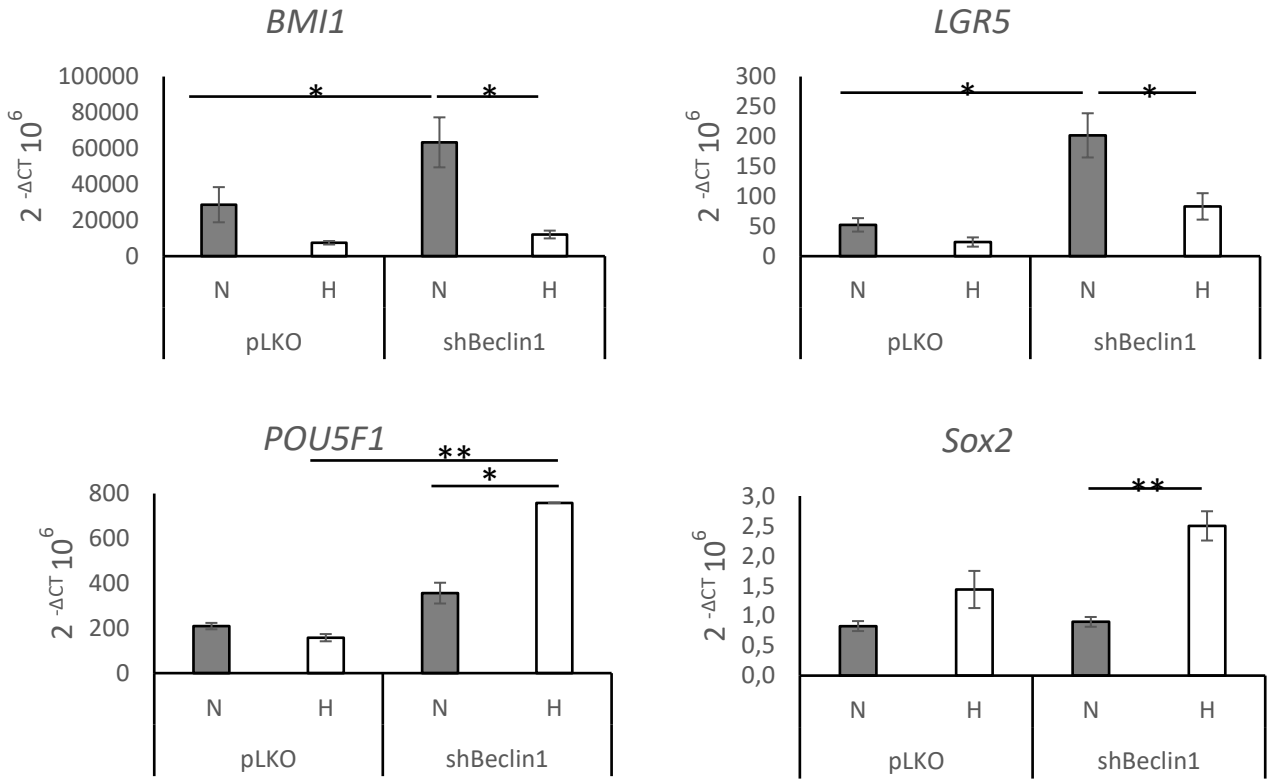


Figure 33 : Effet de l'inhibition de l'autophagie sur l'expression de marqueurs des CSC. Etude par q-RT-PCR des transcrits des marqueurs souches BMI1, POU5F1, Sox2 et LGR5 dans les différentes lignées après 96h de culture en normoxie ou en hypoxie. Expression normalisée par rapport à la GAPDH. Les résultats sont exprimés sous forme de $2^{-\Delta CT}$ 10^6. n=4 pour BMI1, Nanog et LGR5 ; n=3 pour POU5F1 et Sox2 (* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,005).

Ce qui est remarquable en premier lieu est que le niveau d'expression des marqueurs est très différent (facteur 30 000 entre *SOX2* et *BMI1* pour les U87-pLKO), ce qui souligne une grande variabilité d'expression des marqueurs souches. Il apparait que l'extinction de l'expression de Beclin1 entraine une augmentation de l'expression des transcrits de *BMI1* et *LGR5* en normoxie, respectivement plus 100% (p<0,05) et plus 400% (p<0,01). Le taux de transcrits de *POU5F1* et *SOX2* ne change pas en normoxie, mais POU5F1 est surexprimé dans les U87-shBeclin1 en hypoxie par rapport aux U87-pLKO (plus 300%, p<0,005). Bien que l'hypoxie ne semble pas modifier le taux de transcrits des marqueurs étudiés dans les U87-pLKO, elle modifie de façon importante celui des U87-shBeclin1. En effet, dans nos conditions expérimentales, l'hypoxie entraine une diminution de l'expression des transcrits de BMI1 (moins 500%, p<0,01) et *LGR5* (moins 100%, p<0,01) et une augmentation de l'expression des transcrits de *POU5F1* (plus 90%, p<0,01) et *SOX2* (plus 150%, p<0,005) (figure 33). Il semblerait donc que l'inhibition de l'autophagie, via l'extinction de l'expression

BY-NC-ND

de Beclin1, provoque une variation de l'expression des marqueurs associés au phénotype des CSC. Il semble qu'elle soit la traduction de l'évolution des CSC.

Le défaut de l'autophagie favorise une population de cellules qui prolifèrent d'avantage, ont une plus grande capacité clonale et résistent plus au TMZ que les cellules parentales. Ces éléments laissent supposer que l'inhibition de l'autophagie modifie le comportement des CSC, ce qui est corroboré par les variations d'expression de marqueurs spécifiques de ce phénotype. Cependant, nous ne pouvons pas exclure qu'une autre voie vienne pallier cette inhibition pour prendre le relais et assurer la survie des cellules tumorales, éventuellement en favorisant les CSC. Cette voie pourrait être la voie neurotrophique impliquant le récepteur TrkC. En effet nos précédents travaux (partie I de la thèse) ont montré qu'en hypoxie, lorsque l'autophagie est inhibée, la voie TrkC est activée. De plus, il a également été montré que les neurotrophines favorisent la formation d'un pool de cellules souches dans beaucoup de tumeurs solides, dont le GBM (Lawn et al., 2015). C'est pourquoi nous avons refait les mêmes expérimentations en inhibant cette fois la voie TrkC.

II.1.2. Effet de l'inhibition de la signalisation TrkC sur les cellules souches cancéreuses

II.1.2.1. Aspects fonctionnels

Dans un premier temps nous avons étudié la prolifération cellulaire dans la lignée U87-MG où l'expression du récepteur TrkC a été inhibée par shRNA (figure 34).

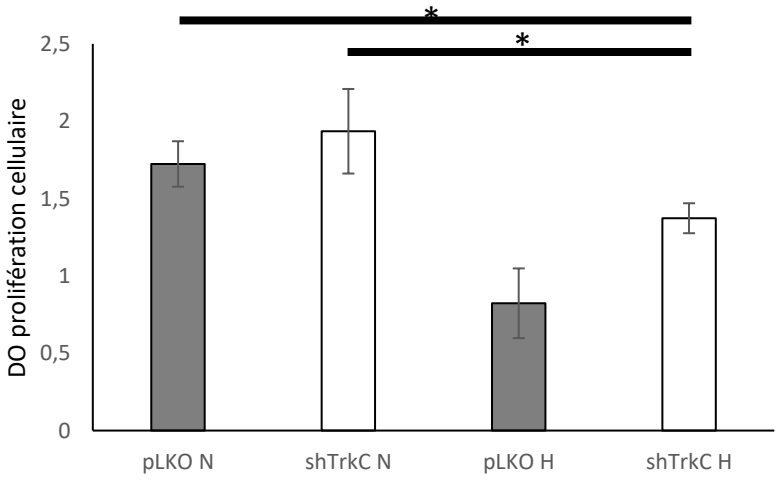


Figure 34 : Impact de l'inhibition du récepteur TrkC sur la prolifération cellulaire.
Etude de la prolifération des cellules par incorporation de BrdU après 96h de culture en normoxie ou en hypoxie. n=4 (* p<0,05).

BY-NC-ND

Le blocage de la voie neurotrophique semble peu affecter la prolifération cellulaire lorsque les cellules sont cultivées en normoxie. En revanche, cela entraine une diminution de la prolifération des cellules en hypoxie par rapport à la normoxie (moins 30 %, $p<0,05$) qui est cependant plus faible que la diminution de prolifération des U87-pLKO provoquée par l'hypoxie (moins 50%) (figure 34).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la capacité clonale des cellules après inhibition de la voie TrkC (figure 35).

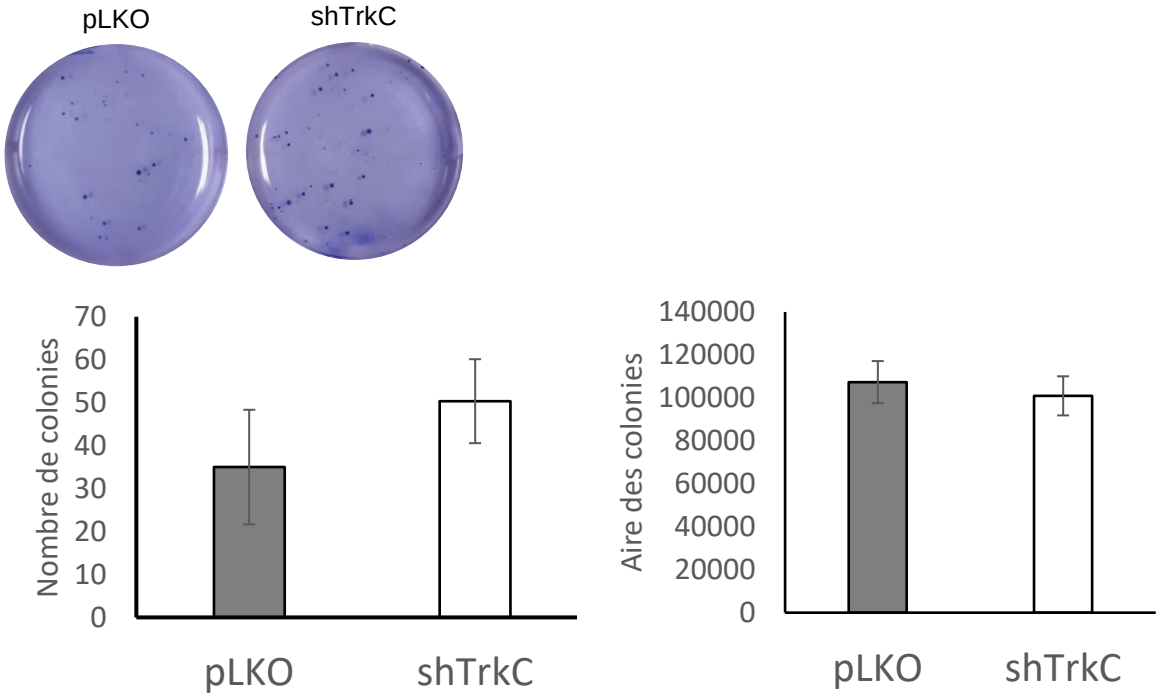


Figure 35 : Impact de l'inhibition de la signalisation TrkC sur la capacité clonale des cellules.
La capacité des cellules à former des colonies a été étudiée par un test de croissance en milieu semi-solide, après 21 jours de culture en normoxie, n=3**.** Le nombre et l'aire des colonies formées ont été mesurés à l'aide du logiciel ImageJ.

La capacité clonale des U87-shTrkC est la même que celle des cellules contrôles. En effet nous n'observons pas de différences significatives du nombre de colonies ni de leur surface entre la lignée parentale et celle invalidée pour TrkC (figure 35).

Nous avons ensuite étudié la réponse des cellules U87-shTrkC au TMZ en référence à la lignée U87-plKO, en normoxie (figure 36).

BY-NC-ND

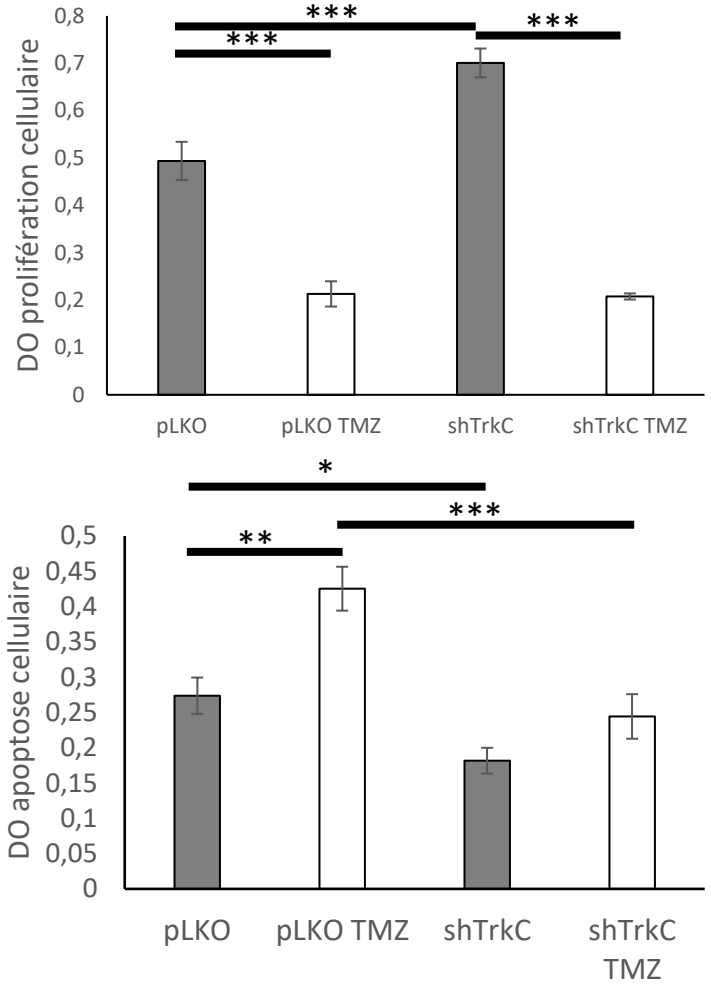


Figure 36 : Impact de l'inhibition de la signalisation TrkC sur la résistance des cellules au Témozolomide.
La prolifération et l'apoptose des cellules ont été mesurées respectivement à l'aide d'un test d'incorporation du BrdU (A) et d'un test ELISA cell death (B). Les cellules ont été cultivées 96h en normoxie et exposées 48 au TMZ (1500 µM), n=3 (** p<0,01 ; *** p<0,005).

Le TMZ réduit plus fortement la prolifération des cellules U87-shTrkC (moins 70%, p<0,005) que celle des cellules U87-pLKO (moins 55%, p<0,005), bien que la prolifération basale des U87-shTrkC soit plus importante que celle des U87-pLKO (plus 40%, p<0,005). Cependant, comme observé précédemment pour les U87-shBeclin1, et contrairement aux U87-pLKO, le TMZ ne parvient pas à induire l'apoptose des U87-shTrkC. L'apoptose basale des U87-shTrkC est également plus faible que celle des U87-pLKO (moins 35% sans TMZ, p<0,05, moins 45 % avec, p<0,005) (figure 36). Il semblerait donc que l'inhibition de la voie neurotrophique passant par le récepteur TrkC favorise l'émergence d'une population de cellules résistantes à la mort par apoptose induite par le TMZ, bien qu'il induise une baisse de leur prolifération. Leur profil semble proche de celui de la population de cellules obtenues après blocage de l'autophagie.

BY-NC-ND

II.1.2.2. Expression des marqueurs des CSC après inhibition de TrkC

Afin de déterminer la nature de cette population cellulaire, nous avons ensuite étudié l'expression de marqueurs spécifiques des cellules souches par q-RT-PCR (figure 37).

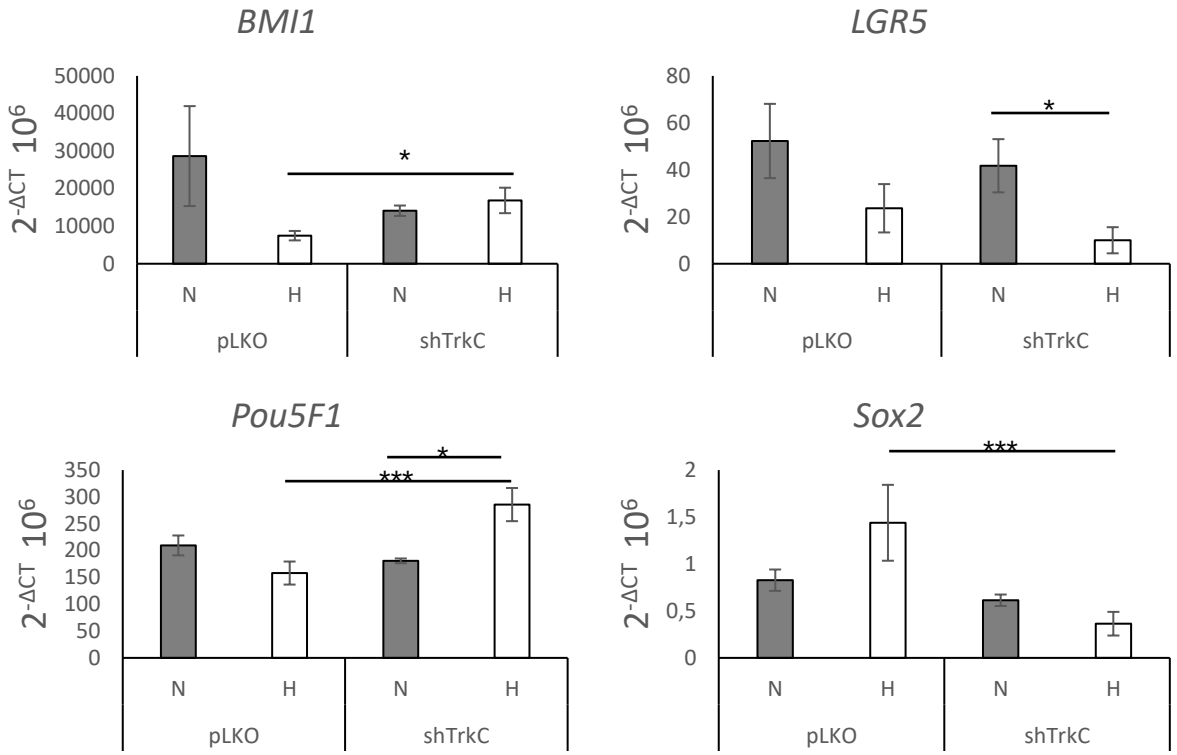


Figure 37 : Effet de l'inhibition de la signalisation TrkC sur l'expression de marqueurs de cellules souches.

Etude par q-RT-PCR des transcrits des marqueurs souches *BMI1, POU5F1*, *Sox2* et *LGR5* dans la lignée shTrkC en référence à la lignée transfectée par un vecteur vide (pLKO) après 96h de culture en normoxie ou en hypoxie. Expression normalisée par rapport à la GAPDH ; n=4 pour BMI1, Nanog et LGR5 ; n=3 pour POU5F1 et Sox2. (* p<0,05 ; *** p<0,005)

L'inhibition de la voie TrkC entraine une augmentation de l'expression des transcrits des marqueurs *BMI1* (p<0,05) et *POU5F*1 et une diminution du marqueur *Sox2* (p<0,005) en hypoxie par rapport aux U87-pLKO. Elle entraine également une diminution de l'expression des transcrits de *LGR5* et une augmentation des transcrits de *POU5F1* (p<0,05), lorsque les cellules sont exposées à l'hypoxie (figure 37). Ces éléments semblent suggérer que l'inhibition de la signalisation TrkC a un plus faible impact sur le compartiment des cellules souches, que l'inhibition de l'autophagie, ou que nos conditions expérimentales ne nous permettent pas de les observer.

Les résultats que nous avons obtenus en inhibant soit l'autophagie soit la signalisation TrkC ne sont pas clairement démonstratifs quant à l'impact de ces deux voies sur le

BY-NC-ND

compartiment des CSC. Cependant, dans une population totale, les CSC ne représentent qu'une faible proportion de l'ensemble des cellules, ce qui les rend difficiles à étudier. C'est pourquoi, pour enrichir le compartiment cellulaire étudié en CSC, nous avons trié les cellules à l'aide d'une technique de fractionnement par couplage flux force de sédimentation, se basant sur les caractéristiques physico-chimiques des cellules, la SdFFF. Cette technique de tri permet de séparer des cellules, uniquement en fonction de leurs caractéristiques biophysiques (forme, taille, densité, rigidité, déformabilité…). Les cellules sont séparées par l'application conjointe d'un champ externe multi-gravitationnel et d'un flux de phase mobile, celles ayant la taille la plus importante et la plus faible densité étant éluées en premier. L'intérêt de cette technique est qu'elle ne nécessite aucun marquage des cellules pour les trier, ce qui élimine d'éventuels biais, tels que l'activation des cellules par les anticorps qui pourraient être utilisés. De plus cette méthode douce maintient l'intégrité et la viabilité des cellules, ce qui permet leur remise en culture et leur étude.

II.2. Autophagie, signalisation TrkC et cellules souches cancéreuses : étude sur les populations triées

La SdFFF permet de suivre un phénomène biologique induit au sein d'une lignée cellulaire tel que l'apoptose, l'autophagie, la différenciation… (Bégaud et al., 2006, Leger et al., 2007, Naves et al, 2012). Dans notre étude, cette technique présente également l'avantage de trier les cellules, en fonction de leur état de différenciation, grâce aux différences morphologiques qui y sont associées. Notre objectif étant de visualiser les sous-populations cellulaires impactées par l'invalidation de Beclin1 et TrkC, nous avons mis à profit notre expertise d'utilisation de la SdFFF pour l'obtention de sous-populations enrichies en cellules caractérisées par leur état de différenciation et d'indifférenciation (Bertrand et al., 2009, Mélin et al., 2012, 2014, 2015). Ces fractions cellulaires devaient permettre de faciliter la compréhension des mécanismes de modifications du continuum cellulaire dans les lignées sh-Beclin et sh-TrKC. Nous avons alors collecté des fractions cellulaires selon leurs caractéristiques d'élution, celles-ci étant principalement liées à leurs propriétés physico-chimiques, taille, densité mais également leur forme et leur rigidité, ainsi que d'autres paramètres (rapport nucléoplasme/cytoplasme…) (figure 38).

BY-NC-ND

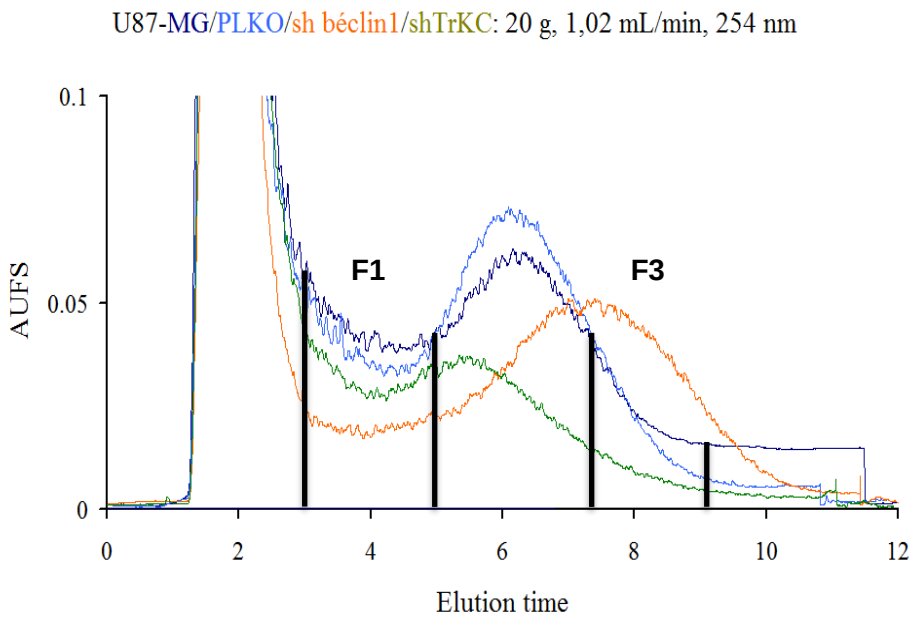


Figure 38 : Fractogramme obtenu avec les U87-MG (bleu foncé), U87-pLKO (bleu clair), U87-shBeclin1 (orange) et U87-shTrkC (vert).
Les fractions F1 et F3 ont initialement été déterminé d'après le profil d'élution de la lignée U87-MG.

La superposition des différents fractogrammes met en évidence une forte homologie entre le pic obtenu pour les U87-MG et les U87-pLKO, ce qui montre que la transfection des cellules avec le vecteur ne modifie pas leur comportement. A l'inverse les profils obtenus pour les U87-sBeclin1 et U87-shTrkC sont différents et montrent un décalage dû à une variation du temps de rétention. Le décalage du pic vers la droite pour les U87-shBeclin1, par rapport aux U87-pLKO, met en évidence un temps de rétention plus long qui peut s'expliquer par une diminution de la taille des cellules ou une augmentation de leur densité, associées à une augmentation de leur rigidité. A l'inverse, le décalage du pic vers la gauche pour les U87-shTrkC, par rapport aux U87-pLKO, met en évidence un temps de rétention plus court qui peut s'expliquer par une augmentation de la taille des cellules ou une diminution de leur densité, associées à une diminution de leur rigidité (figure 38).

II.2.1. Effet de l'inhibition de l'autophagie sur les caractéristiques associées aux CSC

Dans les conditions de notre étude, cette technique présente l'avantage de trier les cellules, en fonction de leur état de différenciation reflété par des caractéristiques physiques différentes. Le fractogramme obtenu est spécifique d'une lignée et permet d'identifier plusieurs fractions. Ces fractions sont délimitées en fonction des caractéristiques des différentes populations cellulaires, qui peuvent alors être isolées et identifiées. De précédents travaux du

BY-NC-ND

laboratoire ont permis d'identifier la nature des cellules éluées dans chaque fraction pour la lignée de U87-MG. La fraction F1, éluée en premier, est enrichie en cellules plutôt différenciées, plus grosses et moins denses. La fraction F3, éluée en dernier, contient les cellules plutôt indifférenciées, plus petites et plus denses, apparentées à des cellules souches (Bertrand et al., 2009). Les conditions d'élution préalablement définies, en fonction de la taille, la densité, la rigidité et la déformabilité des cellules, ont permis d'adapter celles mises en œuvre pour les lignées étudiées et de récolter les fractions suivantes : PT, ou Pic Total, et les fractions F1 et F3 (figure 39).

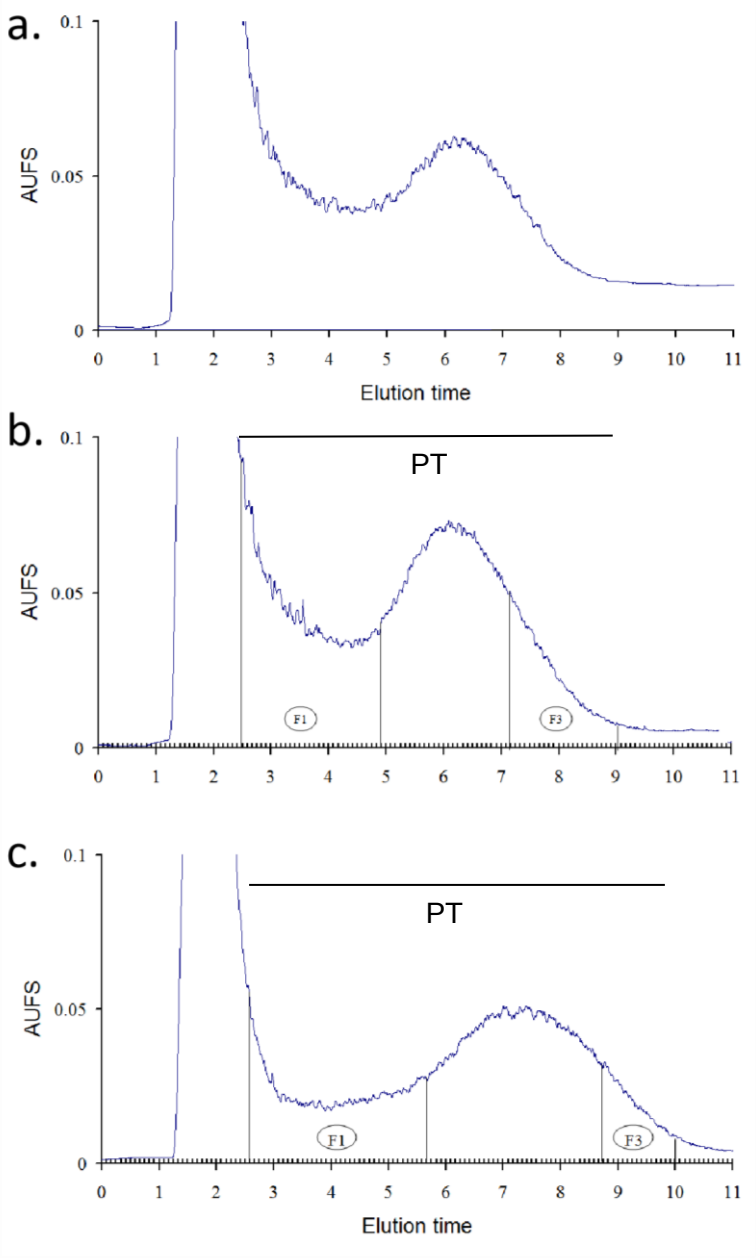


Figure 39 : Fractogramme obtenu avec les U87-MG (a), U87-pLKO (b), U87-shBeclin1 (c), après 96h de culture en normoxie. Trois fractions ont été collectées : PT (pic total), F1 et F3.

BY-NC-ND

Les profils d'élution sont similaires entre les lignées U87-MG et U87-pLKO, ce qui signifie que la transfection n'a pas modifié le comportement des cellules et valide l'utilisation de la lignée U87-pLKO comme contrôle des lignées U87-shBeclin1 et U87-shTrkC. Le profil des U87-shBeclin1 est, en revanche, différent de celui des U87-pLKO. Il y a en effet un décalage du pic vers la gauche, ce qui est corrélé aux modifications comportementales des CSC énoncées précédemment (figure 39). En effet, ce décalage suggère une modification du continuum cellulaire aussi bien en termes de différenciation, en F1, que d'indifférenciation, en F3. Nous observons également un élargissement du pic qui peut révéler une modification du continuum cellulaire, de son hétérogénéitéet de sa complexité.

Afin de déterminer les caractéristiques des différentes fractions obtenues nous nous sommes intéressés à la capacité clonale des cellules de différentes fractions (figure 40).

BY-NC-ND

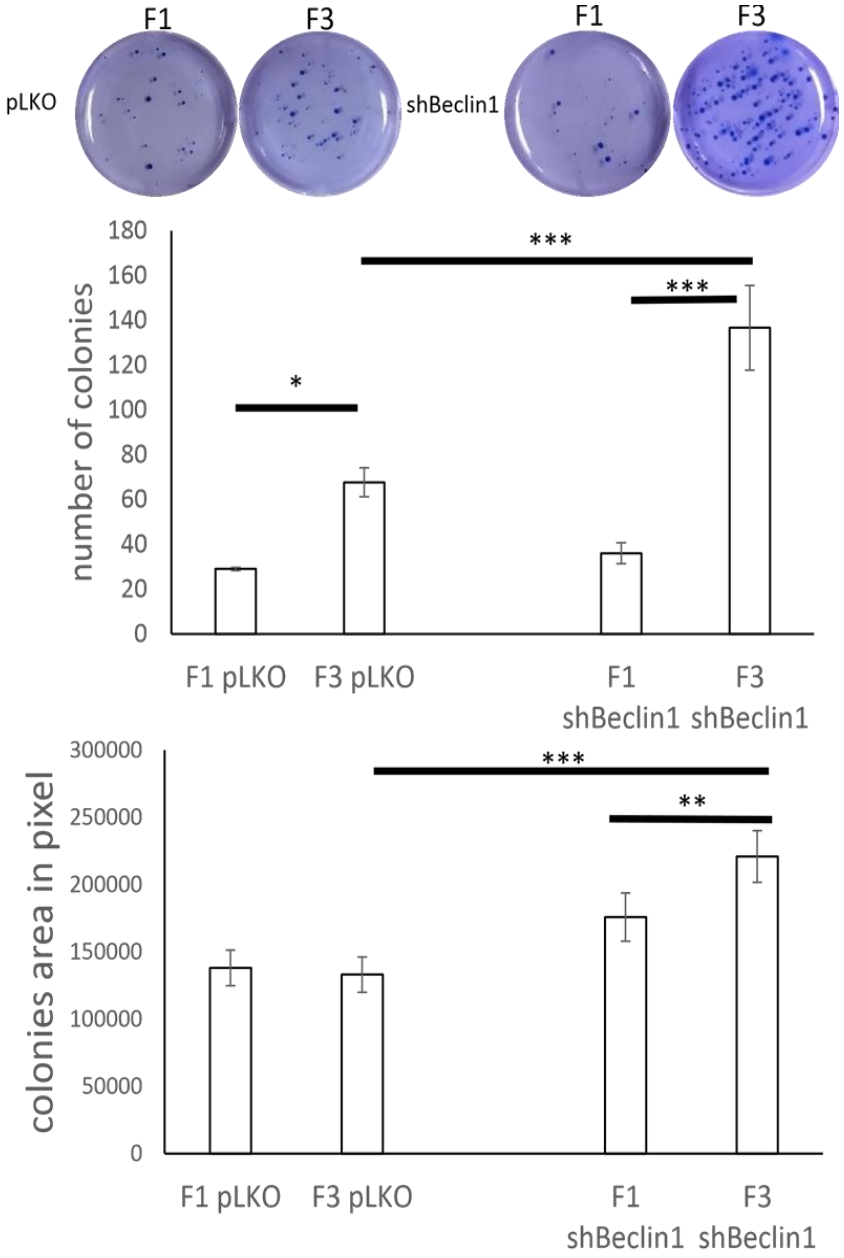


Figure 40 : Impact de l'inhibition de l'autophagie sur la capacité clonale des cellules des différentes fractions.
La capacité des cellules à former des colonies a été étudiée par un test de croissance en milieu semi-solide, après 96h de culture en normoxie, n=3**.** Le nombre et l'aire des colonies formées ont été mesurés à l'aide du logiciel ImageJ (* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,005).

Les fractions F3 des deux lignées sont celles qui génèrent le plus de colonies (+ 133% (p<0,05) et + 280% (p<0,005) respectivement pour les lignées U87-pLKO et U87-shBeclin1 par rapport à la fraction F1), l'inhibition de l'autophagie augmente fortement le nombre de colonies pour la fraction F3 (+ 100% par rapport à la fraction F3 des U87-pLKO, p<0,005). Elle entraine également une augmentation de l'aire des colonies de la fraction F3, à la fois par

BY-NC-ND

rapport à la fraction F1 des U87-shBeclin1 (+ 25%, p<0,01) et par rapport à la fraction F3 des U87-pLKO (+ 65%, p<0,005) (figure 40). D'après ces résultats, il apparait que la population de CSC des U87-shBeclin1 présente une capacité clonale plus importante que celle des U87-pLKO, ce qui suggère une population de CSC plus « active ».

Nous avons ensuite évalué la résistance au TMZ (traitement de 48h, après 24h de remise en culture des fractions triées) des différentes fractions triées par SdFFF après 96h de culture en normoxie, afin de déterminer si cette résistance diffère entre les fractions, ce qui suggèrerait une sensibilité aux TMZ dépendante du degré de différentiation (figure 41).

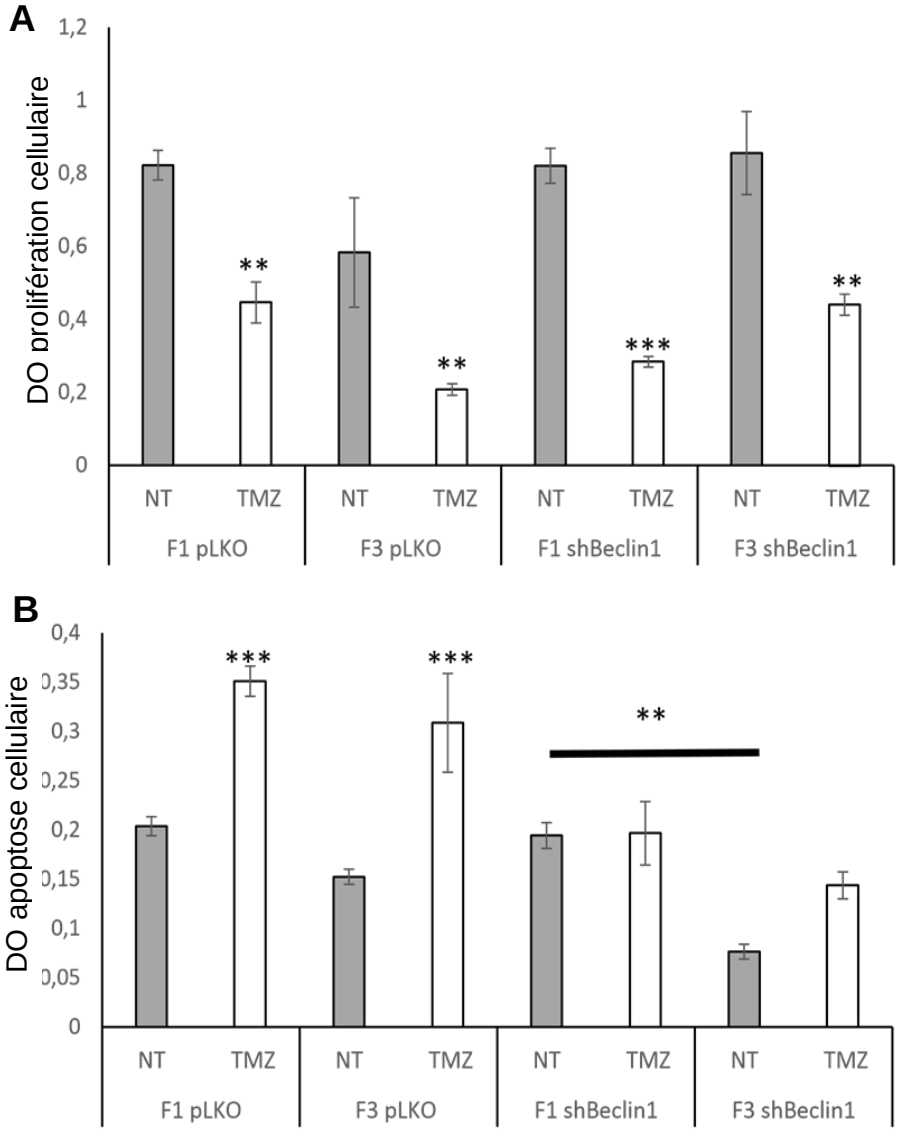


Figure 41 : Impact de l'inhibition de l'autophagie sur la résistance des cellules des différentes fractions au Témozolomide.
La prolifération et l'apoptose des cellules ont été mesurées respectivement à l'aide d'un test d'incorporation du BrdU (A) et d'un test ELISA cell death (B). Les cellules ont été cultivées 96h en normoxie et exposées 48 au TMZ, n=3 (** p<0,01 ; *** p<0,005).

BY-NC-ND

Le traitement au TMZ réduit la prolifération des deux lignées, quelle que soit la fraction (U87-pLKO F1 : - 45% (p<0,01), F3 : - 65% (p<0,01) ; U87-shBeclin1 F1 : - 65% (p<0,005), F3 : - 50% (p<0,01)). Pour la lignée U87-pLKO, cette baisse de la prolifération s'accompagne d'une augmentation de l'apoptose (+ 70% pour la F1 et + 100% pour la F3, p<0,005), mais ce n'est pas le cas pour la lignée U87-shBeclin1. De plus, pour la lignée U87-shBeclin1, en absence de traitement, les cellules de la fraction F3 sont significativement moins sujettes à l'apoptose que les cellules de la fraction F1 (- 60%, p<0,01) (figure 41). Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus avec la population totale et semblent indiquer une modification du phénotype cellulaire, en lien avec les caractéristiques des CSC.

Afin de confirmer l'enrichissement en CSC dans la fraction F3 et de déterminer l'impact de l'inhibition de l'autophagie sur ce phénotype, nous avons ensuite étudié l'expression de marqueurs spécifiques des cellules souches dans les différentes fractions (figure 42).

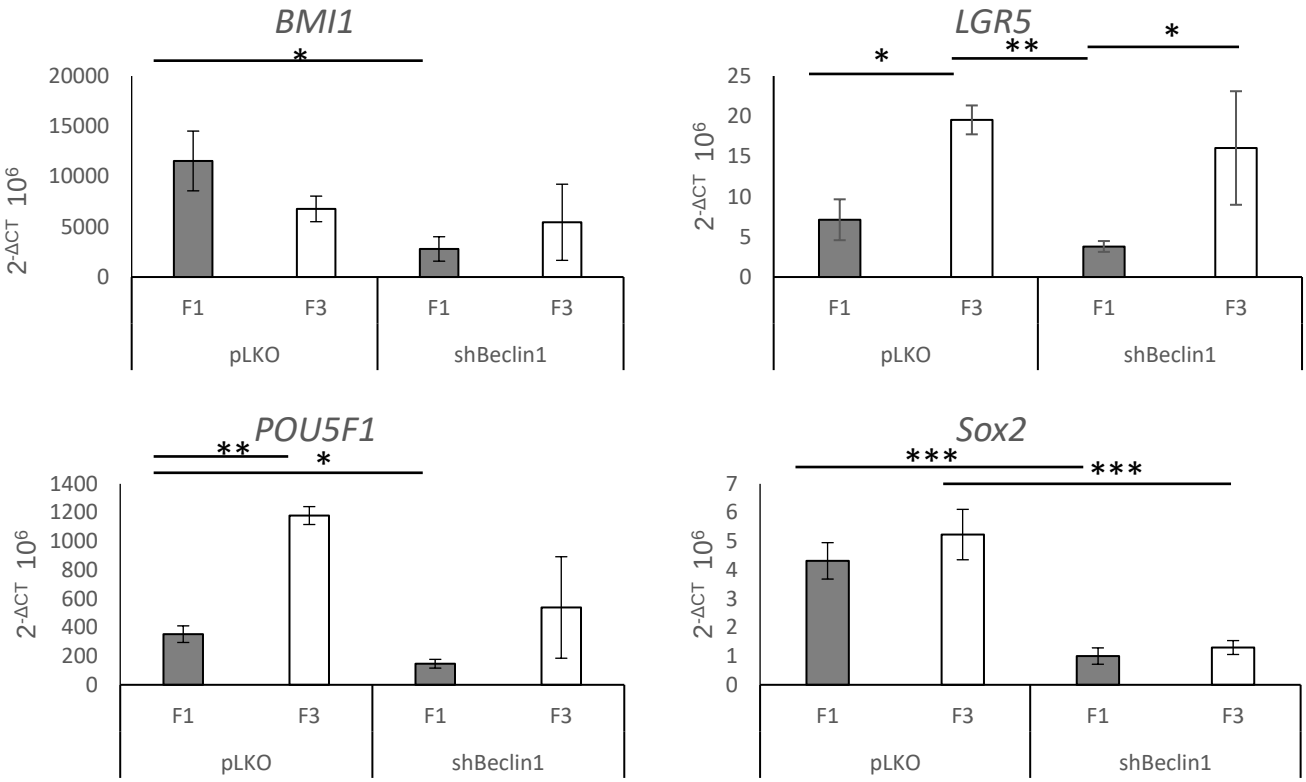


Figure 42 : Impact de l'inhibition de l'autophagie sur l'expression des marqueurs de CSC après tri par SdFFF.
Etude par q-RT-PCR des transcrits de marqueurs de cellules souches BMI1, Nanog, POU5F1, Sox2 et LGR5 dans les différentes lignées triées par sdFFF, après 96h de culture en normoxie. Expression normalisée par rapport à la GAPDH, n=3 (* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,005).

BY-NC-ND

Comme observé précédemment, il existe une grande variabilité d'expression entre les différents marqueurs. L'expression de *BMI1* est significativement diminuée pour la fraction F1 des U87-shBeclin1 par rapport à la fraction F1 des U87-pLKO ($p<0,05$) alors que, pour les fractions F3 des deux lignées, il n'y a pas de modification de l'expression de *BMI1*. *POU5F1* et *LGR5* sont exprimés plus fortement par les cellules isolées en F3 que par celles des fractions F1 ($p<0,01$ et $p<0,05$ pour les U87-pLKO et $p<0,05$ pour *LGR5* dans les U87-shBeclin1), pour les deux lignées, ce qui conforte l'enrichissement en CSC dans la fraction F3. De plus, l'inhibition de l'autophagie entraine une diminution de leur expression dans les 2 fractions F1 et F3 des U87-shBeclin1 par rapport aux U87-PLKO ($p<0,01$ pour POU5F1 dans la F1). L'inhibition de l'autophagie entraine également une forte diminution de l'expression de *Sox2*, pour les deux fractions ($p<0,005$) (figure 42). Ces résultats sont en faveur d'une baisse du compartiment des CSC quiescentes quand l'autophagie est inhibée.

Malgré l'inhibition de l'autophagie, qui est un mécanisme de survie majeur pour les cellules souches tumorales, la lignée U87-shBeclin1 montre la persistance d'une population de CSC « activées ». En effet, l'expression des marqueurs spécifiques, la résistance au Témozolomide et la forte capacité clonale sont en faveur d'une population fortement proliférante, présentant des caractéristiques souches. L'inhibition de l'autophagie semble modifier le comportement cellulaire de la sous-population « souche », favorisant un profil activé, plus prolifératif, mais, de manière inattendue, résistant au TMZ.

Nous avons fait les mêmes expériences avec les cellules dont la signalisation TrkC a été inhibée.

II.2.2. Effet de l'inhibition de la signalisation TrkC sur les caractéristiques associées aux CSC

Les cellules inhibées pour la signalisation TrkC ont été triées de la même manière que précédemment, afin d'obtenir deux fractions, la F1 enrichie en cellules plutôt différenciées et la fraction F3 enrichie en cellules ayant des caractéristiques de CSC (figure 43).

BY-NC-ND

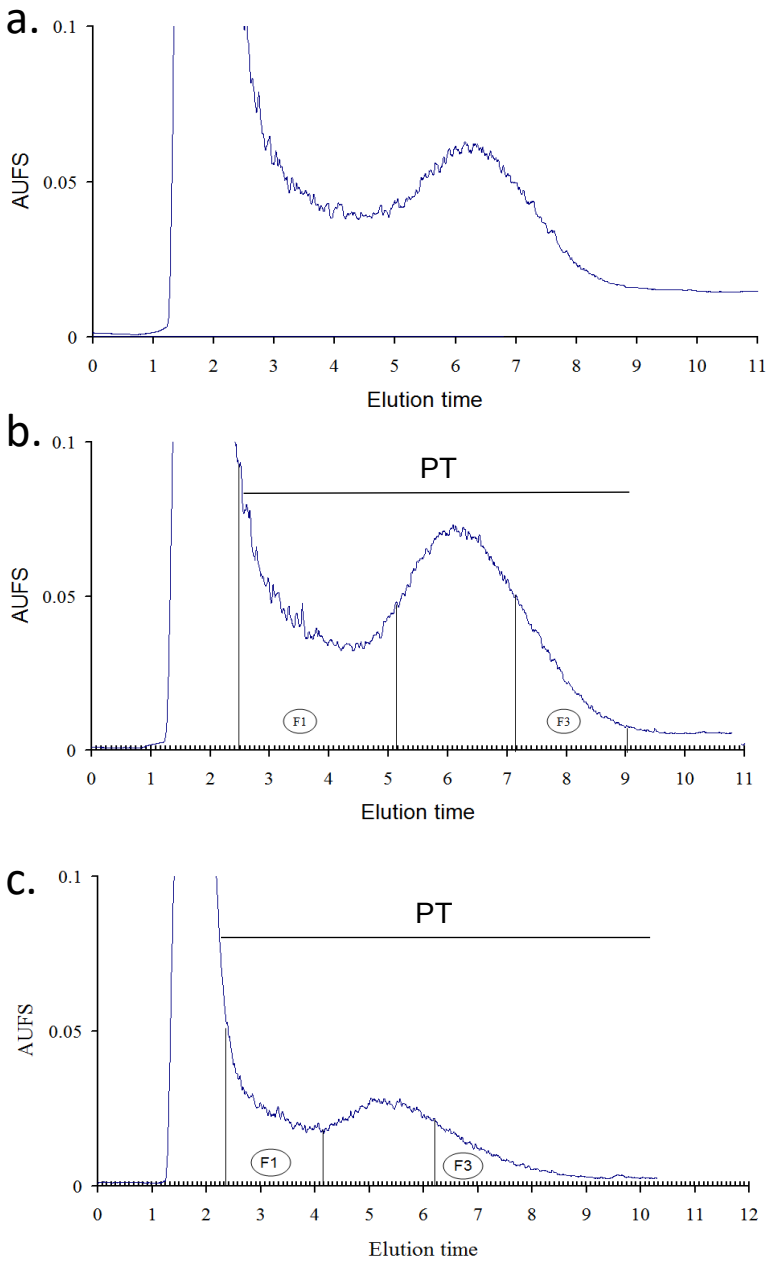


Figure 43 : Fractogramme obtenu avec les U87-MG (a), U87-pLKO (b), U87-shTrkC (c), après 96h de culture en normoxie. Trois fractions ont été collectées : PT, F1 et F3. n =10

Le profil d'élution de la lignée U87-shTrkC est différent de celui de la lignée U87-pLKO, en effet, le pic se trouve décalé vers la gauche, contrairement au pic des U87-shBeclin1 qui était décalé vers la droite (figure 43). Cela suggérerait que l'invalidation de TrKC s'accompagnerait d'une diminution ou d'une modification du pool de CSC ainsi que de celui des cellules plus différenciées et donc aurait comme pour la lignée U87-shBeclin un impact sur le continuum cellulaire de ces lignées.

BY-NC-ND

Nous nous sommes ensuite intéressés à la capacité clonale des cellules issues de différentes fractions (figure 44).

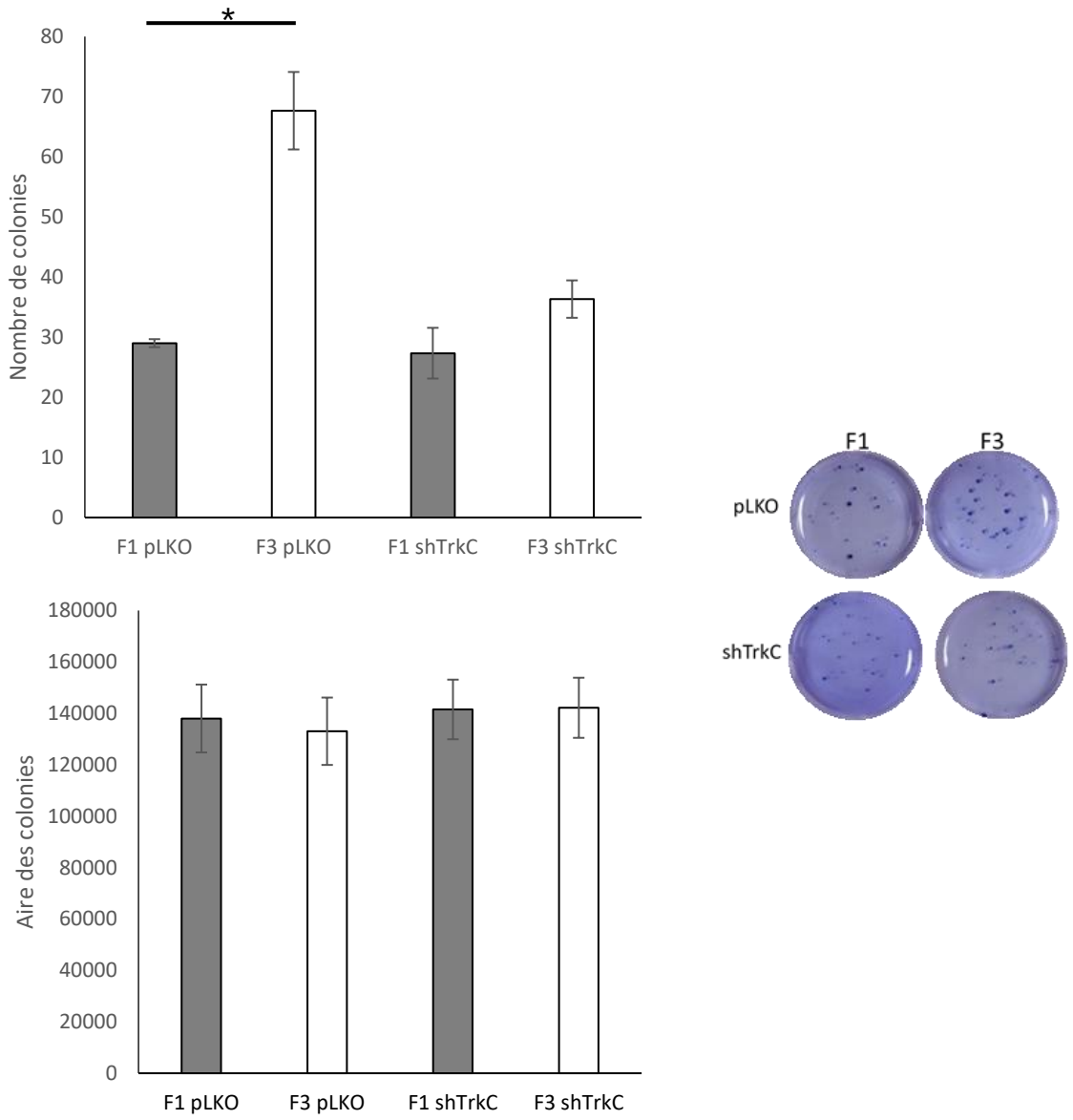


Figure 44 : Impact de l'inhibition de la signalisation TrkC sur la capacité clonale des cellules des différentes fractions.
La capacité des cellules à former des colonies a été étudiée par un test de croissance en milieu semi-solide, après 96h de culture en normoxie, n=3**.** Le nombre et l'aire des colonies formées ont été mesurés à l'aide du logiciel ImageJ.

L'inhibition de la signalisation TrkC entraine une diminution du nombre de colonies formées par la fraction F3 par rapport à la lignée U87-pLKO (- 30%). Cela est cohérent avec le déplacement vers la gauche du fractogramme, montrant une diminution du compartiment des CSC. En revanche, nous n'observons aucune différence entre les fractions F1 des deux

BY-NC-ND

lignées, ni en ce qui concerne la taille des colonies (figure 44). Ces résultats semblent indiquer que l'inhibition du récepteur TrkC affecte peu les capacités clonales, ce que nous avions déjà observé sur la population cellulaire totale (figure 35).

Nous avons ensuite évalué la résistance au TMZ (traitement de 48h) des différentes fractions triées par sdFFF après 96h (figure 45).

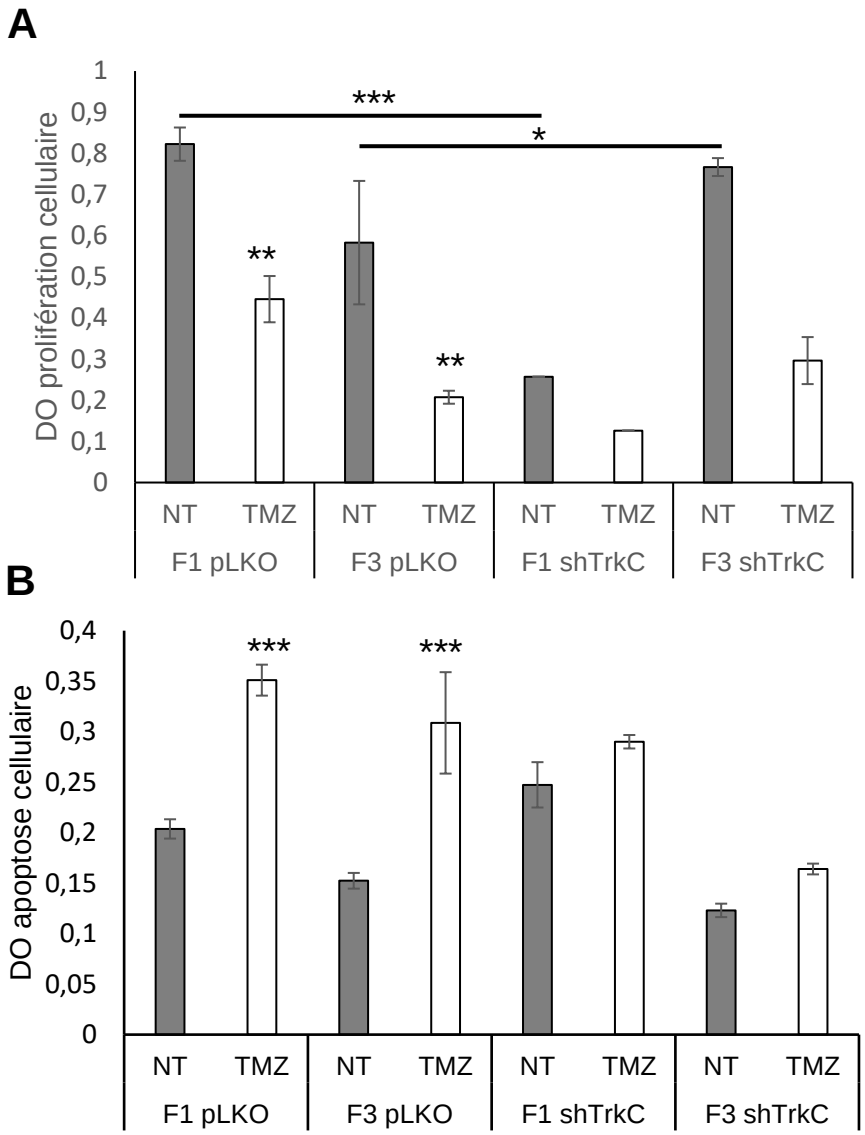


Figure 45 : Impact de l'inhibition de la signalisation TrkC sur la résistance des cellules des différentes fractions au Témozolomide.
La prolifération et l'apoptose des cellules ont été mesurées respectivement à l'aide d'un test BrdU (A) et d'un test ELISA cell death (B). Les cellules ont été cultivées 96h en normoxie puis triées par sdFFF et traitées 48h au TMZ (1500 µM), n=3.

BY-NC-ND

Seule la prolifération de la fraction F1 des U87-shTrkC est modifiée par rapport aux cellules contrôles, ces cellules proliférant moins. Le traitement au TMZ diminue la prolifération des deux lignées, quelle que soit la fraction (F1 : - 50% ; F3 : - 60%). Comme observé précédemment, le TMZ augmente la mort par apoptose des cellules U87-pLKO, alors que les cellules U87-shTrkC ne semblent pas sensibles à l'apoptose induite par le TMZ. De plus, sans traitement, les cellules U87-shTrkC de la fraction F3 sont moins sujettes à l'apoptose que les cellules de la fraction F1, ce qui laisse supposer le maintien d'une population souche résistante (figure 45).

Par la suite, nous avons étudié l'expression de marqueurs spécifiques des cellules souches dans les différentes fractions, afin de déterminer l'impact de l'inhibition de la signalisation TrkC sur ce phénotype (figure 46).

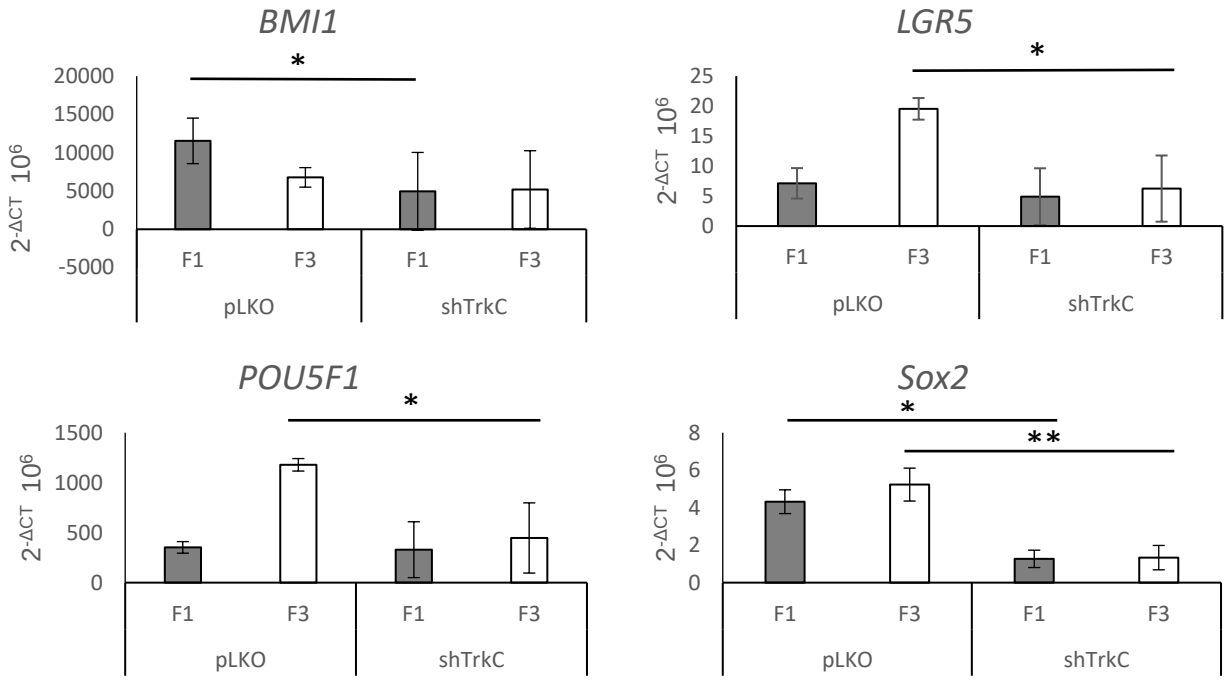


Figure 46 : Impact de l'inhibition de la signalisation TrkC sur l'expression de marqueurs des cellules souches après tri par SdFFF.
Etude par q-RT-PCR des transcrits des marqueurs souches BMI1, POU5F1, Sox2 et LGR5 par les différentes lignées triées par sdFFF, après 96h de culture en normoxie. Expression normalisée par rapport à la GAPDH, n=3. (* p<0,05 ; ** p<0,01).

Comme observé précédemment, Sox2 et LGR5 sont beaucoup moins exprimés que BMI1. L'inhibition de la signalisation TrkC entraine une diminution de l'expression de Sox2 pour les deux fractions (F1 : - 70%, p<0,05 et F3 : - 75% (p<0,01)), une diminution de l'expression de BMI1 (- 55%, p<0,05) et une diminution de l'expression de LGR5 (- 70%) et

BY-NC-ND

POU5F1 (- 60%) pour la fraction F3, par rapport aux U87-pLKO ($p<0,5$) (figure 46). La faible expression des marqueurs souches suggère que l'inhibition de la signalisation TrkC favorise une population de cellules plus différenciées, ce qui est cohérent avec le déplacement du fractogramme vers la gauche.

Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'autophagie et de la signalisation TrkC entrainent un changement dans la population de CSC, cependant les caractéristiques de ces populations de CSC diffèrent en fonction de l'inhibition. En effet, l'inhibition de l'autophagie entrainerait l'émergence d'une population de CSC plutôt actives, qui prolifèrent plus fortement et sont moins sensibles à l'apoptose que les cellules contrôles. En revanche, l'inhibition de la signalisation TrkC conduirait plutôt à l'émergence d'une population de cellules plus différenciées mais quiescentes (ou sénescentes), qui prolifèrent peu, mais restent moins sensibles à l'apoptose que les cellules contrôles. Ces éléments laissent penser que ces deux mécanismes de survie interviennent tout deux sur le phénotype de CSC, mais de manière différente en ce qui concerne l'activation des cellules.

BY-NC-ND

Discussion

BY-NC-ND

Le glioblastome est la tumeur cérébrale primaire la plus fréquente et la plus agressive, les traitements actuels offrent en effet moins de 10% de survie à 5 ans et une récidive presque systématique. Il est caractérisé par un environnement hypoxique, dû à un développement rapide ne permettant qu'une vascularisation incomplète et anarchique, qui contraint les cellules à détourner des mécanismes de survie.

Parmi ces mécanismes, le GBM utilise particulièrement l'autophagie, qui lui assure la résistance à la faible disponibilité en oxygène et participe à son agressivité. Hu et al. ont en effet montré que l'hypoxie provoquée par un traitement anti-angiogénique stimulait l'autophagie *via* HIF-1α et BNIP-3 et que l'augmentation de cette activité autophagique jouait un rôle anti-apoptotique (Hu et al., 2012) . Ainsi, la co-administration d'un traitement anti-angiogénique et d'un inhibiteur de l'autophagie entraine une forte activité anti-tumorale dans un modèle de xénogreffe de cellules primaires issues de patients atteints de glioblastome chez la souris, limitant la croissance de la tumeur (Hu *et al.,* 2012). L'efficacité de la combinaison de traitements antitumoraux à des molécules ciblant l'autophagie a également été confirmée par d'autres travaux (Jalota et al., 2016). Très récemment, dans un modèle biologique de tumeurs issues de GBM humains implantées chez la souris, il a été mis en évidence que parmi les protéines autophagiques, l'expression d'ATG9 était particulièrement stimulée par l'hypoxie induite par le Bevacizumab (anticorps anti-VEGF) et que son inhibition par shRNA supprimait la prolifération des cellules tumorales greffées et retardait la croissance de la tumeur (Abdul Rahim et al., 2017). Parmi les mécanismes impliqués dans l'induction de l'autophagie par l'hypoxie, Xue et al. ont mis en évidence que, dans un contexte hypoxique, la production et la sécrétion l'IL-6 étaient stimulées. Par un effet autocrine et paracrine, l'expression de la protéine ATG5 est induite, *via* STAT3. De plus, le blocage des récepteurs à l'IL-6 par le Tocilizumab inhibe l'autophagie et provoque l'apoptose des cellules tumorales dans un modèle de greffe de cellules de GBM chez la souris (Xue et al., 2016).

Dans ce contexte, nos travaux ont confirmé que les cellules de GBM développent une forte réponse autophagique lorsqu'elles sont exposées à l'hypoxie. Cette réponse est induite lors d'un stress de courte durée (<24h) mais également lorsque le stress est prolongé jusqu'à 96h, ce qui en souligne l'importance pour l'adaptation cellulaire à l'hypoxie. De plus, nous avons utilisé pour cette étude quatre lignées de GBM, qui étaient différentes pour le statut de gènes fréquemment mutés ou amplifiés dans ce type de cancer : IDH, p53 et EGFR. Le fait que les 4 lignées répondent de façon comparable, par activation de l'autophagie révèle l'indépendance du processus vis à vis de ces gènes, en particulier p53. Cependant, l'inhibition de ce processus de recyclage, qu'elle soit pharmacologique ou génique, ne suffit pas à induire une mort cellulaire importante, suggérant la mise en place d'une autre voie de survie, dans ce modèle cellulaire. En effet, nous avons également montré que la signalisation neurotrophique,

BY-NC-ND

notamment celle passant par le récepteur TrkC, participe à la résistance et à l'agressivité des cellules tumorales. Nous avons en effet mis en évidence que l'hypoxie entraine une activation de la voie de signalisation située en aval de TrkC. Cela se traduit par une augmentation de la phosphorylation d'une cible particulière du récepteur TrkC, la p38-MAPK, ainsi que par une sur-expression du récepteur. En tant qu'effecteur de nombreuses voies, comme les voies du VEGFR ou de l'EGFR, la p38-MAPK pourrait être envisagée comme cible de stratégies thérapeutiques (Mills et al, 2017). L'activation de la p38-MAPK a précédemment été mise en évidence dans le contexte de l'hypoxie dans les cellules de glioblastome. Les auteurs ont en effet montré que la p38-MAPK est phosphorylée lorsque les cellules de GBM sont placées en hypoxie, de plus cette activation est fonctionnelle puisqu'elle conduit à la phosphorylation d'une cible de la p38-MAPK, ATF (Activating Transcription Factor) (Xu et al., 2004). Ainsi, Baron et al., ont mis en évidence en 2011 que l'hypoxie entrainait la sur-expression de MIF (macrophage migration inhibitory factor) dans les cellules de glioblastome. MIF est un ligand du complexe CD44/CD74 dont la voie de signalisation implique une activation de la voie des MAPK *via* ERK (Baron et al., 2011), il existerait par ce biais une boucle d'amplification de la réponse hypoxique.

Ce qui est particulièrement intéressant est que la p38-MAPK peut également intervenir dans l'autophagie. En fonction des conditions, elle peut jouer un rôle d'inhibiteur, ou bien d'activateur (Sui et al., 2014). Dans un modèle de cancer colorectal, il a été montré que la suppression de l'expression de la p38-MAPK permettait d'activer l'autophagie et d'inhiber l'apoptose de cellules exposées au 5-fuorouracil (de la Cruz-Morcillo et al., 2012). De même, il a été montré que la p38-MAPK peut inhiber l'autophagie par la régulation négative de la formation du complexe mATG9/p38IP (Webber and Tooze, 2010). A l'inverse, la p38-MAPK peut activer l'autophagie comme cela a été mis en évidence dans un modèle de cancer de l'ovaire (Xu et al., 2016) et de gliome (Thiyagarajan et al., 2016). Au regard des résultats que nous avons obtenu, cette protéine, activée en réponse à un stress, pourrait constituer un nœud de signalisation, à l'instar de mTOR et réguler la réponse autophagique.

Ces travaux ont également montré que l'activation de la voie neurotrophique est potentialisée lorsque l'autophagie est inhibée, ce qui suggère une collaboration entre ces deux mécanismes pour assurer la survie de la cellule, particulièrement en conditions hypoxiques. La collaboration de ces deux voies pour la survie des cellules tumorales est également soulignée par le fait que seule la double inhibition induit une diminution de l'activité métabolique et un clivage de la PARP (signe d'une mort apoptotique), principalement pour les cellules cultivées en hypoxie. L'autophagie étant un mécanisme majeur de résistance aux traitements, de nombreuses recherches sont réalisées sur des combinaison de traitements associant l'inhibition de l'autophagie à une autre approche. Elle peut par exemple être

BY-NC-ND

associée à une chimiothérapie pour sensibiliser les cellules, comme par exemple dans le cancer du sein (Zhou et al., 2015), ou dans le cancer du poumon (Liu et al., 2013c), principalement en favorisant l'apoptose. Des combinaisons d'anticorps et d'inhibition de l'autophagie (à l'aide de la chloroquine) ont également été testées, notamment le bevacizumab (anti-VEGF), le cetuximab et panitumumab (deux anti-EGFR) (Koustas et al., 2017; Selvakumaran et al., 2013). Dans tous les cas, l'inhibition de l'autophagie améliore l'efficacité du traitement, ce qui suggère que le ciblage de plusieurs mécanismes est un axe de recherche intéressant pour les thérapies anti-cancéreuses.

Ces résultats ont été complétés d'expériences *ex vivo* sur des coupes de tumeurs montrant un marquage de LC3 et la sur-expression du récepteur TrkC dans les tumeurs des patients atteints de GBM. Ce qui est particulièrement intéressant dans ces résultats est de constater que lorsqu'on s'éloigne du cœur de la tumeur (zone particulièrement hypoxique, comme en atteste le marquage BNIP3), l'expression de TrkC et de LC3 diminuent. Or cette zone centrale, pauvre en oxygène, est connue pour héberger de façon préférentielle les CSC (Pistollato et al, 2010). De plus, des études très récemment publiées montrent que les zones hypoxiques pourraient même stimuler la dédifférenciation de cellules tumorales vers des phénotypes souches au sein de ces zones hypoxiques (Li et al., 2013, Wang et al., 2017b). Or, il a été suggéré que les GBM étaient initiés par un type cellulaire particulier, les « glioma initiating cells » (GIC) (Pollard et al., 2009). Ce type cellulaire, en plus d'initier la tumeur, serait capable de la maintenir grâce à des caractéristiques particulières : la capacité d'auto-renouvellement et la multipotence, caractéristiques associées aux cellules souches (Niibori-Nambu et al., 2013). De plus, ces cellules seraient responsables de la résistance des GBM aux traitements (Rich and Bao, 2007) et évolueraient dans des niches caractéristiques, composées de cellules souches, cellules de soutien et de facteurs nécessaires à l'auto-renouvellement des cellules souches (Fuchs et al., 2004).

Il semble exister un lien entre ce compartiment des cellules souches cancéreuses et les deux signalisations de survie étudiées. Outre assurer la survie des cellules tumorales, ces deux mécanismes pourraient également contribuer à l'agressivité et à la résistance des tumeurs cérébrales. C'est également ce que suggère la littérature, ces mécanismes sont connus pour être associés à un type cellulaire particulier, les cellules souches cancéreuses (CSC). En effet, il a été montré que les neurotrophines favorisent le phénotype souche (Xiong et al., 2013, lawn 2015) et que les CSC activent la machinerie autophagique en réponse à une perturbation de leur environnement, comme un manque d'oxygène ou un traitement (Vitale et al., 2015) . Les CSC ne représentent qu'une faible proportion de la tumeur mais, grâce à leur capacité d'auto-renouvellement, elles maintiennent le pool de cellules tumorales et sont en partie responsables de l'expansion de la tumeur (Lathia et al., 2015). De plus, du fait de leur

BY-NC-ND

phénotype souche, ces cellules sont plus résistantes que les autres cellules constituant la tumeur aux différents stress et aux traitements, et sont en partie responsables de la récidive (Auffinger et al., 2015; Persano et al., 2013).

Dans la 2ème partie de ce travail nous avons cherché à identifier le lien entre CSC, autophagie et signalisation neurotrophique. Pour cela, nous avons étudié l'impact de l'inhibition des deux voies, autophagique et neurotrophique, sur leurs caractéristiques fonctionnelles. En fonction de leur état, activées ou quiescentes, leur comportement sera différent, de même que leur capacité de renouvellement et de résistance aux thérapies. Pour cela, nous avons modifié notre méthodologie pour obtenir une inactivation pérenne de l'autophagie et de la signalisation neurotrophique en ciblant TrkC et Beclin1. Nous avons utilisé des shRNA qui nous ont permis, à l'aide d'une pression de sélection, d'obtenir des lignées stables de cellules déficientes pour la signalisation neurotrophique ou pour l'autophagie.

L'autophagie est un processus qui se met en place rapidement, c'est pourquoi les premiers travaux ont été réalisés après des temps d'expositions courts à l'hypoxie (maximum 24h). Mais l'étude de la signalisation neurotrophique nécessite des délais plus longs pour se mettre en place (Rajagopal et al., 2004). De plus l'émergence des CSC est également un processus qui nécessite un stress prolongé (Sehl et al., 2015). C'est pourquoi la deuxième partie de ce travail est réalisée après une exposition des cellules à 96h d'hypoxie. Ce stress chronique conduit, comme évoqué précédemment, à une activation de l'autophagie, particulièrement importante quand la signalisation TrkC est inhibée. La faible disponibilité en oxygène conduit également à une plus forte transcription du récepteur TrkC sous sa forme totale, qui assure la signalisation. Cependant, les cellules dont l'autophagie a été inhibée ne sur-expriment ni le transcrit du récepteur, ni la forme protéique, alors que c'était le cas lors d'une courte hypoxie (<24h). Il est possible que la compensation observée alors soit une réponse qui se mette en place rapidement après le stress et s'atténue si celui-ci est prolongé, pour éventuellement être remplacée par un autre mécanisme de survie.

C'est dans cette idée que nous avons évalué l'expression de l'EGFR lors du stress hypoxique. En effet, le gène codant pour l'EGFR n'est pas muté dans les U87-MG (Su et al., 2008), comme nous avons pu le montrer et elles ne sur-expriment pas ce récepteur. Il pourrait intervenir dans une voie alternative de survie pour pallier l'inhibition de l'autophagie ou de la voie TrkC. Il apparait que l'hypoxie entraine une diminution de l'expression de l'EGFR dans les cellules contrôle alors qu'elle induit l'augmentation de son expression dans les cellules dont l'autophagie ou la signalisation TrkC ont été inhibées. Ces résultats suggèrent que l'EGFR participe à la réponse adaptative à l'hypoxie des cellules modifiées.

Nous avons ensuite étudié la réponse neurotrophique. Lors de ce stress apparenté à la chronicité (96h), les cellules dont l'autophagie a été inhibée ne sur-expriment plus le transcrit

BY-NC-ND

du récepteur comme c'était le cas lors d'une hypoxie courte (moins de 24h). L'expression protéique est également réduite en hypoxie pour les lignées U87-Beclin1 et U87-shTrkC. Cette sous-expression, attendue pour la lignée dont la signalisation TrkC a été inhibée, ne correspond pas aux résultats obtenus avec une exposition courte à l'hypoxie pour la lignée dont l'autophagie est inhibée. Cependant ces résultats concordent avec une réponse compensatoire qui pourrait être dépendante d'une cinétique et qui diminuerait au fur et à mesure du stress. Il est en effet possible que la compensation observée lors de l'hypoxie courte soit une réponse qui se mette en place rapidement après le stress et s'atténue si le stress est prolongé, pour éventuellement être remplacée par un autre mécanisme de survie.

De plus, comme le récepteur TrkC peut s'hétérodimériser avec deux autres récepteurs, $p75^{NTR}$ (Friedman and Greene, 1999) et la sortiline (récepteur à la neurotensine) (Vaegter et al., 2011), nous nous sommes alors intéressés à l'expression de ces deux co-récepteurs en réponse à l'hypoxie. Même si nous n'avons pas mis en évidence de variation de leur transcription, nous ne pouvons pas exclure une dimérisation avec le récepteur TrkC, ou un changement de localisation, qui affecterait leur fonction. Nous avons en effet observé une augmentation de l'expression de la sortiline et une co-localisation avec le récepteur TrkC, lorsque l'autophagie est inhibée. Or il a été montré que la dimérisation de TrkC avec la sortiline assure son transport vers les compartiments nécessitant sa signalisation, améliore cette signalisation et participe à la survie cellulaire (Vaegter et al., 2011).

Lorsque nous avons étudié les voies de signalisation en aval du récepteur TrkC, nous avons montré que, contrairement à ce qui a été observé précédemment, l'hypoxie chronique entraine une diminution de l'activation de la p38-MAPK qui se traduit par une baisse de sa phosphorylation et une augmentation de l'activation de la voie ERK. Cela semble indiquer que la signalisation TrkC, mise en place en réponse à l'hypoxie, évolue en fonction de la durée du stress. L'activation du récepteur TrkC conduirait dans un premier temps à l'activation de la voie des MAP kinases via la p38-MAPK, puis la protéine ERK prendrait le relais. L'activation de la p38MAPK participe à la survie cellulaire en répondant aux stress que peut rencontrer la cellule (Igea and Nebreda, 2015), mais il a également été montré que lorsque son activation se fait sur une longue durée, elle participe à la mort cellulaire (Xia et al., 1995). Il est possible que ERK prenne alors le relais pour permettre aux cellules d'échapper à l'apoptose puisque la signalisation via cette protéine favorise la survie cellulaire (Deinhardt and Chao, 2014).

Il a été montré que l'autophagie et la signalisation neurotrophiques sont deux mécanismes fréquemment associés à une sous-population particulière de cellules tumorales, les CSC (Xiong et al., 2013; Ye et al., 2013). Or ces deux mécanismes sont amplifiés dans les cellules de GBM et nous avons montré sur des coupes de tumeurs de patients que le cœur des tumeurs, fortement hypoxique et connu pour abriter les CSC, est également la zone dans

BY-NC-ND

laquelle l'autophagie et la signalisation TrkC sont les plus actives. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à cette population de cellules et à l'impact de l'inhibition de l'autophagie ou de la signalisation TrkC sur leur phénotype et leur comportement.

L'étude des CSC est complexe du fait de leur faible fréquence au sein de la tumeur (Richichi et al., 2016). C'est pourquoi nous avons associé l'étude sur les populations totales à une technique de tri cellulaire, basée sur les paramètres physico-chimiques des cellules (taille, densité, rigidité, déformabilité) (Mélin et al., 2013). Il a en effet été montré que les CSC ne partagent pas les mêmes caractéristiques biophysiques associées à leurs particularités biologiques que les cellules cancéreuses classiques (Lautrette et al., 2003). Ce type de tri permet donc d'obtenir des fractions enrichies en CSC, il a d'ailleurs été déterminé d'après une précédente étude du laboratoire (Bertrand et al., 2009), que, pour la lignée U87-MG, les CSC sont éluées avec la fraction F3 et que la fraction F1 contient les cellules plutôt différenciées. Le tri des CSC a par la suite pu être affiné grâce à des études sur le CCR et les hIPSc (Human Induced Pluripotent Stem Cells) qui ont apporté des éléments complémentaires (Faye et al., 2016; Mélin et al., 2014). D'autres techniques d'enrichissement en cellules souches basées sur des paramètres physiques existent, notamment la densité, grâce à un gradient de concentration (Liu et al., 2011, 2012). Cependant ce type de tri est moins précis car basé uniquement sur la densité cellulaire.

Les profils d'élution obtenus nous ont permis de confirmer que l'insertion d'un vecteur vide dans les cellules contrôle ne modifie ni leurs caractéristiques, ni leurs propriétés biologiques, les profils d'élution étant identiques. En revanche, l'inhibition de l'autophagie et de la signalisation TrkC modifient la structure des cellules, il y a en effet un décalage du pic vers la droite pour les premières, ce qui semble traduire la présence de cellules plus indifférenciées, et un décalage du pic vers la gauche pour les secondes, ce qui traduit la présence de cellules plus différenciées, ou ayant des caractéristiques d'indifférenciation différentes (Bertrand et al., 2009; Mélin et al., 2012).

Dans notre étude, l'inhibition de l'autophagie favorise les cellules qui prolifèrent davantage, et, en particulier, qui sont toujours capables de proliférer en hypoxie favorisant une population de cellules plus actives et dont la prolifération n'est pas affectée par le stress hypoxique. Ce résultat s'explique par le fait que l'autophagie entraine un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M, comme l'ont montré Chen et al., dans un modèle de cancer du sein (Chen et al., 2014). L'inhibition de l'autophagie pourrait permettre la levée de ce blocage.

Les CSC sont caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement, ainsi, bien que peu nombreuses, elles participent au maintien du pool de cellules tumorales (Lathia et al., 2015). Nous nous sommes donc intéressés à la capacité clonale des cellules, c'est-à-dire leur capacité à former des colonies en milieu semi-solide. Il apparait que l'augmentation de la

BY-NC-ND

prolifération des cellules, quand l'autophagie est inhibée, s'accompagne d'une forte activité clonale, en particulier pour la fraction F3. Cela indique la présence d'une population plus active présentant des caractéristiques de CSC. Ces résultats sont étonnants, en effet, les CSC, comme les cellules souches classiques, sont connues pour avoir un faible taux de prolifération (Ciurea et al., 2014). Cela pourrait s'expliquer par une modification du phénotype de CSC : l'absence d'autophagie fonctionnelle les forcerait a rentrer dans le cycle cellulaire, les faisant passer de cellules souches authentiques au stade plus avancé de progéniteurs.

Les CSC assurent également la résistance des tumeurs aux traitements. Nous avons donc évalué l'impact de l'inhibition de l'autophagie sur la résistance des cellules à l'agent chimiothérapeutique utilisé en routine, le Témozolomide (TMZ). Le TMZ est un agent alkylant de l'ADN, il intervient lors de la réplication de l'ADN et provoque l'apoptose des cellules. Il n'est donc efficace que sur les cellules cyclantes (Zhang et al., 2012). C'est pourquoi les CSC, qui se trouvent généralement dans un état quiescent, sont résistantes au TMZ (Chen et al., 2012). Après avoir déterminé l'IC50 du TMZ en nous appuyant sur la littérature (Beier et al., 2008), nous avons traité les cellules pendant 48h. Du fait de la forte prolifération des cellules où l'autophagie a été inhibée, nous nous attendions à une grande sensibilité au TMZ, ce n'est cependant pas le cas. Il apparait en effet que le TMZ entraine une forte diminution de la prolifération cellulaire. Mais, contrairement aux U87-pLKO, le TMZ n'augmente pas l'apoptose basale, déjà faible sans traitement, en particulier pour la fraction F3. La perte de l'autophagie ne sensibilise donc pas les cellules au TMZ, au contraire, même s'il permet de diminuer fortement leur prolifération, il n'augmente que très peu leur mortalité par apoptose. Il existe cependant d'autres voies de mort qui pourraient présenter une alternative à l'apoptose, par exemple la nécrose. Il se pourrait également que le traitement au TMZ induise une signalisation d'échappement au sein de ces cellules, comme l'activation de la voie EGFR (Munoz et al., 2014).

Afin de valider la présence de CSC, nous avons étudié l'expression des transcrits de marqueurs de cellules souches. La présence de CSC pourrait, en effet expliquer le faible taux d'apoptose observé pour les cellules inhibées pour l'autophagie en présence de TMZ (Zhang et al., 2012). Nous avons choisi de baser la détection des CSC sur l'expression de 4 marqueurs : Oct4 (codé par le gène *POU5F1*), Sox2, BMI1 et LGR5. Oct4 et Sox2 sont des facteurs de transcription connus pour leur implication dans l'auto-renouvellement et le maintien de la pluripotence (Graham et al., 2003; Pesce and Schöler, 2001). Ils agissent comme co-régulateurs. BMI1 est un répresseur transcriptionnel, il empêche l'expression de gènes favorisant la différenciation des cellules (Park et al., 2004). LGR5 est un acteur de la voie Wnt, qui favorise l'activation de la β-caténine et qui permet la transcription de gènes impliqués dans le phénotype souche (Barker et al., 2007). Ces marqueurs sont utilisés pour la détection de

BY-NC-ND

CSC dans le GBM (Dahlrot et al., 2013; Nakata et al., 2013). En plus de l'état de différenciation des cellules, il a été montré dans un modèle de cancer colorectal que LGR5 et BMI1 sont également spécifiques de l'état d'activation des cellules. BMI1 est plutôt exprimé par les CSC quiescentes, alors que LGR5 est plutôt exprimé par les cellules actives (Yan et al., 2012). De plus, il a été mis en évidence qu'il existe une hétérogénéité des CSC issues de GBM, au niveau de leur capacité tumorigénique (Beier et al., 2007; Galli et al., 2004). Il a ensuite été montré que, parmi les CSC de GBM, il existe des cellules présentant tous les critères phénotypique associés aux CSC, mais qu'il en existe également qui présentent une version plus restreinte de ce phénoype souche (Günther et al., 2008). De nouveaux travaux ont par la suite confirmé, à partir d'un GBM issu de patient, qu'il existe au moins deux populations de CSC au sein de la tumeur, qui diffèrent au niveau de leur capacité de croissance et leur capacité à induire une tumeur (Piccirillo et al., 2009).

L'inhibition de l'autophagie entraine une augmentation de l'expression des transcrits de *BMI1* et *LGR5* en normoxie et de *POU5F1* en hypoxie par rapport aux cellules contrôle. Ces résultats sont concordants avec l'émergence d'une population de CSC de phénotype plus actif que celui des U87-pLKO quand la signalisation autophagique est inhibée. De plus, le tri a mis en évidence que l'inhibition de l'autophagie entraine une diminution des transcrits *POU5F1, LGR5* et *SOX2* par rapport aux U87-pLKO pour les deux fractions, ce qui semble indiquer une diminution du compartiment souche quiescent, au profit de cellules plus actives lorsque l'autophagie est inhibée, ce qui est en accord avec ce qui a été observé sur la population totale. Le décalage du pic de la fraction F3 vers la droite, la forte prolifération, l'expression des marqueurs spécifiques, la résistance à l'apoptose induite par le Témozolomide et la forte capacité clonale soutiennent l'hypothèse d'une population de CSC devenant plus actives, avec l'inhibition de l'autophagie. Ces résultats concordent avec l'activation de ERK. Il a en effet été montré que l'activation de la voie des MAPK via ERK conduit à la prolifération et à la survie cellulaire (Xia et al., 1995). Ainsi, lors de l'inhibition de l'autophagie, les cellules souches passeraient dans un état activé, les conduisant vers le pool des progéniteurs.

Il a été montré que les CSC utilisent particulièrement l'autophagie pour résister aux stress et aux traitements, il est donc surprenant que l'inhibition de ce processus ne désavantage pas les cellules quant à leur survie, en particulier suite au traitement, mais d'autant plus qu'elle entraine une augmentation du pool de CSC (Vitale et al., 2015).

Ces résultats suggèrent que l'autophagie n'est pas le seul processus de protection des CSC, mais qu'elles détournent probablement d'autres mécanismes de survie. Du fait de la compensation précoce assurée par la voie TrkC, cette autre voie pourrait être la signalisation

BY-NC-ND

TrkC. C'est pourquoi nous avons fait les mêmes expériences en inhibant la voie TrkC à l'aide d'un shRNA contre le récepteur.

Le blocage de la signalisation TrkC ne modifie pas la prolifération des cellules par rapport aux cellules contrôles en normoxie, mais il limite la baisse de prolifération provoquée par l'hypoxie. De même, la capacité clonale des cellules inhibées pour la signalisation TrkC est la même que celle des cellules contrôle, à la fois pour la population totale et pour les fractions. Elles semblent garder des propriétés proches de celles des cellules contrôle.

La faible modification de la prolifération des cellules par l'inhibition de la signalisation TrkC suggère que les cellules vont présenter la même sensibilité au TMZ que les cellules contrôle. Cependant, le TMZ induit une diminution plus importante de la prolifération des cellules inhibées pour la voie TrkC que celle des cellules contrôle, mais ne parvient cependant pas à induire l'apoptose de ces cellules, contrairement aux cellules contrôle. Ces résultats sont cohérents avec la littérature. Il a en effet été montré dans des modèles de neuroblastome, à la fois *in vivo* et *in vitro*, que la combinaison d'un inhibiteur de TrkB associé au TMZ limite la croissance des cellules tumorales (Croucher et al., 2015; Iyer et al., 2016). L'apoptose n'a cependant pas été mesurée dans ces travaux.

Ces résultats sont également cohérents avec ceux obtenus suite au tri des cellules. En effet, bien que la prolifération des cellules U87-shTrkC de la fraction F3 ne varie pas par rapport aux U87-pLKO, celle des cellules de la fraction F1 est très fortement diminuée. La faible prolifération observée sur la population totale s'explique par l'émergence de cellules plus différenciées, comme expliqué après.

Malgré une diminution de la prolifération, le TMZ n'induit pas l'apoptose des cellules dont la signalisation TrkC est inhibée contrairement aux cellules U87-pLKO, pour la population totale, comme pour les fractions. Nous avons montré précédemment que seule la double inhibition, signalisation TrkC et autophagie, conduit à l'apoptose en conditions hypoxiques (Jawhari et al., 2017). De plus, il a été montré que l'autophagie et l'apoptose s'inhibent mutuellement (Kroemer et al., 2010). Or nous avons montré que l'inhibition de TrkC augmente le processus autophagique. Ce dernier est également augmenté en réponse au TMZ dans les cellules de glioblastome (Zou et al., 2014). L'autophagie est donc fortement amplifiée dans ces conditions, ce qui protège probablement les cellules contre l'induction de l'apoptose.

Afin d'identifier la nature de cette population cellulaire, nous avons ensuite étudié l'expression de marqueurs spécifiques des cellules souches. L'inhibition de la voie TrkC entraine une forte diminution de l'expression des marqueurs souches, ce qui semble suggérer que l'inhibition de la signalisation TrkC entrainerait la perte d'une partie du compartiment des cellules souches. Ces résultats sont confirmés par la baisse d'expression de ces mêmes marqueurs observée pour les cellules triées, en particulier la fraction F3, enrichie en cellules

BY-NC-ND

souches, ainsi que par le décalage du pic de la F3 vers la gauche. Ces résultats sont également cohérents avec la littérature, Lawn et al. ont en effet mis en évidence que la signalisation via TrkB et TrkC favorisent l'émergence de CSC dans le gliome (Lawn et al., 2015).

D'après les résultats obtenus il apparait que l'inhibition de l'autophagie et de la signalisation TrkC entrainent des modifications importantes du phénotype des CSC. Bien que ces modifications soient complètement différentes, puisque l'une favorise l'émergence d'une population active alors que l'autre favorise l'émergence d'une population quiescente, elles aboutissent au même résultat, une plus grande résistance des cellules au stress et au TMZ. Cela appuie l'idée d'une compensation entre les deux voies permettant la survie des cellules lorsque l'une ou l'autre est inhibée.

Ces résultats ont également mis en avant l'évolution du phénotype des CSC en fonction des conditions. Nous avons étudié cette population à un instant t, dans des conditions définies, mais il a été démontré qu'un équilibre dynamique, de différenciation et dédifférenciation, se met en place entre les CSC et les cellules différenciées, ce qui entretient une large gamme de cellules tumorales dont les phénotypes forment un continuum entre « différencié » et « souche » (Hossain et al., 2015; Iliopoulos et al., 2011). Nos résultats sont donc plutôt le reflet d'une tendance, montrant que les différents stress vont favoriser un état de différenciation plutôt qu'un autre, mais ce phénotype ne sera jamais exclusif. De plus, il a été montré sur des tumeurs issues de patients que les CSC « primitives » les plus indifférenciées représente en fait une infime partie des CSC du GBM, alors que les CSC plus différenciées seraient plus nombreuses (figure 47) (Bradshaw et al., 2016).

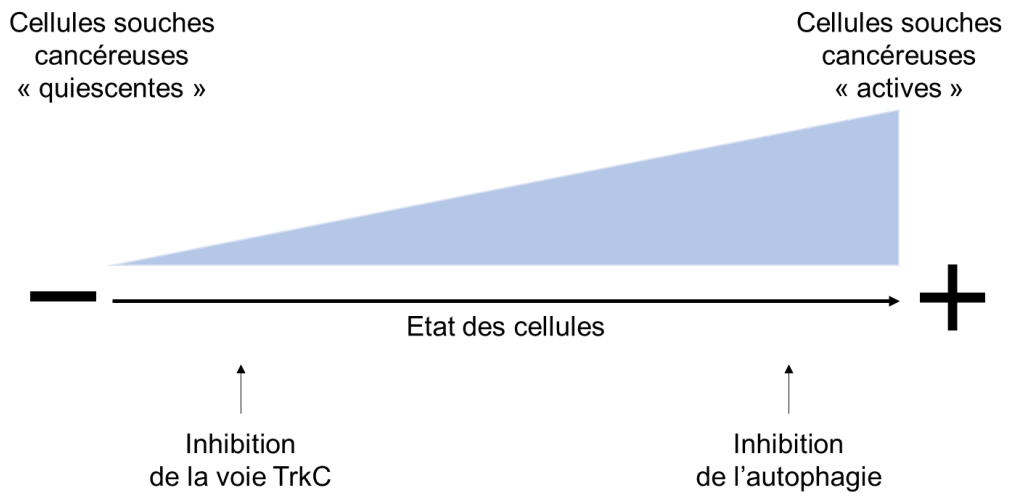


Figure 47 : Abondance des CSC dans le GBM en fonction de leur état d'activation et sélection du phénotype par l'inhibition de l'autophagie et de la signalisation Trk

BY-NC-ND

Conclusion générale

BY-NC-ND

D'après nos résultats, il apparait que l'inhibition de l'autophagie ou de la signalisation neurotrophique passant par TrkC, qui sont connues pour être des voies de survie notamment détournées par les CSC, n'augmente pas la sensibilité des cellules de GBM aux traitements. Nous avons précédemment montré qu'il existe une collaboration entre ces deux voies pour assurer la survie des cellules lorsque l'une ou l'autre est défectueuse. Nous avons pu montrer que cette compensation va jusqu'à protéger les cellules contre l'apoptose induite par un agent chimiothérapeutique, probablement grâce à l'émergence de populations de CSC résistantes, présentant un phénotype plus ou moins actif. En effet, l'inhibition de l'une ou l'autre des voies entraine une modification du phénotype des CSC, tantôt activées, tantôt quiescentes. Ce qui souligne l'aspect dynamique du maintien des CSC dans le GBM et montre que la population de CSC n'est pas homogène mais se présente plutôt comme un continuum. Bien que les conditions de stress et le blocage des voies favorise un phénotype, celui-ci n'est pas exclusif.

Nous avons également montré que seule la double inhibition, autophagie et signalisation TrkC, permet l'induction de l'apoptose. La modification des CSC entraine en effet l'émergence de populations résistantes à l'apoptose induite par le TMZ. Il serait donc intéressant d'étudier le phénotype des cellules obtenues après la double inhibition afin de déterminer si la sensibilité à l'apoptose résulte d'une disparition, partielle ou totale, de la population de CSC.

De plus, en plus de l'autophagie canonique, il existe une autophagie non-canonique, ne nécessitant pas l'intervention de la protéine Beclin-1 (Codogno et al., 2011; Scarlatti et al., 2008). Il serait intéressant d'inhiber cette autophagie et d'étudier l'impact sur les CSC. Il est en effet possible que ces cellules profitent de cette forme d'autophagie pour assurer leur survie (Felzen et al., 2015). Le sh dirigé contre la protéine ATG5 visait à éteindre cette voie autophagique, en plus de la voie canonique passant par Beclin, nous n'avons cependant pas réussi à induire une extinction stable et efficace de l'autophagie.

Nous avons commencé l'étude de la sortiline, bien que son expression ne change pas, sa localisation varie. Il semblerait qu'elle s'associe davantage à TrkC lorsque l'autophagie est inhibée. Lorsque la sortiline lie le récepteur TrkC, elle facilite son transport antérograde et favorise une signalisation pro-survie (Vaegter et al., 2011). Il est donc possible qu'elle participe à la compensation de la perte de l'autophagie en facilitant l'activation de TrkC. Il pourrait être intéressant d'étudier son comportement en présence de TMZ et dans les différentes fractions en suivant le trafic intra-cellulaire de la sortiline lorsqu'elle est associée au TrkC.

L'étude de voies alternatives pourrait également être intéressante, il a effectivement été montré que la voie de l'EGFR est activée en réponse au traitement au TMZ afin d'assurer la survie des cellules (Munoz et al., 2014). Nous n'avons pu montrer que l'augmentation de son expression en hypoxie lorsque les voies autophagique et neurotrophique sont inhibées, il

BY-NC-ND

faudrait étudier son éventuelle modulation par le TMZ et en fonction du phénotype, souche ou différencié. Il a déjà été montré que les cellules initiatrices de GBM expriment l'EGFR et qu'il participe à la tumorigénicité de ces dernières (Mazzoleni et al., 2010). L'EGFR pourrait donc participer à la compensation de la perte des voies autophagique et neurotrophique. Il serait également intéressant d'étudier son comportement lorsque les deux voies sont inhibées.

BY-NC-ND

Références bibliographiques

BY-NC-ND

Références bibliographiques

Abdouh, M., Facchino, S., Chatoo, W., Balasingam, V., Ferreira, J., and Bernier, G. (2009). BMI1 Sustains Human Glioblastoma Multiforme Stem Cell Renewal. J. Neurosci. *29*, 8884–8896.

Abdul Rahim, S.A., Dirkse, A., Oudin, A., Schuster, A., Bohler, J., Barthelemy, V., Muller, A., Vallar, L., Janji, B., Golebiewska, A., et al. (2017). Regulation of hypoxia-induced autophagy in glioblastoma involves ATG9A. Br. J. Cancer *117*, 813–825.

Alayev, A., and Holz, M.K. (2013). mTOR signaling for biological control and cancer. J. Cell. Physiol. *228*, 1658–1664.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 3983–3988.

Alison, M., and Islam, S. (2009). Attributes of adult stem cells. J. Pathol. *217*, 144–160.

Al-Qudah, M.A., and Al-Dwairi, A. (2016). Mechanisms and regulation of neurotrophin synthesis and secretion. Neurosci. Riyadh Saudi Arab. *21*, 306–313.

Amador-Arjona, A., Cimadamore, F., Huang, C.-T., Wright, R., Lewis, S., Gage, F.H., and Terskikh, A.V. (2015). SOX2 primes the epigenetic landscape in neural precursors enabling proper gene activation during hippocampal neurogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, E1936-1945.

Amsterdam, A., Raanan, C., Schreiber, L., Freyhan, O., Schechtman, L., and Givol, D. (2013a). Localization of the stem cell markers LGR5 and Nanog in the normal and the cancerous human ovary and their inter-relationship. Acta Histochem. *115*, 330–338.

Amsterdam, A., Raanan, C., Schreiber, L., Polin, N., and Givol, D. (2013b). LGR5 and Nanog identify stem cell signature of pancreas beta cells which initiate pancreatic cancer. Biochem. Biophys. Res. Commun. *433*, 157–162.

Andero, R., Choi, D.C., and Ressler, K.J. (2014). BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. *122*, 169–192.

Ao, X., Zou, L., and Wu, Y. (2014). Regulation of autophagy by the Rab GTPase network. Cell Death Differ. *21*, 348–358.

Arévalo, J.C., and Wu, S.H. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! Cell. Mol. Life Sci. CMLS *63*, 1523–1537.

Auffinger, B., Tobias, A.L., Han, Y., Lee, G., Guo, D., Dey, M., Lesniak, M.S., and Ahmed, A.U. (2014). Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. Cell Death Differ. *21*, 1119–1131.

Auffinger, B., Spencer, D., Pytel, P., Ahmed, A.U., and Lesniak, M.S. (2015). The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. Expert Rev. Neurother. *15*, 741–752.

BY-NC-ND

Balkwill, F.R., Capasso, M., and Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. J. Cell Sci. *125*, 5591–5596.

Barbacid, M. (1993). Nerve growth factor: a tale of two receptors. Oncogene *8*, 2033–2042.

Barde, Y.A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. EMBO J. *1*, 549–553.

Barker, N., and Clevers, H. (2010). Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. Gastroenterology *138*, 1681–1696.

Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. Nature *449*, 1003–1007.

Baron, N., Deuster, O., Noelker, C., Stüer, C., Strik, H., Schaller, C., Dodel, R., Meyer, B., and Bacher, M. (2011). Role of macrophage migration inhibitory factor in primary glioblastoma multiforme cells. J. Neurosci. Res. *89*, 711–717.

Batich, K.A., Reap, E.A., Archer, G.E., Sanchez-Perez, L., Nair, S.K., Schmittling, R.J., Norberg, P., Xie, W., Herndon, J.E., Healy, P., et al. (2017). Long-term Survival in Glioblastoma with Cytomegalovirus pp65-Targeted Vaccination. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *23*, 1898–1909.

Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P.J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U., and Beier, C.P. (2007). CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. Cancer Res. *67*, 4010–4015.

Beier, D., Röhrl, S., Pillai, D.R., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L.A., Leukel, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdahn, U., Trampe-Kieslich, A., et al. (2008). Temozolomide Preferentially Depletes Cancer Stem Cells in Glioblastoma. Cancer Res. *68*, 5706–5715.

Berezovsky, A.D., Poisson, L.M., Cherba, D., Webb, C.P., Transou, A.D., Lemke, N.W., Hong, X., Hasselbach, L.A., Irtenkauf, S.M., Mikkelsen, T., et al. (2014). Sox2 Promotes Malignancy in Glioblastoma by Regulating Plasticity and Astrocytic Differentiation. Neoplasia N. Y. N *16*, 193–206.e25.

Bertrand, J., Begaud-Grimaud, G., Bessette, B., Verdier, M., Battu, S., and Jauberteau, M.-O. (2009). Cancer stem cells from human glioma cell line are resistant to Fas-induced apoptosis. Int. J. Oncol. *34*, 717–727.

Bhutia, S.K., Mukhopadhyay, S., Sinha, N., Das, D.N., Panda, P.K., Patra, S.K., Maiti, T.K., Mandal, M., Dent, P., Wang, X.-Y., et al. (2013). Autophagy: Cancer's Friend or Foe? Adv. Cancer Res. *118*, 61–95.

Biffo, S., Offenhauser, N., Carter, B.D., and Barde, Y.A. (1995). Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. Development *121*, 2461–2470.

Bischof, J., Westhoff, M.-A., Wagner, J.E., Halatsch, M.-E., Trentmann, S., Knippschild, U., Wirtz, C.R., and Burster, T. (2017). Cancer stem cells: The potential role of autophagy, proteolysis, and cathepsins in glioblastoma stem cells. Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med. *39*, 1010428317692227.

BY-NC-ND

Boeshore, K.L., Luckey, C.N., Zigmond, R.E., and Large, T.H. (1999). TrkB isoforms with distinct neurotrophin specificities are expressed in predominantly nonoverlapping populations of avian dorsal root ganglion neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *19*, 4739–4747.

Bradshaw, A., Wickremesekera, A., Brasch, H.D., Chibnall, A.M., Davis, P.F., Tan, S.T., and Itinteang, T. (2016). Cancer Stem Cells in Glioblastoma Multiforme. Front. Surg. *3*.

Brodeur, G.M., Minturn, J.E., Ho, R., Simpson, A.M., Iyer, R., Varela, C.R., Light, J.E., Kolla, V., and Evans, A.E. (2009). Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *15*, 3244–3250.

Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S., and Schreiber, S.L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. Nature *369*, 756–758.

de Bruin, E.C., McGranahan, N., Mitter, R., Salm, M., Wedge, D.C., Yates, L., Jamal-Hanjani, M., Shafi, S., Murugaesu, N., Rowan, A.J., et al. (2014). Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. Science *346*, 251–256.

Cabrera, M.C., Hollingsworth, R.E., and Hurt, E.M. (2015). Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. World J. Stem Cells *7*, 27–36.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature *473*, 298–307.

Catalano, V., Gaggianesi, M., Spina, V., Iovino, F., Dieli, F., Stassi, G., and Todaro, M. (2011). Colorectal Cancer Stem Cells and Cell Death. Cancers *3*, 1929–1946.

Chatoo, W., Abdouh, M., David, J., Champagne, M.-P., Ferreira, J., Rodier, F., and Bernier, G. (2009). The Polycomb Group Gene Bmi1 Regulates Antioxidant Defenses in Neurons by Repressing p53 Pro-Oxidant Activity. J. Neurosci. *29*, 529–542.

Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G., and Parada, L.F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. Nature *488*, nature11287.

Chen, K., Shou, L.-M., Lin, F., Duan, W.-M., Wu, M.-Y., Xie, X., Xie, Y.-F., Li, W., and Tao, M. (2014). Artesunate induces G2/M cell cycle arrest through autophagy induction in breast cancer cells. Anticancer. Drugs *25*, 652–662.

Cheng, H.-W., Liang, Y.-H., Kuo, Y.-L., Chuu, C.-P., Lin, C.-Y., Lee, M.-H., Wu, A.T.H., Yeh, C.-T., Chen, E.I.-T., Whang-Peng, J., et al. (2015). Identification of thioridazine, an antipsychotic drug, as an antiglioblastoma and anticancer stem cell agent using public gene expression data. Cell Death Dis. *6*, e1753.

Cherra, S.J., Kulich, S.M., Uechi, G., Balasubramani, M., Mountzouris, J., Day, B.W., and Chu, C.T. (2010). Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. J. Cell Biol. *190*, 533–539.

Cho, D.-Y., Lin, S.-Z., Yang, W.-K., Lee, H.-C., Hsu, D.-M., Lin, H.-L., Chen, C.-C., Liu, C.-L., Lee, W.-Y., and Ho, L.-H. (2013). Targeting Cancer Stem Cells for Treatment of Glioblastoma Multiforme. Cell Transplant. *22*, 731–739.

Ciceri, G., and Dehorter, N. (2014). Organisation des lignées d'interneurones du cortex cérébral. médecine/sciences *30*, 144–146.

BY-NC-ND

Ciurea, M.E., Georgescu, A.M., Purcaru, S.O., Artene, S.-A., Emami, G.H., Boldeanu, M.V., Tache, D.E., and Dricu, A. (2014). Cancer Stem Cells: Biological Functions and Therapeutically Targeting. Int. J. Mol. Sci. *15*, 8169–8185.

Clary, D.O., and Reichardt, L.F. (1994). An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 11133–11137.

Codogno, P., Mehrpour, M., and Proikas-Cezanne, T. (2011). Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 7–12.

Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. Cancer Res. *65*, 10946–10951.

Covello, K.L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J.D., Arsham, A.M., Hu, C.-J., Labosky, P.A., Simon, M.C., and Keith, B. (2006). HIF-2α regulates Oct-4: effects of hypoxiaon stem cell function, embryonic development, and tumor growth. Genes Dev. *20*, 557–570.

Croucher, J.L., Iyer, R., Li, N., Molteni, V., Loren, J., Gordon, W.P., Tuntland, T., Liu, B., and Brodeur, G.M. (2015). TrkB inhibition by GNF-4256 slows growth and enhances chemotherapeutic efficacy in neuroblastoma xenografts. Cancer Chemother. Pharmacol. *75*, 131–141.

de la Cruz-Morcillo, M.A., Valero, M.L.L., Callejas-Valera, J.L., Arias-González, L., Melgar-Rojas, P., Galán-Moya, E.M., García-Gil, E., García-Cano, J., and Sánchez-Prieto, R. (2012). P38MAPK is a major determinant of the balance between apoptosis and autophagy triggered by 5-fluorouracil: implication in resistance. Oncogene *31*, 1073–1085.

Dahlrot, R.H., Hermansen, S.K., Hansen, S., and Kristensen, B.W. (2013). What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas? Int. J. Clin. Exp. Pathol. *6*, 334–348.

Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.-K., Liu, R., Wang, X., Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., Simeone, D.M., et al. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 10158–10163.

Dalerba, P., Kalisky, T., Sahoo, D., Rajendran, P.S., Rothenberg, M.E., Leyrat, A.A., Sim, S., Okamoto, J., Johnston, D.M., Qian, D., et al. (2011). Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors. Nat. Biotechnol. *29*, 1120–1127.

De Duve, C. (1957). [The lysosomes: a novel group of cytoplasmic granules]. J. Physiol. (Paris) *49*, 113–115.

De la Cruz-Morcillo, M.A., Berger, J., Sánchez-Prieto, R., Saada, S., Naves, T., Guillaudeau, A., Perraud, A., Sindou, P., Lacroix, A., Descazeaud, A., et al. (2016). p75 neurotrophin receptor and pro-BDNF promote cell survival and migration in clear cell renal cell carcinoma. Oncotarget *7*, 34480–34497.

DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., and Thompson, C.B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 19345–19350.

Dechant, G., Tsoulfas, P., Parada, L.F., and Barde, Y.A. (1997). The neurotrophin receptor p75 binds neurotrophin-3 on sympathetic neurons with high affinity and specificity. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *17*, 5281–5287.

BY-NC-ND

Deinhardt, K., and Chao, M.V. (2014). Trk receptors. Handb. Exp. Pharmacol. *220*, 103–119.

Del Bigio, M.R. (2010). Ependymal cells: biology and pathology. Acta Neuropathol. (Berl.) *119*, 55–73.

Descamps, S., Toillon, R.A., Adriaenssens, E., Pawlowski, V., Cool, S.M., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., Boilly, B., Peyrat, J.P., and Hondermarck, H. (2001). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. J. Biol. Chem. *276*, 17864–17870.

Dexter, D.L., Kowalski, H.M., Blazar, B.A., Fligiel, Z., Vogel, R., and Heppner, G.H. (1978). Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. Cancer Res. *38*, 3174–3181.

Di Leva, G., Garofalo, M., and Croce, C.M. (2014). MicroRNAs in cancer. Annu. Rev. Pathol. *9*, 287–314.

Dice, J.F., Terlecky, S.R., Chiang, H.L., Olson, T.S., Isenman, L.D., Short-Russell, S.R., Freundlieb, S., and Terlecky, L.J. (1990). A selective pathway for degradation of cytosolic proteins by lysosomes. Semin. Cell Biol. *1*, 449–455.

DiStefano, P.S., Chelsea, D.M., Schick, C.M., and McKelvy, J.F. (1993). Involvement of a metalloprotease in low-affinity nerve growth factor receptor truncation: inhibition of truncation in vitro and in vivo. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *13*, 2405–2414.

Djouder, N., Tuerk, R.D., Suter, M., Salvioni, P., Thali, R.F., Scholz, R., Vaahtomeri, K., Auchli, Y., Rechsteiner, H., Brunisholz, R.A., et al. (2010). PKA phosphorylates and inactivates AMPKalpha to promote efficient lipolysis. EMBO J. *29*, 469–481.

Dubanet, L., Bentayeb, H., Petit, B., Olivrie, A., Saada, S., de la Cruz-Morcillo, M.A., Lalloué, F., Gourin, M.-P., Bordessoule, D., Faumont, N., et al. (2015). Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. Br. J. Cancer *113*, 934–944.

Dunn, T.B. (1951). Morphology of mammary tumors in mice with and without the agent. Acta - Unio Int. Contra Cancrum *7*, 234–237.

Elkabes, S., Schaar, D.G., Dreyfus, C.F., and Black, I.B. (1995). Developmental regulation of neurotrophin-3 and trk C splice variants in optic nerve glia in vivo. Neuroscience *66*, 879–889.

Elsir, T., Edqvist, P.-H., Carlson, J., Ribom, D., Bergqvist, M., Ekman, S., Popova, S.N., Alafuzoff, I., Ponten, F., Nistér, M., et al. (2014). A study of embryonic stem cell-related proteins in human astrocytomas: identification of Nanog as a predictor of survival. Int. J. Cancer *134*, 1123–1131.

Ernfors, P., Merlio, J.-P., and Persson, H. (1992). Cells Expressing mRNA for Neurotrophins and their Receptors During Embryonic Rat Development. Eur. J. Neurosci. *4*, 1140–1158.

Esteban, P.F., Yoon, H.-Y., Becker, J., Dorsey, S.G., Caprari, P., Palko, M.E., Coppola, V., Saragovi, H.U., Randazzo, P.A., and Tessarollo, L. (2006). A kinase-deficient TrkC receptor isoform activates Arf6–Rac1 signaling through the scaffold protein tamalin. J. Cell Biol. *173*, 291–299.

Faye, P.-A., Vedrenne, N., De la Cruz-Morcillo, M.A., Barrot, C.-C., Richard, L., Bourthoumieu, S., Sturtz, F., Funalot, B., Lia, A.-S., and Battu, S. (2016). New Method for Sorting Endothelial

BY-NC-ND

and Neural Progenitors from Human Induced Pluripotent Stem Cells by Sedimentation Field Flow Fractionation. Anal. Chem. *88*, 6696–6702.

Fedr, R., Pernicová, Z., Slabáková, E., Straková, N., Bouchal, J., Grepl, M., Kozubík, A., and Souček, K. (2013). Automatic cell cloning assay for determining the clonogenic capacity of cancer and cancer stem-like cells. Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. *83*, 472–482.

Felzen, V., Hiebel, C., Koziollek-Drechsler, I., Reißig, S., Wolfrum, U., Kögel, D., Brandts, C., Behl, C., and Morawe, T. (2015). Estrogen receptor α regulates non-canonical autophagy that provides stress resistance to neuroblastoma and breast cancer cells and involves BAG3 function. Cell Death Dis. *6*, e1812.

Feng, Y., He, D., Yao, Z., and Klionsky, D.J. (2014). The machinery of macroautophagy. Cell Res. *24*, 24–41.

Forooghian, F., Kojic, L., Gu, Q., Wong, C.A., and Prasad, S.S. (2000). Molecular analysis of trkC in the cat visual cortex. J. Mol. Neurosci. MN *14*, 39–51.

Forristal, C.E., Wright, K.L., Hanley, N.A., Oreffo, R.O.C., and Houghton, F.D. (2010). Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. Reprod. Camb. Engl. *139*, 85–97.

Frade, J.M., and Barde, Y.-A. (1998). Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. BioEssays *20*, 137–145.

Friedman, W.J., and Greene, L.A. (1999). Neurotrophin signaling via Trks and p75. Exp. Cell Res. *253*, 131–142.

Fu, J., Liu, Z., Liu, X., Chen, F., Shi, H., Pangjesse, C., Ng, H., and Chen, Z. (2009). Glioblastoma stem cells resistant to temozolomide-induced autophagy. Chin. Med. J. (Engl.) *122*, 1255–1259.

Fuchs, E., Tumbar, T., and Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. Cell *116*, 769–778.

Fujisawa, H., Reis, R.M., Nakamura, M., Colella, S., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2000). Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *80*, 65–72.

Fujiwara, S., Nakagawa, K., Harada, H., Nagato, S., Furukawa, K., Teraoka, M., Seno, T., Oka, K., Iwata, S., and Ohnishi, T. (2007). Silencing hypoxia-inducible factor-1alpha inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. Int. J. Oncol. *30*, 793–802.

Fulda, S., and Debatin, K.-M. (2007). HIF-1-regulated glucose metabolism: a key to apoptosis resistance? Cell Cycle Georget. Tex *6*, 790–792.

Gabryel, B., Kost, A., Kasprowska, D., Liber, S., Machnik, G., Wiaderkiewicz, R., and Łabuzek, K. (2014). AMP-activated protein kinase is involved in induction of protective autophagy in astrocytes exposed to oxygen-glucose deprivation. Cell Biol. Int. *38*, 1086–1097.

Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., and Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer Res. *64*, 7011–7021.

BY-NC-ND

Galluzzi, L., Baehrecke, E.H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J.M., Cecconi, F., Choi, A.M., Chu, C.T., Codogno, P., Colombo, M.I., et al. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. EMBO J.

Gangemi, R.M.R., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M.C., Malatesta, P., Ravetti, G.L., Zona, G.L., Daga, A., and Corte, G. (2009). SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. Stem Cells Dayt. Ohio *27*, 40–48.

Ganley, I.G., Lam, D.H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. J. Biol. Chem. *284*, 12297–12305.

Gannage, M., da Silva, R.B., and Münz, C. (2013). Antigen processing for MHC presentation via macroautophagy. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *960*, 473–488.

Gawlik-Rzemieniewska, N., and Bednarek, I. (2016). The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells. Cancer Biol. Ther. *17*, 1–10.

Gilbert, M.R., Dignam, J.J., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Blumenthal, D.T., Vogelbaum, M.A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., et al. (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. N. Engl. J. Med. *370*, 699–708.

Ginhoux, F., and Prinz, M. (2015). Origin of microglia: current concepts and past controversies. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *7*, a020537.

Golden, E.B., Cho, H.-Y., Jahanian, A., Hofman, F.M., Louie, S.G., Schönthal, A.H., and Chen, T.C. (2014). Chloroquine enhances temozolomide cytotoxicity in malignant gliomas by blocking autophagy. Neurosurg. Focus *37*, E12.

Goldie, J.H. (2001). Drug resistance in cancer: a perspective. Cancer Metastasis Rev. *20*, 63–68.

Goldschneider, D., and Mehlen, P. (2010). Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. Oncogene *29*, onc201013.

Gong, S., Li, Q., Jeter, C.R., Fan, Q., Tang, D.G., and Liu, B. (2015). Regulation of NANOG in cancer cells. Mol. Carcinog. *54*, 679–687.

Gordan, J.D., Bertout, J.A., Hu, C.-J., Diehl, J.A., and Simon, M.C. (2007). HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. Cancer Cell *11*, 335–347.

Götz, R., Köster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Schartl, M., and Thoenen, H. (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. Nature *372*, 266–269.

Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., and Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. Neuron *39*, 749–765.

Gu, Y.Z., Moran, S.M., Hogenesch, J.B., Wartman, L., and Bradfield, C.A. (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. Gene Expr. *7*, 205–213.

Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., and Sabatini, D.M. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor,

BY-NC-ND

rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. Dev. Cell *11*, 859–871.

Günther, H.S., Schmidt, N.O., Phillips, H.S., Kemming, D., Kharbanda, S., Soriano, R., Modrusan, Z., Meissner, H., Westphal, M., and Lamszus, K. (2008). Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. Oncogene *27*, 2897–2909.

Haar, C.P., Hebbar, P., Wallace, G.C., Das, A., Vandergrift, W.A., Smith, J.A., Giglio, P., Patel, S.J., Ray, S.K., and Banik, N.L. (2012). Drug resistance in glioblastoma: a mini review. Neurochem. Res. *37*, 1192–1200.

Haegebarth, A., and Clevers, H. (2009). Wnt signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin. Am. J. Pathol. *174*, 715–721.

Hafidi, A., and Galifianakis, D. (2003). Macroglia distribution in the developing and adult inferior colliculus. Dev. Brain Res. *143*, 167–177.

Han, J., and Chen, Q. (2015). MiR-16 modulate temozolomide resistance by regulating BCL-2 in human glioma cells. Int. J. Clin. Exp. Pathol. *8*, 12698–12707.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. Cell *100*, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646–674.

Harder, L.M., Bunkenborg, J., and Andersen, J.S. (2014). Inducing autophagy. Autophagy *10*, 339–355.

Hardie, D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 774–785.

Harrington, A.W., and Ginty, D.D. (2013). Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. Nat. Rev. Neurosci. *14*, 177–187.

Hart, M.G., Grant, R., Garside, R., Rogers, G., Somerville, M., and Stein, K. (2011). Chemotherapy wafers for high grade glioma. Cochrane Database Syst. Rev. CD007294.

Hattermann, K., Flüh, C., Engel, D., Mehdorn, H.M., Synowitz, M., Mentlein, R., and Held-Feindt, J. (2016). Stem cell markers in glioma progression and recurrence. Int. J. Oncol. *49*, 1899–1910.

Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev. *18*, 1926–1945.

He, X.-L., and Garcia, K.C. (2004). Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. Science *304*, 870–875.

Heddleston, J.M., Li, Z., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., and Rich, J.N. (2009). The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. Cell Cycle Georget. Tex *8*, 3274–3284.

Hempstead, B.L. (2002). The many faces of p75NTR. Curr. Opin. Neurobiol. *12*, 260–267.

BY-NC-ND

Hempstead, B.L. (2009). Commentary: Regulating proNGF action: multiple targets for therapeutic intervention. Neurotox. Res. *16*, 255–260.

Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F., and Chao, M.V. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. Nature *350*, 678–683.

Heppner, G.H. (1984). Tumor heterogeneity. Cancer Res. *44*, 2259–2265.

Hiddingh, L., Raktoe, R.S., Jeuken, J., Hulleman, E., Noske, D.P., Kaspers, G.J.L., Vandertop, W.P., Wesseling, P., and Wurdinger, T. (2014). Identification of temozolomide resistance factors in glioblastoma via integrative miRNA/mRNA regulatory network analysis. Sci. Rep. *4*, 5260.

Hjelmeland, A.B., Wu, Q., Heddleston, J.M., Choudhary, G.S., MacSwords, J., Lathia, J.D., McLendon, R., Lindner, D., Sloan, A., and Rich, J.N. (2011). Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. Cell Death Differ. *18*, 829–840.

Holmberg Olausson, K., Maire, C.L., Haidar, S., Ling, J., Learner, E., Nistér, M., and Ligon, K.L. (2014). Prominin-1 (CD133) Defines Both Stem and Non-Stem Cell Populations in CNS Development and Gliomas. PLoS ONE *9*.

Holmquist-Mengelbier, L., Fredlund, E., Löfstedt, T., Noguera, R., Navarro, S., Nilsson, H., Pietras, A., Vallon-Christersson, J., Borg, A., Gradin, K., et al. (2006). Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. Cancer Cell *10*, 413–423.

Holz, M.K. (2012). The role of S6K1 in ER-positive breast cancer. Cell Cycle Georget. Tex *11*, 3159–3165.

Hossain, A., Gumin, J., Gao, F., Figueroa, J., Shinojima, N., Takezaki, T., Priebe, W., Villarreal, D., Kang, S.-G., Joyce, C., et al. (2015). Mesenchymal Stem Cells Isolated From Human Gliomas Increase Proliferation and Maintain Stemness of Glioma Stem Cells Through the IL-6/gp130/STAT3 Pathway. Stem Cells Dayt. Ohio *33*, 2400–2415.

Hu, C.-J., Iyer, S., Sataur, A., Covello, K.L., Chodosh, L.A., and Simon, M.C. (2006). Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem cells. Mol. Cell. Biol. *26*, 3514–3526.

Hu, Y.-L., DeLay, M., Jahangiri, A., Molinaro, A.M., Rose, S.D., Carbonell, W.S., and Aghi, M.K. (2012). Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. Cancer Res. *72*, 1773–1783.

Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2003). Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. Annu. Rev. Biochem. *72*, 609–642.

Huang, J., and Brumell, J.H. (2014). Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. Nat. Rev. Microbiol. *12*, 101–114.

Huang, K., and Fingar, D.C. (2014). Growing knowledge of the mTOR signaling network. Semin. Cell Dev. Biol. *0*, 79–90.

Huang, Z., Cheng, L., Guryanova, O.A., Wu, Q., and Bao, S. (2010). Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting. Protein Cell *1*, 638–655.

BY-NC-ND

Huang, Z., Wu, T., Liu, A.Y., and Ouyang, G. (2015). Differentiation and transdifferentiation potentials of cancer stem cells. Oncotarget *6*, 39550–39563.

Huse, J.T., Diamond, E.L., Wang, L., and Rosenblum, M.K. (2015). Mixed glioma with molecular features of composite oligodendroglioma and astrocytoma: a true “oligoastrocytoma”? Acta Neuropathol. (Berl.) *129*, 151–153.

Igea, A., and Nebreda, A.R. (2015). The Stress Kinase p38α as a Target for Cancer Therapy. Cancer Res. *75*, 3997–4002.

Iliopoulos, D., Hirsch, H.A., Wang, G., and Struhl, K. (2011). Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 1397–1402.

Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. Cell *115*, 577–590.

Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D., and Perucho, M. (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature *363*, 558–561.

Ip, N.Y., Ibáñez, C.F., Nye, S.H., McClain, J., Jones, P.F., Gies, D.R., Belluscio, L., Le Beau, M.M., Espinosa, R., and Squinto, S.P. (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *89*, 3060–3064.

Iv Santaliz-Ruiz, L.E., Xie, X., Old, M., Teknos, T.N., and Pan, Q. (2014). Emerging role of nanog in tumorigenesis and cancer stem cells. Int. J. Cancer *135*, 2741–2748.

Iyer, R., Wehrmann, L., Golden, R.L., Naraparaju, K., Croucher, J.L., MacFarland, S.P., Guan, P., Kolla, V., Wei, G., Cam, N., et al. (2016). Entrectinib is a Potent Inhibitor of Trk-Driven Neuroblastomas in a Xenograft Mouse Model. Cancer Lett. *372*, 179–186.

Jaks, V., Barker, N., Kasper, M., van Es, J.H., Snippert, H.J., Clevers, H., and Toftgård, R. (2008). Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. Nat. Genet. *40*, 1291–1299.

Jawhari, S., Bessette, B., Hombourger, S., Durand, K., Lacroix, A., Labrousse, F., Jauberteau, M.-O., Ratinaud, M.-H., and Verdier, M. (2017). Autophagy and TrkC/NT-3 signaling joined forces boost the hypoxic glioblastoma cell survival. Carcinogenesis *38*, 592–603.

Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., and Chao, M. (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. Cell *47*, 545–554.

Jones, S.A., and Rose-John, S. (2002). The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. *1592*, 251–263.

Junttila, M.R., and de Sauvage, F.J. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. Nature *501*, 346–354.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J. *19*, 5720–5728.

BY-NC-ND

Kaminskyy, V., and Zhivotovsky, B. (2012). Proteases in autophagy. Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics *1824*, 44–50.

Kania, E., Pająk, B., O'Prey, J., Sierra Gonzalez, P., Litwiniuk, A., Urbańska, K., Ryan, K.M., and Orzechowski, A. (2017). Verapamil treatment induces cytoprotective autophagy by modulating cellular metabolism. FEBS J. *284*, 1370–1387.

Kaplan, D.R., Martin-Zanca, D., and Parada, L.F. (1991). Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. Nature *350*, 158–160.

Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2012). Chaperones in autophagy. Pharmacol. Res. *66*, 484–493.

Ke, Q., and Costa, M. (2006). Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). Mol. Pharmacol. *70*, 1469–1480.

Kilic, M., Kasperczyk, H., Fulda, S., and Debatin, K.-M. (2006). Role of hypoxia inducible factor-1 alpha in modulation of apoptosis resistance. Oncogene *26*, 1210008.

Kim, D.-H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Latek, R.R., Guntur, K.V.P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. Mol. Cell *11*, 895–904.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat. Cell Biol. *13*, 132–141.

Kim, M.S., Kim, G.M., Choi, Y.-J., Kim, H.J., Kim, Y.-J., and Jin, W. (2013). TrkC promotes survival and growth of leukemia cells through Akt-mTOR-dependent up-regulation of PLK-1 and Twist-1. Mol. Cells *36*, 177–184.

Kitange, G.J., Carlson, B.L., Schroeder, M.A., Grogan, P.T., Lamont, J.D., Decker, P.A., Wu, W., James, C.D., and Sarkaria, J.N. (2009). Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. Neuro-Oncol. *11*, 281–291.

Klein, R., Conway, D., Parada, L.F., and Barbacid, M. (1990). The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. Cell *61*, 647–656.

Klein, R., Nanduri, V., Jing, S.A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K.R., Reichardt, L.F., and Barbacid, M. (1991). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. Cell *66*, 395–403.

Klein, R., Lamballe, F., Bryant, S., and Barbacid, M. (1992). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. Neuron *8*, 947–956.

Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Autophagy *8*, 445–544.

Kohsaka, S., and Tanaka, S. (2013). Chemotherapeutic Agent for Glioma.

Korsching, S. (1993). The neurotrophic factor concept: a reexamination. J. Neurosci. *13*, 2739–2748.

BY-NC-ND

Koshkin, P.A., Chistiakov, D.A., and Chekhonin, V.P. (2013). Role of microRNAs in mechanisms of glioblastoma resistance to radio- and chemotherapy. Biochem. Biokhimiia *78*, 325–334.

Koustas, E., Karamouzis, M.V., Mihailidou, C., Schizas, D., and Papavassiliou, A.G. (2017). Co-targeting of EGFR and autophagy signaling is an emerging treatment strategy in metastatic colorectal cancer. Cancer Lett. *396*, 94–102.

Kraemer, B.R., Yoon, S.O., and Carter, B.D. (2014). The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor. Handb. Exp. Pharmacol. *220*, 121–164.

Kreso, A., and Dick, J.E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. Cell Stem Cell *14*, 275–291.

Krock, B.L., Skuli, N., and Simon, M.C. (2011). Hypoxia-Induced Angiogenesis. Genes Cancer *2*, 1117–1133.

Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. Mol. Cell *40*, 280–293.

Kwon, S.M., Kang, S.-H., Park, C.-K., Jung, S., Park, E.S., Lee, J.-S., Kim, S.-H., and Woo, H.G. (2015). Recurrent Glioblastomas Reveal Molecular Subtypes Associated with Mechanistic Implications of Drug-Resistance. PloS One *10*, e0140528.

Lai, K.O., Fu, W.Y., Ip, F.C., and Ip, N.Y. (1998). Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. Mol. Cell. Neurosci. *11*, 64–76.

Lamballe, F., Klein, R., and Barbacid, M. (1991). trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. Cell *66*, 967–979.

Lamballe, F., Tapley, P., and Barbacid, M. (1993). trkC encodes multiple neurotrophin-3 receptors with distinct biological properties and substrate specificities. EMBO J. *12*, 3083–3094.

Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., and Bruick, R.K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. Genes Dev. *16*, 1466–1471.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature *367*, 645–648.

Lathia, J.D., Mack, S.C., Mulkearns-Hubert, E.E., Valentim, C.L.L., and Rich, J.N. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. Genes Dev. *29*, 1203–1217.

Lautrette, C., Cardot, P.J.P., Vermot-Desroches, C., Wijdenes, J., Jauberteau, M.O., and Battu, S. (2003). Sedimentation field flow fractionation purification of immature neural cells from a human tumor neuroblastoma cell line. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. *791*, 149–160.

Lawn, S., Krishna, N., Pisklakova, A., Qu, X., Fenstermacher, D.A., Fournier, M., Vrionis, F.D., Tran, N., Chan, J.A., Kenchappa, R.S., et al. (2015). Neurotrophin Signaling via TrkB and TrkC Receptors Promotes the Growth of Brain Tumor-initiating Cells. J. Biol. Chem. *290*, 3814–3824.

BY-NC-ND

Lee, E.Y.H.P., and Muller, W.J. (2010). Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*.

Lee, G., Hall, R.R., and Ahmed, A.U. (2016). Cancer Stem Cells: Cellular Plasticity, Niche, and its Clinical Relevance. J. Stem Cell Res. Ther. *6*.

Lee, Y., Lee, H.-Y., and Gustafsson, Å.B. (2012). Regulation of Autophagy by Metabolic and Stress Signaling Pathways in the Heart. J. Cardiovasc. Pharmacol. *60*, 118–124.

Leushacke, M., and Barker, N. (2012). Lgr5 and Lgr6 as markers to study adult stem cell roles in self-renewal and cancer. Oncogene *31*, 3009–3022.

Levan, A., and Hauschka, T.S. (1953). Endomitotic reduplication mechanisms in ascites tumors of the mouse. J. Natl. Cancer Inst. *14*, 1–43.

Levi-Montalcini, R., and Hamburger, V. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. J. Exp. Zool. *116*, 321–361.

Lewin, G.R., and Barde, Y.A. (1996). Physiology of the neurotrophins. Annu. Rev. Neurosci. *19*, 289–317.

Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer Res. *67*, 1030–1037.

Li, C., Ito, H., Fujita, K., Shiwaku, H., Qi, Y., Tagawa, K., Tamura, T., and Okazawa, H. (2013a). Sox2 transcriptionally regulates PQBP1, an intellectual disability-microcephaly causative gene, in neural stem progenitor cells. PloS One *8*, e68627.

Li, W., Li, J., and Bao, J. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *69*, 1125–1136.

Li, X., Xu, Y., Chen, Y., Chen, S., Jia, X., Sun, T., Liu, Y., Li, X., Xiang, R., and Li, N. (2013b). SOX2 promotes tumor metastasis by stimulating epithelial-to-mesenchymal transition via regulation of WNT/β-catenin signal network. Cancer Lett. *336*, 379–389.

Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., et al. (2009). Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. Cancer Cell *15*, 501–513.

Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. Nature *402*, 672–676.

Ligon, K.L., Huillard, E., Mehta, S., Kesari, S., Liu, H., Alberta, J.A., Bachoo, R.M., Kane, M., Louis, D.N., Depinho, R.A., et al. (2007). Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. Neuron *53*, 503–517.

van Linde, M.E., Verhoeff, J.J.C., Richel, D.J., van Furth, W.R., Reijneveld, J.C., Verheul, H.M.W., and Stalpers, L.J.A. (2015). Bevacizumab in combination with radiotherapy and temozolomide for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. The Oncologist *20*, 107–108.

BY-NC-ND

Liu, A., Yu, X., and Liu, S. (2013a). Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. Chin. J. Cancer *32*, 483–487.

Liu, A., Hou, C., Chen, H., Zong, X., and Zong, P. (2016). Genetics and Epigenetics of Glioblastoma: Applications and Overall Incidence of IDH1 Mutation. Front. Oncol. *6*.

Liu, B., Chen, Q., Tian, D., Wu, L., Dong, H., Wang, J., Ji, B., Zhu, X., Cai, Q., Wang, L., et al. (2013b). BMP4 reverses multidrug resistance through modulation of BCL-2 and GDNF in glioblastoma. Brain Res. *1507*, 115–124.

Liu, F., Liu, D., Yang, Y., and Zhao, S. (2013c). Effect of autophagy inhibition on chemotherapy-induced apoptosis in A549 lung cancer cells. Oncol. Lett. *5*, 1261–1265.

Liu, W., Li, R., and Dou, K. (2011). Convenient and efficient enrichment of the CD133+ liver cells from rat fetal liver cells as a source of liver stem/progenitor cells. Stem Cell Rev. *7*, 94–102.

Liu, W., Wang, X., You, N., Tao, K., Wang, T., Tang, L., and Dou, K. (2012). Efficient Enrichment of Hepatic Cancer Stem-Like Cells from a Primary Rat HCC Model via a Density Gradient Centrifugation-Centered Method. PLoS ONE *7*.

Loeb, L.A., and Harris, C.C. (2008). Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. Cancer Res. *68*, 6863–6872.

Loeb, L.A., Springgate, C.F., and Battula, N. (1974). Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. Cancer Res. *34*, 2311–2321.

Lomonaco, S.L., Finniss, S., Xiang, C., Decarvalho, A., Umansky, F., Kalkanis, S.N., Mikkelsen, T., and Brodie, C. (2009). The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. Int. J. Cancer *125*, 717–722.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol. (Berl.) *114*, 97–109.

Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol. (Berl.) *131*, 803–820.

Lu, C., and Shervington, A. (2008). Chemoresistance in gliomas. Mol. Cell. Biochem. *312*, 71–80.

Ma, L., Wang, D.-D., Zhang, T.-Y., Yu, H., Wang, Y., Huang, S.-H., Lee, F.S., and Chen, Z.-Y. (2011). Region-specific involvement of BDNF secretion and synthesis in conditioned taste aversion memory formation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 2079–2090.

Makino, S. (1956). Further evidence favoring the concept of the stem cell in ascites tumors of rats. Ann. N. Y. Acad. Sci. *63*, 818–830.

Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., and Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. Nature *414*, 550–554.

BY-NC-ND

Mao, X.-G., Song, S.-J., Xue, X.-Y., Yan, M., Wang, L., Lin, W., Guo, G., and Zhang, X. (2013). LGR5 is a proneural factor and is regulated by OLIG2 in glioma stem-like cells. Cell. Mol. Neurobiol. *33*, 851–865.

Marquardt, J.U., Factor, V.M., and Thorgeirsson, S.S. (2010). Epigenetic regulation of cancer stem cells in liver cancer: Current concepts and clinical implications. J. Hepatol. *53*, 568–577.

Masoud, G.N., and Li, W. (2015). HIF-1α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. Acta Pharm. Sin. B *5*, 378–389.

Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C.M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S., and White, E. (2007). Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. Genes Dev. *21*, 1367–1381.

Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., et al. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. Nat. Cell Biol. *11*, 385–396.

Mauvezin, C., Nagy, P., Juhász, G., and Neufeld, T.P. (2015). Autophagosome–lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification. Nat. Commun. *6*.

Mazouffre, C., Geyl, S., Perraud, A., Blondy, S., Jauberteau, M.-O., Mathonnet, M., and Verdier, M. (2017). Dual inhibition of BDNF/TrkB and autophagy: a promising therapeutic approach for colorectal cancer. J. Cell. Mol. Med. *21*, 2610–2622.

Mazzoleni, S., Politi, L.S., Pala, M., Cominelli, M., Franzin, A., Sergi Sergi, L., Falini, A., De Palma, M., Bulfone, A., Poliani, P.L., et al. (2010). Epidermal growth factor receptor expression identifies functionally and molecularly distinct tumor-initiating cells in human glioblastoma multiforme and is required for gliomagenesis. Cancer Res. *70*, 7500–7513.

McNamara, C.R., and Degterev, A. (2011). Small-molecule inhibitors of the PI3K signaling network. Future Med. Chem. *3*, 549–565.

Meakin, S.O., and Shooter, E.M. (1991). Molecular investigations on the high-affinity nerve growth factor receptor. Neuron *6*, 153–163.

Meeker, R.B., and Williams, K.S. (2015). The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. Neural Regen. Res. *10*, 721–725.

Meléndez, A., and Levine, B. (2009). Autophagy in C. elegans. WormBook Online Rev. C Elegans Biol. 1–26.

Meley, D., Bauvy, C., Houben-Weerts, J.H.P.M., Dubbelhuis, P.F., Helmond, M.T.J., Codogno, P., and Meijer, A.J. (2006). AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. J. Biol. Chem. *281*, 34870–34879.

Mélin, C., Perraud, A., Akil, H., Jauberteau, M.-O., Cardot, P., Mathonnet, M., and Battu, S. (2012). Cancer stem cell sorting from colorectal cancer cell lines by sedimentation field flow fractionation. Anal. Chem. *84*, 1549–1556.

Mélin, C., Lacroix, A., Lalloué, F., Pothier, A., Zhang, L.Y., Perraud, A., Dalmay, C., Lautrette, C., Jauberteau, M.-O., Cardot, P., et al. (2013). Improved sedimentation field-flow fractionation separation channel for concentrated cellular elution. J. Chromatogr. A *1302*, 118–124.

BY-NC-ND

Mélin, C., Perraud, A., Bounaix Morand du Puch, C., Loum, E., Giraud, S., Cardot, P., Jauberteau, M.-O., Lautrette, C., Battu, S., and Mathonnet, M. (2014). Sedimentation field flow fractionation monitoring of in vitro enrichment in cancer stem cells by specific serum-free culture medium. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. *963*, 40–46.

Mendoza, M.C., Er, E.E., and Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. Trends Biochem. Sci. *36*, 320–328.

Menn, B., Timsit, S., Calothy, G., and Lamballe, F. (1998). Differential expression of TrkC catalytic and noncatalytic isoforms suggests that they act independently or in association. J. Comp. Neurol. *401*, 47–64.

Menn, B., Timsit, S., Represa, A., Mateos, S., Calothy, G., and Lamballe, F. (2000). Spatiotemporal expression of noncatalytic TrkC NC2 isoform during early and late CNS neurogenesis: a comparative study with TrkC catalytic and p75NTR receptors. Eur. J. Neurosci. *12*, 3211–3223.

Merlio, J.P., Ernfors, P., Jaber, M., and Persson, H. (1992). Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. Neuroscience *51*, 513–532.

Meyer, M., Reimand, J., Lan, X., Head, R., Zhu, X., Kushida, M., Bayani, J., Pressey, J.C., Lionel, A.C., Clarke, I.D., et al. (2015). Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 851–856.

Meyronet, D., Esteban-Mader, M., Bonnet, C., Joly, M.-O., Uro-Coste, E., Amiel-Benouaich, A., Forest, F., Rousselot-Denis, C., Burel-Vandenbos, F., Bourg, V., et al. (2017). Characteristics of H3 K27M-mutant gliomas in adults. Neuro-Oncol. *19*, 1127–1134.

Middlemas, D.S., Lindberg, R.A., and Hunter, T. (1991). trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. Mol. Cell. Biol. *11*, 143–153.

Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. Genes Dev. *21*, 2861–2873.

Molnár, J., Engi, H., Hohmann, J., Molnár, P., Deli, J., Wesolowska, O., Michalak, K., and Wang, Q. (2010). Reversal of multidrug resitance by natural substances from plants. Curr. Top. Med. Chem. *10*, 1757–1768.

Morrissy, A.S., Cavalli, F.M.G., Remke, M., Ramaswamy, V., Shih, D.J.H., Holgado, B.L., Farooq, H., Donovan, L.K., Garzia, L., Agnihotri, S., et al. (2017). Spatial heterogeneity in medulloblastoma. Nat. Genet. *49*, 780–788.

Mukherjee, A., Patel, B., Koga, H., Cuervo, A.M., and Jenny, A. (2016). Selective endosomal microautophagy is starvation-inducible in Drosophila. Autophagy *12*, 1984–1999.

Mullighan, C.G., Phillips, L.A., Su, X., Ma, J., Miller, C.B., Shurtleff, S.A., and Downing, J.R. (2008). Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. Science *322*, 1377–1380.

Munoz, J.L., Rodriguez-Cruz, V., Greco, S.J., Ramkissoon, S.H., Ligon, K.L., and Rameshwar, P. (2014). Temozolomide resistance in glioblastoma cells occurs partly through epidermal growth factor receptor-mediated induction of connexin 43. Cell Death Dis. *5*, e1145.

BY-NC-ND

Nakagawara, A., Liu, X.G., Ikegaki, N., White, P.S., Yamashiro, D.J., Nycum, L.M., Biegel, J.A., and Brodeur, G.M. (1995). Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). Genomics *25*, 538–546.

Nakata, S., Campos, B., Bageritz, J., Lorenzo Bermejo, J., Becker, N., Engel, F., Acker, T., Momma, S., Herold-Mende, C., Lichter, P., et al. (2013). LGR5 is a Marker of Poor Prognosis in Glioblastoma and is Required for Survival of Brain Cancer Stem-Like Cells. Brain Pathol. *23*, 60–72.

Naves, T., Jawhari, S., Jauberteau, M.-O., Ratinaud, M.-H., and Verdier, M. (2013). Autophagy takes place in mutated p53 neuroblastoma cells in response to hypoxia mimetic CoCl(2). Biochem. Pharmacol. *85*, 1153–1161.

Nedergaard, M., Ransom, B., and Goldman, S.A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. Trends Neurosci. *26*, 523–530.

Ng, F., and Tang, B.L. (2013). Sirtuins' modulation of autophagy. J. Cell. Physiol. *228*, 2262–2270.

Niibori-Nambu, A., Midorikawa, U., Mizuguchi, S., Hide, T., Nagai, M., Komohara, Y., Nagayama, M., Hirayama, M., Kobayashi, D., Tsubota, N., et al. (2013). Glioma Initiating Cells Form a Differentiation Niche Via the Induction of Extracellular Matrices and Integrin αV. PLoS ONE *8*.

Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., and Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. Nat. Rev. Neurosci. *10*, 9–22.

Norum, J.H., Bergström, Å., Andersson, A.B., Kuiper, R.V., Hoelzl, M.A., Sørlie, T., and Toftgård, R. (2015). A conditional transgenic mouse line for targeted expression of the stem cell marker LGR5. Dev. Biol. *404*, 35–48.

Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. Science *194*, 23–28.

Nykjaer, A., and Willnow, T.E. (2012). Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. Trends Neurosci. *35*, 261–270.

Ødegaard, E., Staff, A.C., Abeler, V.M., Kopolovic, J., Onsrud, M., Lazarovici, P., and Davidson, B. (2007). The activated nerve growth factor receptor p-TrkA is selectively expressed in advanced-stage ovarian carcinoma. Hum. Pathol. *38*, 140–146.

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *19*, 764–772.

Ohira, K., Kumanogoh, H., Sahara, Y., Homma, K.J., Hirai, H., Nakamura, S., and Hayashi, M. (2005). A truncated tropomyosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *25*, 1343–1353.

Ohsumi, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. Cell Res. *24*, 9–23.

Ojha, R., Bhattacharyya, S., and Singh, S.K. (2015). Autophagy in Cancer Stem Cells: A Potential Link Between Chemoresistance, Recurrence, and Metastasis. BioResearch Open Access *4*, 97–108.

BY-NC-ND

Oka, N., Soeda, A., Inagaki, A., Onodera, M., Maruyama, H., Hara, A., Kunisada, T., Mori, H., and Iwama, T. (2007). VEGF promotes tumorigenesis and angiogenesis of human glioblastoma stem cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *360*, 553–559.

Okazawa, H., Kamei, M., and Kanazawa, I. (1993). Molecular cloning and expression of a novel truncated form of chicken trkC. FEBS Lett. *329*, 171–177.

Oliver, L., Olivier, C., Marhuenda, F.B., Campone, M., and Vallette, F.M. (2009). Hypoxia and the malignant glioma microenvironment: regulation and implications for therapy. Curr. Mol. Pharmacol. *2*, 263–284.

Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*.

Orkin, S.H., Wang, J., Kim, J., Chu, J., Rao, S., Theunissen, T.W., Shen, X., and Levasseur, D.N. (2008). The transcriptional network controlling pluripotency in ES cells. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *73*, 195–202.

Palikaras, K., and Tavernarakis, N. (2014). Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. Exp. Gerontol. *56*, 182–188.

Park, I.-K., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2004). Bmi1, stem cells, and senescence regulation. J. Clin. Invest. *113*, 175–179.

Parzych, K.R., and Klionsky, D.J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. Antioxid. Redox Signal. *20*, 460–473.

Pasquier, B. (2016). Autophagy inhibitors. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *73*, 985–1001.

Patapoutian, A., and Reichardt, L.F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. Curr. Opin. Neurobiol. *11*, 272–280.

Paul, Y., Mondal, B., Patil, V., and Somasundaram, K. (2017). DNA methylation signatures for 2016 WHO classification subtypes of diffuse gliomas. Clin. Epigenetics *9*.

Persano, L., Rampazzo, E., Della Puppa, A., Pistollato, F., and Basso, G. (2011). The three-layer concentric model of glioblastoma: cancer stem cells, microenvironmental regulation, and therapeutic implications. ScientificWorldJournal *11*, 1829–1841.

Persano, L., Rampazzo, E., Basso, G., and Viola, G. (2013). Glioblastoma cancer stem cells: role of the microenvironment and therapeutic targeting. Biochem. Pharmacol. *85*, 612–622.

Pesce, M., and Schöler, H.R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. Stem Cells Dayt. Ohio *19*, 271–278.

Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., et al. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. Cancer Cell *9*, 157–173.

Piccirillo, S.G.M., Combi, R., Cajola, L., Patrizi, A., Redaelli, S., Bentivegna, A., Baronchelli, S., Maira, G., Pollo, B., Mangiola, A., et al. (2009). Distinct pools of cancer stem-like cells coexist within human glioblastomas and display different tumorigenicity and independent genomic evolution. Oncogene *28*, 1807–1811.

BY-NC-ND

Pistollato, F., Abbadi, S., Rampazzo, E., Persano, L., Della Puppa, A., Frasson, C., Sarto, E., Scienza, R., D'avella, D., and Basso, G. (2010). Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. Stem Cells Dayt. Ohio *28*, 851–862.

Poklepovic, A., and Gewirtz, D.A. (2014). Outcome of early clinical trials of the combination of hydroxychloroquine with chemotherapy in cancer. Autophagy *10*, 1478–1480.

Pollard, S.M., Yoshikawa, K., Clarke, I.D., Danovi, D., Stricker, S., Russell, R., Bayani, J., Head, R., Lee, M., Bernstein, M., et al. (2009). Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. Cell Stem Cell *4*, 568–580.

Presta, L.G., Chen, H., O'Connor, S.J., Chisholm, V., Meng, Y.G., Krummen, L., Winkler, M., and Ferrara, N. (1997). Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. Cancer Res. *57*, 4593–4599.

Proud, C.G. (2002). Regulation of mammalian translation factors by nutrients. Eur. J. Biochem. *269*, 5338–5349.

Puck, T.T., and Marcus, P.I. (1956). Action of x-rays on mammalian cells. J. Exp. Med. *103*, 653–666.

Rafehi, H., Orlowski, C., Georgiadis, G.T., Ververis, K., El-Osta, A., and Karagiannis, T.C. (2011). Clonogenic Assay: Adherent Cells. J. Vis. Exp. JoVE.

Rafieva, L.M., and Gasanov, E.V. (2016). Neurotrophin Propeptides: Biological Functions and Molecular Mechanisms. Curr. Protein Pept. Sci. *17*, 298–305.

Rajagopal, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., and Chao, M.V. (2004). Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 6650–6658.

Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G.B., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.-L., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L., and Ratcliffe, P.J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. Mol. Cell. Biol. *25*, 5675–5686.

Reichardt, L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. *361*, 1545–1564.

Reiling, J.H., and Sabatini, D.M. (2006). Stress and mTORture signaling. Oncogene *25*, 6373–6383.

Reitman, Z.J., Parsons, D.W., and Yan, H. (2010). IDH1 and IDH2: Not Your Typical Oncogenes. Cancer Cell *17*, 215–216.

Revest, J.-M., Le Roux, A., Roullot-Lacarrière, V., Kaouane, N., Vallée, M., Kasanetz, F., Rougé-Pont, F., Tronche, F., Desmedt, A., and Piazza, P.V. (2014). BDNF-TrkB signaling through Erk1/2 MAPK phosphorylation mediates the enhancement of fear memory induced by glucocorticoids. Mol. Psychiatry *19*, 1001–1009.

Rich, J.N., and Bao, S. (2007). Chemotherapy and cancer stem cells. Cell Stem Cell *1*, 353–355.

BY-NC-ND

Richichi, C., Osti, D., Del Bene, M., Fornasari, L., Patanè, M., Pollo, B., DiMeco, F., and Pelicci, G. (2016). Tumor-initiating cell frequency is relevant for glioblastoma aggressiveness. Oncotarget *7*, 71491–71503.

Rigau, V., Zouaoui, S., Mathieu-Daudé, H., Darlix, A., Maran, A., Trétarre, B., Bessaoud, F., Bauchet, F., Attaoua, R., Fabbro-Peray, P., et al. (2011). French brain tumor database: 5-year histological results on 25 756 cases. Brain Pathol. Zurich Switz. *21*, 633–644.

Rodriguez-Tebar, A., Dechant, G., and Barde, Y.-A. (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. Neuron *4*, 487–492.

Rosenfeld, M.R., Ye, X., Supko, J.G., Desideri, S., Grossman, S.A., Brem, S., Mikkelson, T., Wang, D., Chang, Y.C., Hu, J., et al. (2014). A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. Autophagy *10*, 1359–1368.

Roux, P.P., and Barker, P.A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. Prog. Neurobiol. *67*, 203–233.

Rowitch, D.H., and Kriegstein, A.R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. Nature *468*, 214–222.

Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C.C., Cannizzo, E.S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A.M., and Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. Dev. Cell *20*, 131–139.

Saijo, K., Crotti, A., and Glass, C.K. (2013). Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. Glia *61*, 104–111.

Salceda, S., and Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. J. Biol. Chem. *272*, 22642–22647.

Salmaggi, A., Duri, S., Silvani, A., Gaviani, P., Milanesi, I., Casali, C., and Di Meco, F. (2011). Loco-regional treatments in first-diagnosis glioblastoma: literature review on association between Stupp protocol and Gliadel. Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol. *32 Suppl 2*, S241-245.

Salvador, N., Aguado, C., Horst, M., and Knecht, E. (2000). Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. J. Biol. Chem. *275*, 27447–27456.

Sarkaria, J.N., Kitange, G.J., James, C.D., Plummer, R., Calvert, H., Weller, M., and Wick, W. (2008). Mechanisms of Chemoresistance in Malignant Glioma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *14*, 2900–2908.

Saxe, J.P., Tomilin, A., Schöler, H.R., Plath, K., and Huang, J. (2009). Post-translational regulation of Oct4 transcriptional activity. PloS One *4*, e4467.

Scarlatti, F., Maffei, R., Beau, I., Ghidoni, R., and Codogno, P. (2008). Non-canonical autophagy: an exception or an underestimated form of autophagy? Autophagy *4*, 1083–1085.

BY-NC-ND

Schaaf, M.B.E., Keulers, T.G., Vooijs, M.A., and Rouschop, K.M.A. (2016). LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *30*, 3961–3978.

Schnegg, C.I., Yang, M.H., Ghosh, S.K., and Hsu, M.-Y. (2015). Induction of Vasculogenic Mimicry Overrides VEGF-A Silencing and Enriches Stem-like Cancer Cells in Melanoma. Cancer Res. *75*, 1682–1690.

Schuijers, J., and Clevers, H. (2012). Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. EMBO J. *31*, 2685–2696.

Sehl, M.E., Shimada, M., Landeros, A., Lange, K., and Wicha, M.S. (2015). Modeling of Cancer Stem Cell State Transitions Predicts Therapeutic Response. PLoS ONE *10*.

Selvakumaran, M., Amaravadi, R.K., Vasilevskaya, I.A., and O'Dwyer, P.J. (2013). Autophagy inhibition sensitizes colon cancer cells to antiangiogenic and cytotoxic therapy. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *19*, 2995–3007.

Sengupta, S., Peterson, T.R., and Sabatini, D.M. (2010). Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. Mol. Cell *40*, 310–322.

Shah, Y.M., and Xie, L. (2014). Hypoxia-inducible factors link iron homeostasis and erythropoiesis. Gastroenterology *146*, 630–642.

Shelton, D.L., Sutherland, J., Gripp, J., Camerato, T., Armanini, M.P., Phillips, H.S., Carroll, K., Spencer, S.D., and Levinson, A.D. (1995). Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. J. Neurosci. *15*, 477–491.

Shi, L., Chen, J., Yang, J., Pan, T., Zhang, S., and Wang, Z. (2010). MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. Brain Res. *1352*, 255–264.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. Nature *432*, 396–401.

Skeldal, S., Sykes, A.M., Glerup, S., Matusica, D., Palstra, N., Autio, H., Boskovic, Z., Madsen, P., Castrén, E., Nykjaer, A., et al. (2012). Mapping of the Interaction Site between Sortilin and the p75 Neurotrophin Receptor Reveals a Regulatory Role for the Sortilin Intracellular Domain in p75 Neurotrophin Receptor Shedding and Apoptosis. J. Biol. Chem. *287*, 43798–43809.

Snuderl, M., Fazlollahi, L., Le, L.P., Nitta, M., Zhelyazkova, B.H., Davidson, C.J., Akhavanfard, S., Cahill, D.P., Aldape, K.D., Betensky, R.A., et al. (2011). Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. Cancer Cell *20*, 810–817.

Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol. (Berl.) *119*, 7–35.

Song, W.-S., Yang, Y.-P., Huang, C.-S., Lu, K.-H., Liu, W.-H., Wu, W.-W., Lee, Y.-Y., Lo, W.-L., Lee, S.-D., Chen, Y.-W., et al. (2016). Sox2, a stemness gene, regulates tumor-initiating and drug-resistant properties in CD133-positive glioblastoma stem cells. J. Chin. Med. Assoc. JCMA *79*, 538–545.

BY-NC-ND

Soppet, D., Escandon, E., Maragos, J., Middlemas, D.S., Reid, S.W., Blair, J., Burton, L.E., Stanton, B.R., Kaplan, D.R., Hunter, T., et al. (1991). The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. Cell *65*, 895–903.

Sparmann, A., and van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. Nat. Rev. Cancer *6*, 846–856.

Squinto, S.P., Stitt, T.N., Aldrich, T.H., Davis, S., Bianco, S.M., Radziejewski, C., Glass, D.J., Masiakowski, P., Furth, M.E., and Valenzuela, D.M. (1991). trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. Cell *65*, 885–893.

Stehelin, D., Guntaka, R.V., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1976). Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. J. Mol. Biol. *101*, 349–365.

Stoilov, P., Castren, E., and Stamm, S. (2002). Analysis of the Human TrkB Gene Genomic Organization Reveals Novel TrkB Isoforms, Unusual Gene Length, and Splicing Mechanism. Biochem. Biophys. Res. Commun. *290*, 1054–1065.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N. Engl. J. Med. *352*, 987–996.

Su, H., Seimbille, Y., Ferl, G., Bodenstein, C., Füger, B., Kim, K., Hsu, Y.-T., M Dubinett, S., E Phelps, M., Czernin, J., et al. (2008). Evaluation of [F-18]gefitinib as a molecular imaging probe for the assessment of the epidermal growth factor receptor status in malignant tumors. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging *35*, 1089–1099.

Sui, X., Kong, N., Ye, L., Han, W., Zhou, J., Zhang, Q., He, C., and Pan, H. (2014). p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. Cancer Lett. *344*, 174–179.

Sun, X.-L., Chen, B.-Y., Xia, Y., Wang, J.-J., and Chen, L.-W. (2013). Functional switch from pro-neurotrophins to mature neurotrophins. Curr. Protein Pept. Sci. *14*, 617–625.

Suzuki, S., Terauchi, M., Umezu, T., Kajiyama, H., Shibata, K., Nawa, A., and Kikkawa, F. (2010). Identification and characterization of cancer stem cells in ovarian yolk sac tumors. Cancer Sci. *101*, 2179–2185.

Svenning, S., and Johansen, T. (2013). Selective autophagy. Essays Biochem. *55*, 79–92.

Tacconelli, A., Farina, A.R., Cappabianca, L., Desantis, G., Tessitore, A., Vetuschi, A., Sferra, R., Rucci, N., Argenti, B., Screpanti, I., et al. (2004). TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. Cancer Cell *6*, 347–360.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell *126*, 663–676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell *131*, 861–872.

BY-NC-ND

Tang, J., Di, J., Cao, H., Bai, J., and Zheng, J. (2015). p53-mediated autophagic regulation: A prospective strategy for cancer therapy. Cancer Lett. *363*, 101–107.

Tanida, I. (2011). Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. Antioxid. Redox Signal. *14*, 2201–2214.

Taranova, O.V., Magness, S.T., Fagan, B.M., Wu, Y., Surzenko, N., Hutton, S.R., and Pevny, L.H. (2006). SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. Genes Dev. *20*, 1187–1202.

Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, C., Harper, F., et al. (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. Nat. Cell Biol. *10*, 676–687.

Taylor, J.W., and Schiff, D. (2015). Treatment considerations for MGMT-unmethylated glioblastoma. Curr. Neurol. Neurosci. Rep. *15*, 507.

Tessarollo, L. (1998). Pleiotropic Functions of Neurotrophins in Development. Cytokine Growth Factor Rev. *9*, 125–137.

Thakkar, J.P., Dolecek, T.A., Horbinski, C., Ostrom, Q.T., Lightner, D.D., Barnholtz-Sloan, J.S., and Villano, J.L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol. *23*, 1985–1996.

Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat. Rev. Cancer *2*, 442–454.

Thiyagarajan, V., Sivalingam, K.S., Viswanadha, V.P., and Weng, C.-F. (2016). 16-hydroxy-cleroda-3,13-dien-16,15-olide induced glioma cell autophagy via ROS generation and activation of p38 MAPK and ERK-1/2. Environ. Toxicol. Pharmacol. *45*, 202–211.

Trocoli, A., and Djavaheri-Mergny, M. (2011). The complex interplay between autophagy and NF-κB signaling pathways in cancer cells. Am. J. Cancer Res. *1*, 629–649.

Tsoulfas, P., Soppet, D., Escandon, E., Tessarollo, L., Mendoza-Ramirez, J.-L., Rosenthal, A., Nikolics, K., and Parada, L.F. (1993). The rat trkC locus encodes multiple neurogenic receptors that exhibit differential response to neurotrophin-3 in PC12 cells. Neuron *10*, 975–990.

Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S., and Barres, B.A. (2001). Control of synapse number by glia. Science *291*, 657–661.

Urfer, R., Tsoulfas, P., O'Connell, L., Shelton, D.L., Parada, L.F., and Presta, L.G. (1995). An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. EMBO J. *14*, 2795–2805.

Vaegter, C.B., Jansen, P., Fjorback, A.W., Glerup, S., Skeldal, S., Richner, M., Erdmann, B., Nyengaard, J.R., Tessarollo, L., Lewin, G.R., et al. (2011). Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and signaling by neurotrophins. Nat. Neurosci. *14*.

Vakifahmetoglu-Norberg, H., Xia, H., and Yuan, J. (2015). Pharmacologic agents targeting autophagy. J. Clin. Invest. *125*, 5–13.

BY-NC-ND

Van der Flier, L.G., Sabates-Bellver, J., Oving, I., Haegebarth, A., De Palo, M., Anti, M., Van Gijn, M.E., Suijkerbuijk, S., Van de Wetering, M., Marra, G., et al. (2007). The Intestinal Wnt/TCF Signature. Gastroenterology *132*, 628–632.

Vaupel, P., Kelleher, D.K., and Höckel, M. (2001). Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. Semin. Oncol. *28*, 29–35.

Velikkakath, A.K.G., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N., and Mizushima, N. (2012). Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. Mol. Biol. Cell *23*, 896–909.

Vencken, S.F., Sethupathy, P., Blackshields, G., Spillane, C., Elbaruni, S., Sheils, O., Gallagher, M.F., and O'Leary, J.J. (2014). An integrated analysis of the SOX2 microRNA response program in human pluripotent and nullipotent stem cell lines. BMC Genomics *15*, 711.

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell *17*, 98–110.

Vermeulen, L., Melo, F. de S. e, Richel, D.J., and Medema, J.P. (2012). The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. Lancet Oncol. *13*, e83–e89.

Vicencio, J.M., Galluzzi, L., Tajeddine, N., Ortiz, C., Criollo, A., Tasdemir, E., Morselli, E., Ben Younes, A., Maiuri, M.C., Lavandero, S., et al. (2008). Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. Gerontology *54*, 92–99.

Vitale, I., Manic, G., Dandrea, V., and De Maria, R. (2015). Role of autophagy in the maintenance and function of cancer stem cells. Int. J. Dev. Biol. *59*, 95–108.

de Vries, N.A., Buckle, T., Zhao, J., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M., and van Tellingen, O. (2012). Restricted brain penetration of the tyrosine kinase inhibitor erlotinib due to the drug transporters P-gp and BCRP. Invest. New Drugs *30*, 443–449.

Walker, D.G., and Lue, L.-F. (2015). Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. Alzheimers Res. Ther. *7*, 56.

Wang, Y.-J., and Herlyn, M. (2015). The emerging roles of Oct4 in tumor-initiating cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *309*, C709-718.

WANG, D., ZHOU, J., FAN, C., JIAO, F., LIU, B., SUN, P., MIAO, J., and ZHANG, Q. (2014). Knockdown of LGR5 suppresses the proliferation of glioma cells in vitro and in vivo. Oncol. Rep. *31*, 41–49.

Wang, G., Wang, J.-J., Fu, X.-L., Guang, R., and To, S.-S.T. (2017). Advances in the targeting of HIF-1α and future therapeutic strategies for glioblastoma multiforme (Review). Oncol. Rep. *37*, 657–670.

Wang, P., Gao, Q., Suo, Z., Munthe, E., Solberg, S., Ma, L., Wang, M., Westerdaal, N.A.C., Kvalheim, G., and Gaudernack, G. (2013). Identification and characterization of cells with cancer stem cell properties in human primary lung cancer cell lines. PloS One *8*, e57020.

BY-NC-ND

Ward, P.S., Patel, J., Wise, D.R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B.D., Coller, H.A., Cross, J.R., Fantin, V.R., Hedvat, C.V., Perl, A.E., et al. (2010). The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. Cancer Cell *17*, 225–234.

Watson, F.L., Porcionatto, M.A., Bhattacharyya, A., Stiles, C.D., and Segal, R.A. (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. J. Neurobiol. *39*, 323–336.

Webber, J.L., and Tooze, S.A. (2010). Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. EMBO J. *29*, 27–40.

White, E. (2015). The role for autophagy in cancer. J. Clin. Invest. *125*, 42–46.

Wong, O.G.W., and Cheung, A.N.Y. (2016). Stem cell transcription factor NANOG in cancers--is eternal youth a curse? Expert Opin. Ther. Targets *20*, 407–417.

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., and Greenberg, M.E. (1995). Opposing Effects of ERK and JNK-p38 MAP Kinases on Apoptosis. Science *270*, 1326–1331.

Xie, X., Piao, L., Cavey, G.S., Old, M., Teknos, T.N., Mapp, A.K., and Pan, Q. (2014). Phosphorylation of Nanog is essential to regulate Bmi1 and promote tumorigenesis. Oncogene *33*, 2040–2052.

Xiong, J., Zhou, L., Lim, Y., Yang, M., Zhu, Y.-H., Li, Z.-W., Zhou, F.H., Xiao, Z.-C., and Zhou, X.-F. (2013). Mature BDNF promotes the growth of glioma cells in vitro. Oncol. Rep. *30*, 2719–2724.

Xu, L., Pathak, P.S., and Fukumura, D. (2004). Hypoxia-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathways contributes to expression of interleukin 8 in human ovarian carcinoma cells. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *10*, 701–707.

Xu, L., Zhang, X., Li, Y., Lu, S., Lu, S., Li, J., Wang, Y., Tian, X., Wei, J.-J., Shao, C., et al. (2016). Neferine induces autophagy of human ovarian cancer cells via p38 MAPK/ JNK activation. Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med. *37*, 8721–8729.

Yan, K.S., Chia, L.A., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J.Y., Su, N., Luo, Y., Heilshorn, S.C., Amieva, M.R., et al. (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 466–471.

Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. Curr. Opin. Cell Biol. *22*, 124–131.

Yang, A., Rajeshkumar, N.V., Wang, X., Yabuuchi, S., Alexander, B.M., Chu, G.C., Von Hoff, D.D., Maitra, A., and Kimmelman, A.C. (2014). Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations. Cancer Discov. *4*, 905–913.

Yang, L., Lin, C., Wang, L., Guo, H., and Wang, X. (2012). Hypoxia and hypoxia-inducible factors in glioblastoma multiforme progression and therapeutic implications. Exp. Cell Res. *318*, 2417–2426.

Ye, F., Zhang, Y., Liu, Y., Yamada, K., Tso, J.L., Menjivar, J.C., Tian, J.Y., Yong, W.H., Schaue, D., Mischel, P.S., et al. (2013). Protective properties of radio-chemoresistant glioblastoma stem cell clones are associated with metabolic adaptation to reduced glucose dependence. PloS One *8*, e80397.

BY-NC-ND

Ye, J., Wu, D., Wu, P., Chen, Z., and Huang, J. (2014). The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment. Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med. *35*, 3945–3951.

Yeo, C.J. (1999). Tumor suppressor genes: A short review. Surgery *125*, 363–366.

Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., and Buck, D.W. (1997). AC133, a Novel Marker for Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. Blood *90*, 5002–5012.

Yin, X., Zhang, B.-H., Zheng, S.-S., Gao, D.-M., Qiu, S.-J., Wu, W.-Z., and Ren, Z.-G. (2015). Coexpression of gene Oct4 and Nanog initiates stem cell characteristics in hepatocellular carcinoma and promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of Stat3/Snail signaling. J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol *8*.

Yoshii, A., and Constantine-Paton, M. (2010). Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. Dev. Neurobiol. *70*, 304–322.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science *318*, 1917–1920.

Zaffagnini, G., and Martens, S. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy. J. Mol. Biol. *428*, 1714–1724.

Zangrossi, S., Marabese, M., Broggini, M., Giordano, R., D'Erasmo, M., Montelatici, E., Intini, D., Neri, A., Pesce, M., Rebulla, P., et al. (2007). Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. Stem Cells Dayt. Ohio *25*, 1675–1680.

Zeng, T., Cui, D., and Gao, L. (2015). Glioma: an overview of current classifications, characteristics, molecular biology and target therapies. Front. Biosci. Landmark Ed. *20*, 1104–1115.

Zhang, S.C. (2001). Defining glial cells during CNS development. Nat. Rev. Neurosci. *2*, 840–843.

Zhang, J., Stevens, M.F.G., Laughton, C.A., Madhusudan, S., and Bradshaw, T.D. (2010). Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: molecular mechanisms and potential translational applications. Oncology *78*, 103–114.

Zhang, J., Stevens, M.F.G., and Bradshaw, T.D. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. Curr. Mol. Pharmacol. *5*, 102–114.

Zhou, J., Li, G., Zheng, Y., Shen, H.-M., Hu, X., Ming, Q.-L., Huang, C., Li, P., and Gao, N. (2015). A novel autophagy/mitophagy inhibitor liensinine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy through DNM1L-mediated mitochondrial fission. Autophagy *11*, 1259–1279.

Zhou, X., Wang, L., Hasegawa, H., Amin, P., Han, B.-X., Kaneko, S., He, Y., and Wang, F. (2010). Deletion of PIK3C3/Vps34 in sensory neurons causes rapid neurodegeneration by disrupting the endosomal but not the autophagic pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 9424–9429.

Zinzi, L., Contino, M., Cantore, M., Capparelli, E., Leopoldo, M., and Colabufo, N.A. (2014). ABC transporters in CSCs membranes as a novel target for treating tumor relapse. Front. Pharmacol. *5*, 163.

BY-NC-ND

Zou, Y., Wang, Q., Li, B., Xie, B., and Wang, W. (2014). Temozolomide induces autophagy via ATM-AMPK-ULK1 pathways in glioma. Mol. Med. Rep. *10*, 411–416.

Zuchero, J.B., and Barres, B.A. (2015). Glia in mammalian development and disease. Dev. Camb. Engl. *142*, 3805–3809.

Early History of Cancer | American Cancer Society.

Ligue contre le cancer | Association de lutte contre le Cancer.

BY-NC-ND

Résumé

Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur cérébrale primaire la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte. Malgré un traitement associant radiothérapie et chimiothérapie, la récidive est quasi systématique du fait de la résistance des cellules tumorales. En effet, elles peuvent détourner des mécanismes de survie, comme l'autophagie, qui est amplifiée lorsque la disponibilité en oxygène est réduite. De la même manière, la signalisation des facteurs de croissance, comme celle des neurotrophines, est détournée de sorte à favoriser la survie cellulaire. Ces deux mécanismes sont connus pour être associés à une population de cellules tumorales particulières, les cellules souches cancéreuses (CSC), identifiées comme participant à la résistance aux traitements du GBM et à la récidive. Elles sont en effet peu sensibles à la radiothérapie et à la chimiothérapie et sont capables de reformer une tumeur. Nous avons ciblé deux objectifs principaux : i) identifier le rôle de l'autophagie et de la signalisation neurotrophique passant par TrkC dans la survie des cellules de GBM soumises à un stress hypoxique, ii) étudier l'implication de ces deux mécanismes dans la mise en place et le maintien d'un compartiment de CSC au sein de la tumeur. Nos travaux (réalisés sur quatre lignées cellulaires de GBM) ont montré que l'autophagie et la signalisation TrkC sont activées en cas de stress hypoxique court (< 24h). De plus, il existe une compensation entre ces deux voies de survie lorsque l'une ou l'autre est déficiente. Nous avons également pu mettre en évidence que la perte de l'une des voies modifie le phénotype de la population des CSC, que ce soit au niveau fonctionnel (prolifération, résistance au Témozolomide) ou au niveau de l'expression des marqueurs de cellules souches. Ainsi l'invalidation de ces voies de survie pourrait influencer l'état plutôt activé ou plutôt quiescent des CSC, ce qui modifie leur résistance au traitement. Cette capacité d'adaptation des CSC souligne l'aspect dynamique de ce compartiment dans le GBM.

Mots clés : Glioblastome, Cellules Souches Cancéreuses, Autophagie, Neurotrophines, Résistance, Chimiothérapie