

Université de Montréal

Ciblage du glioblastome multiforme par les inhibiteurs de BMI1

Par

Patrick Nkanza Makala

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

En vue de l'obtention du grade de maîtrise en science (Msc)

En Biologie Moléculaire

7 mars 2019

© Patrick Nkanza Makala, 2019

Résumé

Le glioblastome multiforme (GBM) est le cancer primitif le plus fréquent et le plus agressif du système nerveux central (SNC). Il présente une survie médiane de 12 à 15 mois malgré le traitement classique combinant l'exérèse chirurgicale à la chimiothérapie au témozolomide et à la radiothérapie. Il peut être secondaire à la transformation des tumeurs bénignes du SNC ou se former de novo à partir des cellules souches neurales et des cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes) transformées en cellules souches cancéreuses suite à des mutations intéressant plusieurs gènes dont EGFR, PTEN, MDM2, IDH1/2 et des gènes suppresseurs des tumeurs (TP53 et Rb). Ces cellules souches cancéreuses du GBM sont de type mésenchymateux ou proneural exprimant les marqueurs CD133+ et Sox2. Les études antérieures ayant montré que les cellules souches cancéreuses du GBM sont capables de reformer la tumeur initiale in vivo ainsi que de résister à la chimiothérapie et à la radiothérapie suite à leur enrichissement en protéine BMI1, le ciblage de cette protéine globalement enrichie dans le GBM pourrait induire l'involution tumorale et améliorer la survie des personnes touchées par cette maladie. L'objectif de cette étude est de tester deux inhibiteurs pharmacologiques de BMI1 (PTC596 et A1016) sur le Glioblastome multiforme afin d'améliorer la survie des patients. Après traitement au PTC596 et A1016 des souris immunodéficientes ayant des manifestations neurologiques après greffe intracrânienne des cellules souches cancéreuses CD133+ du GBM, nous avons obtenu le résultat qui suggère que ces inhibiteurs pharmacologiques de BMI1 améliorent la survie médiane de souris (27 à 46 jours) par rapport aux souris non traitées (5 à 6,5 jours) et réduisent fortement le volume tumoral. In vitro, ils réduisent la croissance des cellules souches cancéreuses du GBM. Cependant, ils sont susceptibles d'induire un changement phénotypique dans certains glioblastomes récidivants, faisant évoquer une transition épithélio-mésenchymateuse.

Mots-clés : glioblastome, cellule souche cancéreuse du glioblastome, BMI1, A1016, PTC596

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and most aggressive primary cancer of the central nervous system (CNS). It has a median survival of 12 to 15 months despite conventional treatment combining surgical excision, chemotherapy, temozolomide and radiotherapy. It can be secondary to the transformation of benign CNS tumors. It can also be formed immediately from neural stem cells and glial cells (astrocytes and oligodendrocytes) that has been transformed into cancer stem cells following mutations involving several genes such as EGFR, PTEN, MDM2, IDH1 / 2 and tumor suppressor genes (TP53 and Rb). These GBM cancer stem cells are mesenchymal or proneural cell type, expressing CD133 + and Sox2 markers. Previous studies have shown that GBM cancer stem cells are capable of reforming the initial tumor in vivo as well as resisting chemotherapy and radiotherapy following their enrichment in BMI1 protein, targeting this globally enriched protein in the GBM could induce tumor involution and improve the survival of people affected by this disease. The aim of this study is to test two pharmacological inhibitors of BMI1 (PTC596 and A1016) on Glioblastoma multiforme in order to improve patient survival. After treatment with PTC596 and A1016 immunodeficient mice with neurological manifestations after intracranial grafting of GBM CD133 + cancer stem cells, we obtained the result which suggests that these pharmacological inhibitors of BMI1 improve the median survival of mice (27 to 46 days) by compared to untreated mice (5 to 6.5 days) and strongly reduce tumor volume. In vitro, they reduce the growth of GBM cancer stem cells. However, they are likely to induce a phenotypic change in some relapsing glioblastomas, suggesting an epithelio-mesenchymal transition.

Keywords: glioblastoma, glioblastoma cancer stem cell, BMI1, A1016, PTC596

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Liste des figures.....	v
Liste des abréviations et de sigles.....	vi
Remerciements	x
Recension des écrits sur le glioblastome	1
1.1 Définition.....	1
1.2 Epidémiologie.....	1
1.3 Etiologie.....	1
1.4 Pathogénie.....	2
1.5 Formation de l'encéphale.....	5
1.5.1 Neurogenèse embryonnaire	5
1.5.2 Neurogenèse adulte.....	8
1.6 Le GBM et cellules souches cancéreuse du Glioblastome	10
1.6.1 Origine du glioblastome multiforme.....	10
1.6.2 Origines des cellules souches cancéreuses du glioblastome multiforme	12
1.6.3 Propriétés des cellules souches cancéreuses du GBM	13
1.6.4 Mécanisme d'action de BMI1	14
1.6.5 Le rôle de BMI1 dans le glioblastome multiforme.....	17
1.7 Histologie du GBM.....	18
1.8 Caractéristiques de la barrière hémato-encéphalique dans le glioblastome.....	18
1.9 Diagnostic	19
1.10 Traitement.....	20
1.10.1 Traitement chirurgical	20
1.10.2 Traitement adjuvant.....	20
Hypothèse et objectifs	22
Matériel et méthodes	24
Résultats	29
Discussion.....	46
Conclusion.....	51
Perspectives	51

Références	53
------------------	----

Liste des figures

Figure 1. Neurulation chez l'embryon humain.....	4
Figure 2. La localisation des structures embryonnaires du télencéphale, vu en coupe.	6
Figure 3. Progression de la neurogenèse de l'embryon à l'adulte.....	7
Figure 4. Rôle de la signalisation Notch dans le maintien de la pluripotence des cellules souches neurales.	9
Figure 5. Modèle stochastique de formation du glioblastome.	10
Figure 6. Modèle hiérarchique de formation du glioblastome.	11
Figure 7. Origines de cellules souches cancéreuses du glioblastome.....	12
Figure 8. Mécanisme d'action de BMI1.....	15
Figure 9. Mécanisme d'action de BMI1 dans les cellules cancéreuses du GBM.....	16
Figure 10. Traitement in vitro des cellules cancéreuses du GBM aux PTC596 et A1016... 30	
Figure 11. Diagramme de Kaplan-Meier de la survie des souris traitées aux PTC596 et A1016 après greffe intracrânienne des cellules souches cancéreuses du GBM.....	31
Figure 12. Formation du glioblastome dans le cerveau de souris à partir des cellules souches cancéreuses du GBM humain.	32
Figure 13. Estimation du volume tumoral dans le cerveau des souris greffées et traitées au PTC596.....	34
Figure 14. Evaluation de BMI1, EZH2 et de la prolifération cellulaire dans le modèle murin de GBM traité avec les inhibiteurs de BMI1.....	37
Figure 15 Identification des cellules souches cancéreuses du GBM par l'immuno-marquage de sox2 sur des sections cérébrales des souris ayant reçu la greffe intracrânienne des cellules souches cancéreuses du GBM.	41
Figure 16. Western blot des neurones humains traités avec les inhibiteurs de BMI1 (PTC596 et A1016 50 nM).....	43
Figure 17. Quantification de BMI1 et EZH2 par western blot sur des 293FT traités avec un inhibiteur de BMI1 et/ou inhibiteur du protéasome.	44

Liste des abréviations et de sigles

ADAM: α -disintegrin and metalloproteinase

ADN: Acide désoxyribonucléique

Akt : protéine kinase B

BMI1: B cell-specific moloney murine leukaemia virus interaction site1

BMP-4: bone morphogenic protein 4

BrdU : Bromodeoxyuridine

CCPA: Conseil canadien de protection des animaux

Cdk1: cyclin-dependent kinase 1

cDNA : ADN complémentaire

CSG: cellule souche cancéreuse du glioblastome

CSN: cellule souche neurale

DAB: 3,3'-diaminobenzidine

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EGF: Epidermal growth factor

EGFR: Epithelial growth factor receptor

Erk: Extracellular signal-regulated kinase

EZH2: Enhancer of zeste homolog 2

FGF: fibroblast growth factor

FGF: Fibroblast growth factor

GBM: Glioblastome multiforme

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

HBSS: Hank's buffered salt solution

HIF1: Hypoxia-inducible factor 1

HPMC: Hydroxypropylméthylcellulose

IDH: Isocitrate déshydrogénase

IHC: Immunohistochimie

IRM: imagerie par resonance magnétique

LGE: Lateral ganglionic eminence

MAML: Mastermind-like proteins

Mash1: mammalian achaete scute homolog-1

MATH: meprin-associated Traf homology

MDM: Murine double minute

MGE: Medial ganglionic eminence

NEAA: Non-essential aminoacid

Ngn2: neurogénine2

NICD: Notch intracellular domain

NOD/SCID: Non-obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency

OMS : Organisation mondiale de la santé

PDGFRA: platelet-derived growth factor receptor alpha

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PRC: Polycomb repressive complexe

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

Rb: Retinoblastoma protein

RBPj: Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa j region

Sox2: sex determining region Y-box containing gene 2

SVZ: subventricular zone

TBS-T: Tris buffer saline-tween

TGF: Transforming growth factor

TMZ: Témazolomide

P53: Tumor protein 53

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VL: ventricule lateral

VZ: ventricular zone

A ma mère Louise Pangi Nkanza

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Gilbert Bernier, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, m'avoir encadré et confié un projet pertinent. Je remercie également mes collègues de laboratoire et les autres chercheurs pour leurs conseils et leur contribution dans mon apprentissage sur le plan théorique et technique, particulièrement à Roy Hanna, Andrea Barabino, Rimi Hamam, Boris Tripier, Dr Anthony Flamier et Dr Mohamed Abdouh.

Merci au Programme Canadien de bourses de la francophonie (PCBF), plus particulièrement à Tony Toufic, Marie-Eve Plante et à Diane pour les conseils et le soutien financier.

Enfin, je remercie grandement mon pays, la République Démocratique du Congo pour avoir établi un partenariat avec le gouvernement canadien afin de contribuer à l'amélioration de mes connaissances et compétences.

Recension des écrits sur le glioblastome

1.1 Définition

Le GBM est le cancer primitif du système nerveux central, il s'agit d'un gliome de stade IV selon la Classification de l'OMS. Cette tumeur se forme à partir des cellules gliales du système nerveux central notamment les astrocytes, les oligodendrocytes. Il est le plus fréquent et le plus invasif des tumeurs cérébrales (1, 2).

1.2 Epidémiologie

Son incidence varie selon les pays, elle est de 2 cas pour 100000 habitants/an en Finlande, de 4 cas pour 100000 habitants/an en France et aux Etats-Unis, de 3 à 7 cas pour 100000 habitants/an en Belgique (1, 3, 4, 5). L'avènement de l'imagerie par résonance magnétique (IRM), du scanner et la réalisation des biopsies favorisées par des progrès de la neurochirurgie semble expliquer l'accroissement annuel de cette incidence jusqu'à 1% (6).

Cette tumeur est rare chez l'enfant, elle se développe entre 40 et 70 ans avec un âge moyen de 61,9 ans et une médiane de 63 ans, l'homme est légèrement plus touché par rapport à la femme avec un ratio de 1,5 à 1,8/1 (1, 5, 6). On observe un pic de fréquence de 65 ans et de 40 à 60 ans respectivement pour les GBM de novo et les GBM secondaires (7)

Malgré les moyens thérapeutiques existants (Exérèse, chimiothérapie et radiothérapie), le pronostic reste mauvais et la survie médiane est de 12 à 15 mois (8, 9, 10-12, 13)

1.3 Etiologie

Le GBM reste une maladie de cause inconnue depuis des décennies. De nombreux facteurs de risque prédisposent à l'apparition de la tumeur. Il s'agit des facteurs environnementaux, des agents chimiques, des facteurs génétiques et de l'âge (4,14).

Sur le plan environnemental, l'exposition aux radiations ionisantes est le principal facteur, la tumeur apparaît plusieurs années après l'exposition du système nerveux central à de dose importante de ces radiations.

Parmi les agents chimiques, nous pouvons citer le chlorure de vinyle, certains métaux comme le mercure, le plomb, l'arsenic) et les hydrocarbures dérivés du pétrole.

Sur le plan génétique, certains syndromes héréditaires prédisposent au glioblastome. C'est le cas du syndrome de Li-Fraumeni, du syndrome de Turcot, Neurofibromatose de type I ou maladie de Recklinghausen, tuberous sclerosis (15,16). Le glioblastome est aussi observé dans le syndrome de Li-Fraumeni like, une variante très proche du syndrome de Li-Fraumeni classique (17, 18)

A l'instar des gliomes de bas grade, le glioblastome peut présenter dans la moitié de cas, une trisomie 7 correspondant au gain du 7q (19), les mutations des gènes TP53, IDH1/2, PDGFRA et de son ligand. En outre, les mutations activatrices des gènes de l'EGFR, MDM2, MDM4, la mutation de PTEN et la délétion du gène Rb1 sont particulièrement rencontrées dans le glioblastome multiforme (20-25).

Cependant, le glioblastome primaire ou de novo présente des caractéristiques génétiques qui diffèrent de celles du glioblastome secondaire. Les mutations de l'EGFR, de PTEN et de MDM2/4 sont plus fréquentes dans la forme de novo alors que les aberrations de P53 et de l>IDH1/2 sont les plus rencontrées dans le glioblastome secondaire (24).

Par ailleurs, bien que le glioblastome de l'adulte soit histologiquement identique à celui de l'enfant (26-29), ils présentent des caractéristiques génétiques différentes, notamment une surexpression du récepteur EGFR et des mutations plus fréquentes de l>IDH1/2 (28-31). Les mutations du gène suppresseur de tumeur TP53 sont rencontrées dans la majorité de glioblastome de l'enfant de plus de 3 ans (32).

1.4 Pathogénie

Après la découverte des cellules souches à l'origine des leucémies myéloïdes par FIALKOW, DENMAN, JACOBSON et al. en 1978, des études similaires ont par la suite été menées sur d'autres cancers dont le glioblastome et deux hypothèses étaient émises quant à l'origine du glioblastome.

- La cancérisation des cellules souches neurales normales
- La transformation maligne des astrocytes ou des oligodendrocytes

Ainsi, la compréhension de la formation du système nerveux central permet de bien cerner l'origine du glioblastome.

Le système nerveux central, composé de l'encéphale (cerveau et cervelet) et de la moelle épinière, est un centre d'intégration et de réponses adaptées aux informations provenant de l'organisme et de l'environnement qui lui sont acheminées par le système nerveux périphérique. Sa formation débute à la 3^{ème} semaine de développement embryonnaire au cours de la neurulation. À ce stade, l'ectoderme, l'un des feuillets embryonnaires se différencie en neurectoderme sous l'induction de la corde dorsale (un ensemble des cellules du mésoderme situées sur la ligne médiane) et en l'absence de la signalisation BMP, médiateur indispensable à la différenciation de l'ectoderme en épiderme. Par la suite, il se forme successivement à partir du neurectoderme, la plaque neurale, la gouttière neurale et le tube neural ayant deux ouvertures, le neuropore antérieur qui se ferme au 24^{ème} jour et un neuropore postérieur qui se ferme au 25^{ème} jour de développement (33). Le tube neural est tapissé par des cellules neuro-épithéliales à partir desquelles seront formées toutes les cellules du système nerveux (Figure 1).

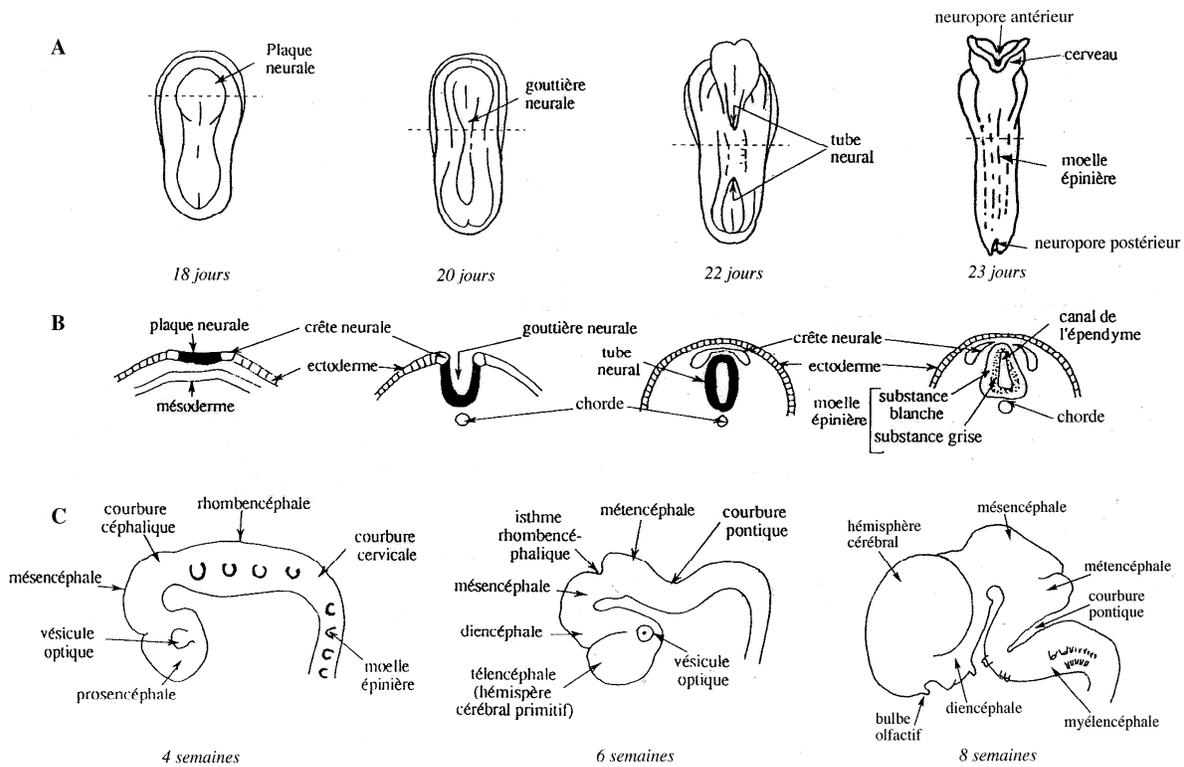


Figure 1. Neurulation chez l'embryon humain.

A : vue dorsale de l'embryon à différents stades ; B : coupes transversales correspondantes aux niveaux indiqués ; C : vues latérales des vésicules cérébrales primitives. Adaptée de N. Delhaye-Bouchaud, 2001 (34).

1.5 Formation de l'encéphale

L'encéphale se forme à partir du tube neural qui se dilate à son extrémité antérieure, dilatation occasionnée par une prolifération intense des cellules neuro-épithéliales donnant lieu à une vésicule primaire qui par la suite, se subdivise en trois vésicules : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Le prosencéphale formera le diencéphale et le télencéphale à partir duquel va se former les hémisphères cérébraux. Le rhombencéphale se différencie en métencéphale à partir duquel va dériver la protubérance (Pont de Varole) et le cervelet, et le myélencéphale qui formera le bulbe rachidien. Tandis que la partie postérieure cylindrique du tube neural formera la moelle épinière (Figure 1C).

Du point de vue moléculaire, les facteurs impliqués dans l'induction neurale ont fait l'objet de plusieurs études. Il en ressort que l'acide rétinoïque, le TGF (transforming growth factor) et les hormones de la famille de FGF (fibroblast growth factor) sont capables d'induire l'induction neurale lors de la liaison à leurs récepteurs spécifiques.

À ce jour, on pense que les facteurs moléculaires de la chorde déclenchent l'induction neurale de façon indirecte en inhibant la BMP-4 (bone morphogenic protein), une molécule qui empêche la spécification de l'ectoderme en neuroectoderme pour former l'épiderme. La chordin ou noggin sont les inhibiteurs de BMP-4 (35).

1.5.1 Neurogenèse embryonnaire

La neurogenèse est un processus au cours duquel se forment les cellules nerveuses (neurones). Au sens large, elle est un ensemble des mécanismes qui génèrent les cellules du système nerveux, les neurones et les cellules gliales.

Elle est initiée par les cellules neuro-épithéliales du neuroectoderme, en intense prolifération et organisées en couche monocellulaire. Ces cellules qui correspondent aux cellules souches neurales au stade embryonnaire, se différencient en cellules de la glie radiaire qui donnent les précurseurs de la quasi-totalité des neurones et des cellules gliales (figure 3), et servent de support biologique de la migration radiaire des neuroblastes (36).

Les cellules de la glie radiaire sont localisées au niveau de 4 zones du prosencéphale (le pallium, l'éminence ganglionnaire latérale, l'éminence ganglionnaire médiane et le septum) afin de former différents types de neurones et cellules gliales (figure 2). Les cellules de la

glie radiaire du pallium vont former les populations de neurones de projection du cortex, celles de l'éminence ganglionnaire latérale (LGE) vont générer des interneurones du bulbe olfactif et du striatum, tandis que les cellules siégeant dans l'éminence ganglionnaire médiane (MGE) vont produire des interneurones du cortex, les neurones à projection du pallium et quelques structures de la base du cerveau (37).

Quant aux cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes), elles sont générées à la fin du développement embryonnaire chez la souris à partir des cellules de la glie radiaire, cela se poursuit jusqu'aux premières semaines de développement postnatal (37).

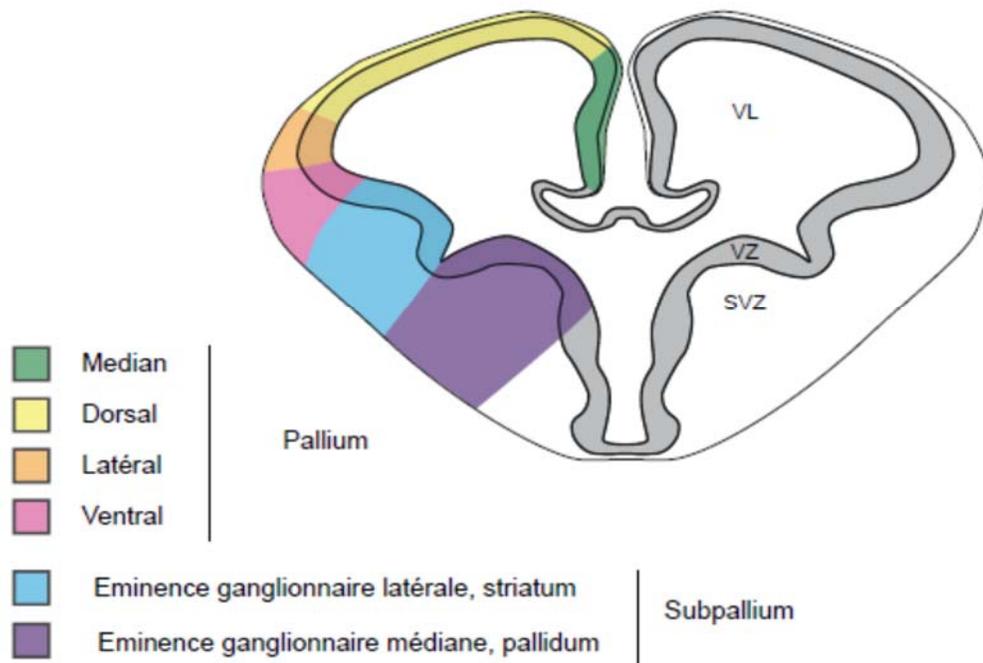


Figure 2. La localisation des structures embryonnaires du télencéphale, vu en coupe.

Adaptée de A. Jourdon, 2015 (38).

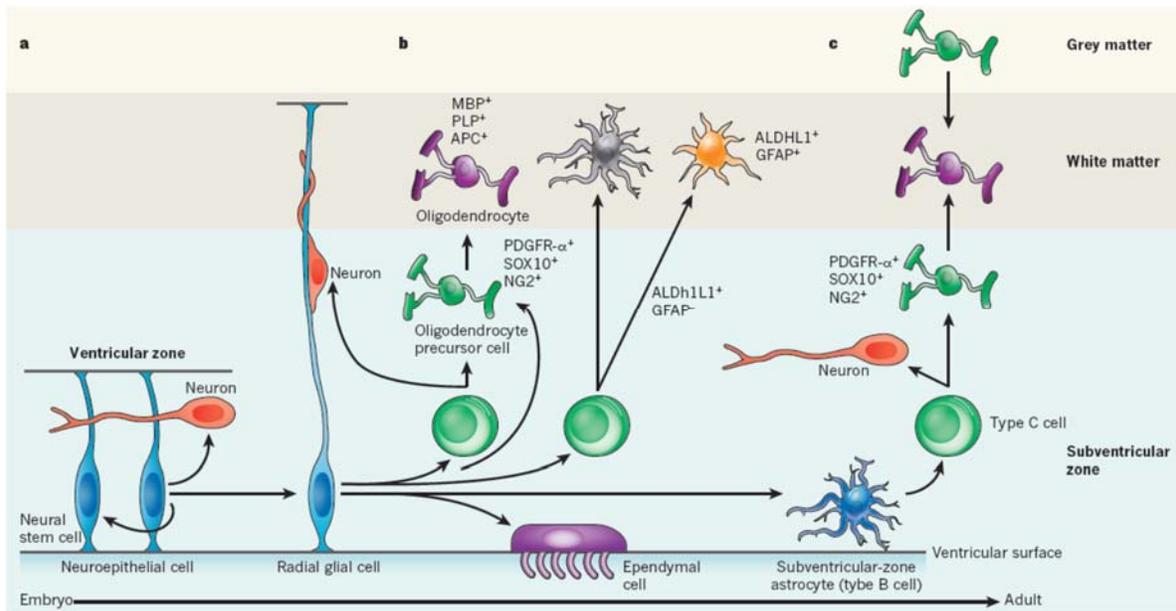


Figure 3. Progression de la neurogenèse de l'embryon à l'adulte.

(a) Auto-renouveau des cellules neuroépithéliales et leur différenciation en cellules gliales radiaires chez l'embryon. (b) différenciation des cellules gliales radiaires en précurseur commun des cellules du système nerveux, en précurseur des oligodendrocytes, en cellules épendymaires et en astrocytes directement. (c) formation des neurones et des oligodendrocytes chez l'adulte à partir des cellules du type B de la zone corticale subventriculaire et à partir du précurseur des oligodendrocytes. Les flèches noires indiquent l'auto-renouveau ou la différenciation cellulaire. Adaptée de Rowitch and Kriegstein, 2010 (39).

1.5.2 Neurogenèse adulte

Bien que la gliogenèse soit conservée chez l'adulte, le cerveau était jadis considéré comme une structure stable dépourvue de toute plasticité, c'est-à-dire, un organe dont les constituants étaient dépourvus de capacité d'acquérir et de pérenniser des modifications sous l'influence de facteurs externes. Seulement, pendant le développement embryonnaire et en période postnatale que les études avaient décrit la formation, la régénération neuronale et la formation des synapses avec des neurones nouvellement formés.

Cependant, Joseph Altman apporta un doute sur le dogme de la stabilité cérébrale par la découverte en 1965 de la neurogenèse chez les mammifères adultes lors d'une étude menée sur des rats (40). C'est plus tard que la neurogenèse fut véritablement confirmée chez l'homme par la mise en évidence dans le cerveau adulte, l'existence des cellules souches neurales susceptibles de générer des nouvelles cellules du SNC notamment les neurones, astrocytes et oligodendrocytes (41, 42) et grâce à la découverte par Fred Gage de la production d'environ 500 neurones dans l'hippocampe des patients décédés pour tumeur traitée avec la Bromodésoxyuridine (43). Depuis, les recherches ont mis en évidence chez les personnes adultes, la présence des cellules souches neurales capables de s'auto-renouveler et de se différencier en neurone ou en cellule gliale (astrocyte, oligodendrocyte), conférant ainsi au système nerveux une plasticité dans certaines situations pathologiques.

Du point de vue mécanistique, l'existence des cellules souches neurales embryonnaires ou adultes ne peut s'expliquer que par des voies de signalisation impliquées dans la genèse, la prolifération et le maintien de ce type cellulaire. Si la voie BMP joue un rôle dans la prolifération des cellules souches neurales embryonnaire et dans le maintien à l'état de quiescence de ces cellules souches neurales chez l'adulte, la voie Wnt contrôle leur prolifération chez l'embryon comme chez l'adulte, alors que la signalisation Sonic hedgehog s'implique dans la spécification de domaines du système nerveux qui assureront le maintien des cellules souches neurales en période post-natale et chez l'adulte. Il est important de signaler le rôle essentiel de la signalisation Notch dans le maintien à l'état indifférencié des CSN chez l'embryon et chez l'adulte ainsi que leur différenciation en neurone (44). En effet, au cours du développement, les cellules dans lesquelles on note l'inhibition de la signalisation Notch, se différencient en progéniteurs neuraux pour une différenciation neuronale tandis

que les cellules régulant positivement la signalisation Notch assurent le maintien des niches de cellules souches neurales chez les vertébrés par la répression des gènes pro-neuraux (45).

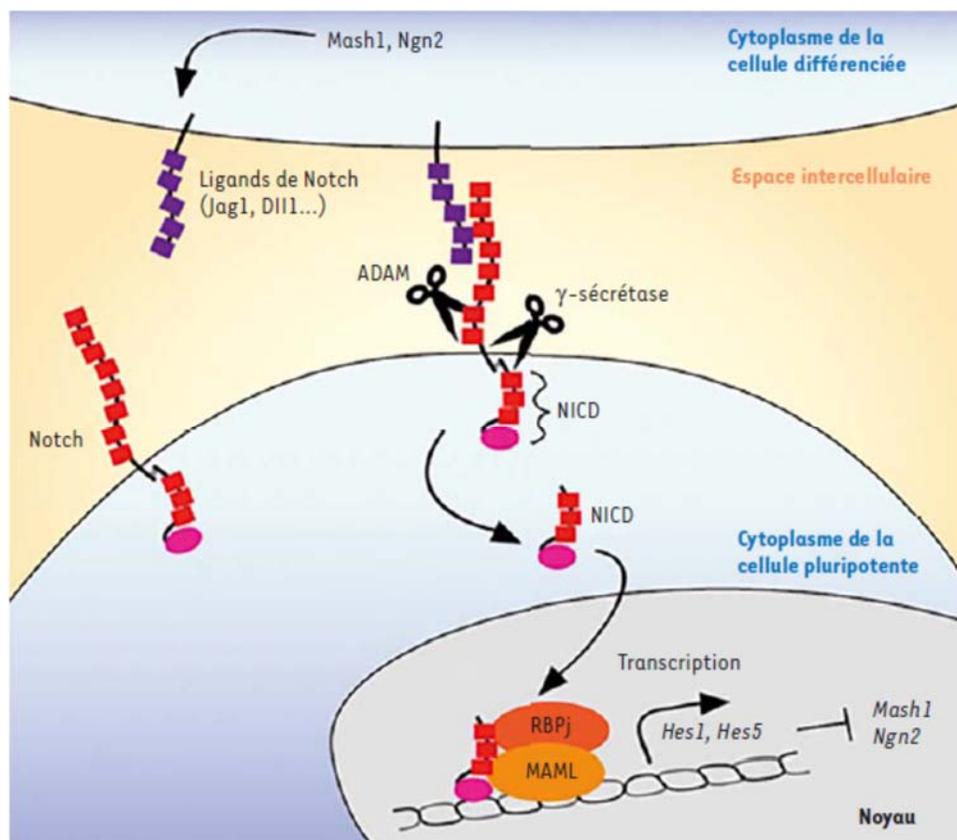


Figure 4. Rôle de la signalisation Notch dans le maintien de la pluripotence des cellules souches neurales.

Les protéines pro-neurales Mash1 et neurogénine2 (Ngn2) stimulent l’expression des ligands Notch (jag1, Dll1, etc.) qui se lient au domaine extracellulaire du récepteur Notch dont le clivage par la métalloprotéase ADAM et la γ -sécrétase libère le domaine intracellulaire de Notch (NICD) qui après translocation dans le noyau, se lie à la chromatine en s’associant aux facteurs de transcription RBPj et MAML afin d’induire l’expression des gènes Hes1 et Hes5 dont le rôle est de réprimer les gènes pro-neuronaux (Mash1 et Ngn2) et de maintenir les cellules souches en état de pluripotence. Adaptée d’E. Traiffort et J. Ferent, 2015 (46).

1.6 Le GBM et cellules souches cancéreuse du Glioblastome

1.6.1 Origine du glioblastome multiforme

Il est évident que la transformation maligne des cellules du système nerveux à l'origine du glioblastome est la conséquence de l'acquisition progressive de multiples mutations ou une perte de certains gènes. De ce fait, deux modèles sont admis dans le monde scientifique sur la formation des gliomes et du glioblastome en particulier.

Le modèle stochastique longtemps admis, soutient la formation du glioblastome à partir des cellules différenciées du système nerveux central ayant acquis des mutations cancérogènes aboutissant à la sélection des clones efficaces et à l'hétérogénéité de la tumeur (47).

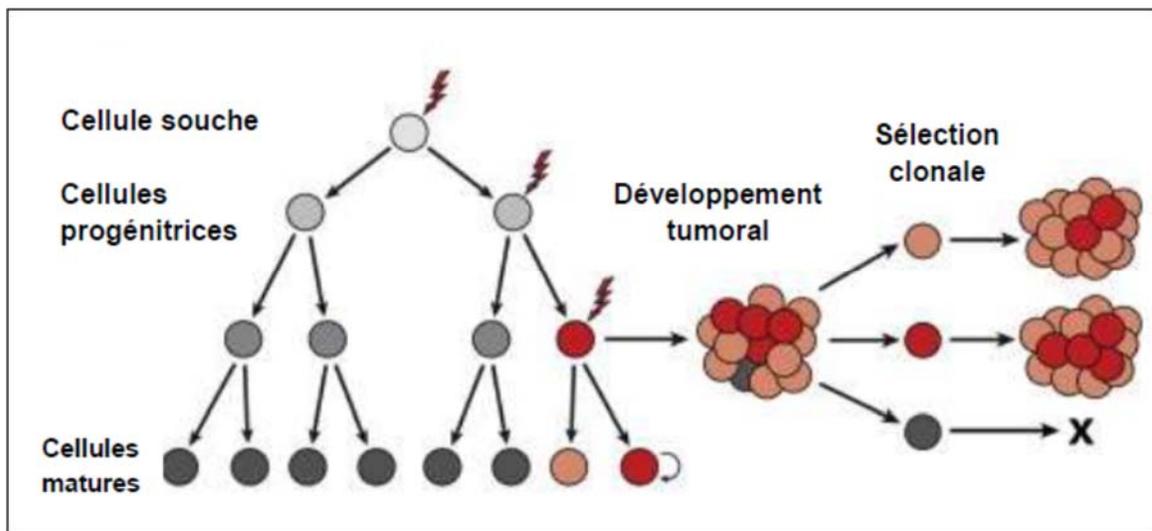


Figure 5. Modèle stochastique de formation du glioblastome.

Adaptée de Visvader J.E et Lindeman G.J, 2012 (48).

Le modèle hiérarchique faisant l'objet de cette étude, soutient comme dans les leucémies, la formation dans le système nerveux des cellules souches cancéreuses qui initient le développement de la tumeur et génèrent d'autres sous-populations cellulaires réalisant ainsi, une organogénèse au niveau tumoral (47). De ce point de vue, seules les cellules souches cancéreuses sont indispensables dans la formation et le maintien du glioblastome.

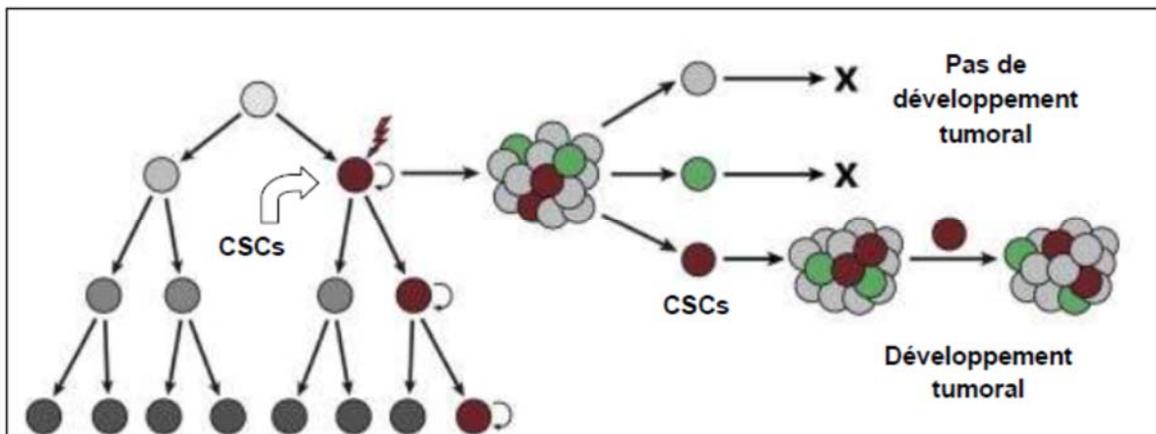


Figure 6. Modèle hiérarchique de formation du glioblastome.

Adaptée de Visvader J.E et Lindeman G.J, 2012 (48).

Par ailleurs, dans l'hypothèse qu'une cellule différenciée peut acquérir la capacité de proliférer de façon illimitée suite à l'accumulation des mutations, nous pensons que les 2 modèles peuvent intervenir simultanément dans la formation et le maintien d'une tumeur donnée ou que chaque tumeur ait un modèle préférentiel. En ce qui concerne le glioblastome multiforme, la coexistence du modèle stochastique et du modèle hiérarchique choisi dans cette étude n'est pas théorique exclue.

1.6.2 Origines des cellules souches cancéreuses du glioblastome multiforme

S'il était initialement supposé que les cellules souches cancéreuses du GBM dérivent uniquement des cellules souches neurales ayant acquis des mutations, aujourd'hui certains scientifiques pensent que d'autres cellules non souches sont susceptibles d'acquies les caractéristiques des cellules souches du GBM suite à des mutations et expression des gènes de type cellules souches (49). Il s'agit des cellules souches du GBM dérivant des progéniteurs neuronaux (50) et celles provenant de la dédifférenciation des astrocytes (51). La figure ci-dessous illustre l'origine des CSGs.

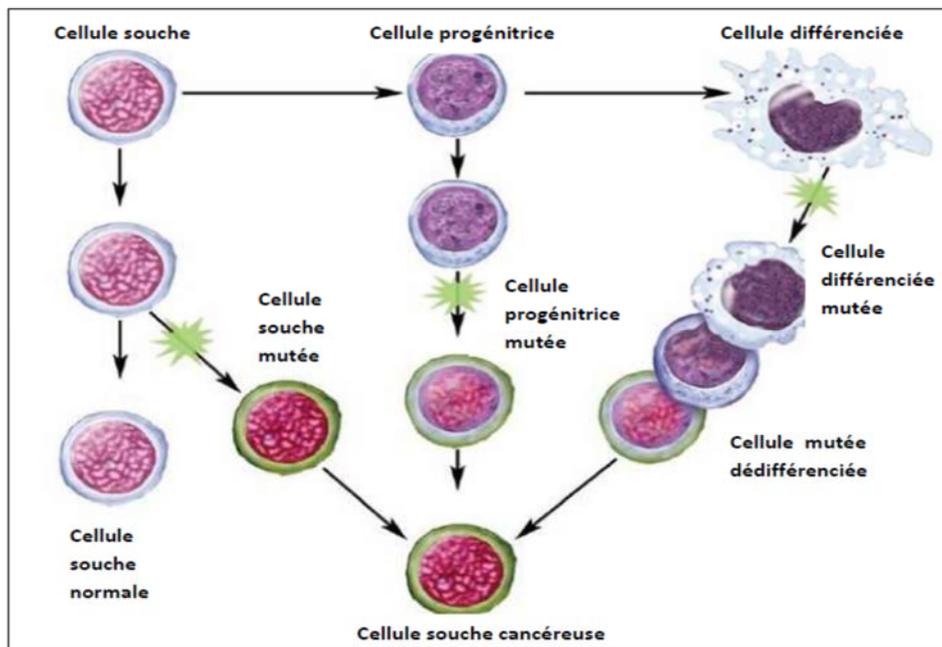


Figure 7. Origines de cellules souches cancéreuses du glioblastome.

Adaptée de Goldthwaite, 2006 (52).

Du point de vue physiopathologique, les CSGs sont dotées de capacités d'auto-renouvellement et de différenciation en sous-population de la tumeur, de ce fait, elles contribuent au développement, au maintien et à la reconstitution de la tumeur.

Elles sont organisées en niche périvasculaire ou hypoxique. Dans cette dernière, l'hypoxie empêche l'hydroxylation de la sous-unité HIF1 α qui d'une part favorise l'auto-renouvellement des CSGs par les voies de signalisation PI3K /Akt et Erk (53) et d'autre part, se combine avec la sous-unité HIF1 β pour former un hétérodimère contrôlant l'expression des gènes impliqués dans l'angiogenèse (54).

Il existe deux sous-population des cellules souches cancéreuses, les cellules souches cancéreuses mésenchymateuses exprimant le marqueur CD44+ et les cellules souches cancéreuses proneurales qui expriment le marqueur CD133+ et Sox2. La sous-population proneurale représente 5 à 30% de toutes les cellules du GBM, elle est fortement tumorigénique par rapport à son homologue (55, 56).

1.6.3 Propriétés des cellules souches cancéreuses du GBM

1.6.3.1 Rôle des CSG dans la formation et maintien de la tumeur

Plusieurs études ont eu à démontrer la capacité des cellules souches cancéreuses à reformer le glioblastome initial in vivo, la plus récente est celle réalisée en 2010 par Facchino et al, qui a reproduit une tumeur exprimant la GFAP au bout de 6 à 10 semaines après greffe intracrânienne des cellules souches cancéreuses CD133+ du GBM sur des souris immunodéficientes (57). Cette propriété montre la place essentielle qu'occupent les cellules souches cancéreuses dans la genèse, le devenir et le traitement du glioblastome multiforme. Elle permet également de produire un modèle animal pour tester des anticancéreux et d'autres drogues susceptibles de ralentir la progression ou carrément d'éradiquer la maladie dans un environnement limitant la diffusion des médicaments par l'existence de la barrière hémato-encéphalique. Cette aptitude à régénérer le glioblastome initial est sûrement la conséquence de la capacité de cellules souches à s'auto-renouveler, à proliférer et à se différencier.

1.6.3.2 CSG et radiorésistance du GBM

Les radiations ionisantes induisent dans la cellule le dommage double brin au niveau de l'ADN. La capacité de résistance de la cellule à ce dommage est fonction de son état physiologique selon qu'elle est en division ou en quiescente et au bon fonctionnement des

mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN. Contrairement à d'autres sous-populations cellulaires du GBM, les cellules souches cancéreuses CD133+ sont résistantes aux radiations ionisantes. Cette propriété est certainement due par le fait qu'elles sont généralement quiescentes au sein de la tumeur. En outre, certains chercheurs pensent en l'existence d'un autre mécanisme conférant à ces cellules la résistance aux radiations ionisantes.

1.6.3.3 Les cellules souches cancéreuses du Glioblastome sont enrichies en BMI1

L'implication de BMI1 dans le cancer a été d'abord révélée dans les hémopathies malignes où l'oncogène BMI1 induit la formation des lymphomes (58, 59), la prolifération et l'auto-renouveaulement des cellules souches leucémiques (60). Cette observation incita les chercheurs à mener des investigations sur les gliomes.

Ainsi, les travaux de Bruggeman et al, révélèrent que la protéine BMI1 est essentielle pour promouvoir le développement des gliomes dans un contexte d'inactivation ou de délétion du locus Ink4/Arf (61). Il a été aussi constaté que contrairement aux observations chez la souris, les astrocytes humains normaux n'expriment pas BMI1 (62). Cependant, les expériences d'Abdoun et al. ont montré que les cellules cancéreuses du GBM et les neurosphères formées par les CSG dérivant de la culture de ces cellules expriment fortement la protéine BMI1 et l'histone méthyltransférase EZH2 (63).

1.6.4 Mécanisme d'action de BMI1

BMI1 est une protéine du groupe polycomb faisant partie du complexe PRC1. Les protéines du groupe polycomb sont des protéines impliquées dans la régulation épigénétique et compaction de la chromatine. Dans ce complexe, BMI1 s'associe aux protéines PHC, CBX et RING1 chez les vertébrés. Dans les cellules normales l'interaction de BMI1 avec l'ubiquitine Ring1 favorise son activation et la mono-ubiquitination au niveau de la lysine 119 de l'histone H2A, marque nécessaire pour la répression du locus INK4A qui comprend les gènes de la protéine p16^{Ink4} et p19^{Arf}, des régulateurs du cycle cellulaire, ce qui aboutit à la prolifération du cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose (64). La figure ci-dessous illustre le mécanisme d'action de BMI1 dans une cellule normale.

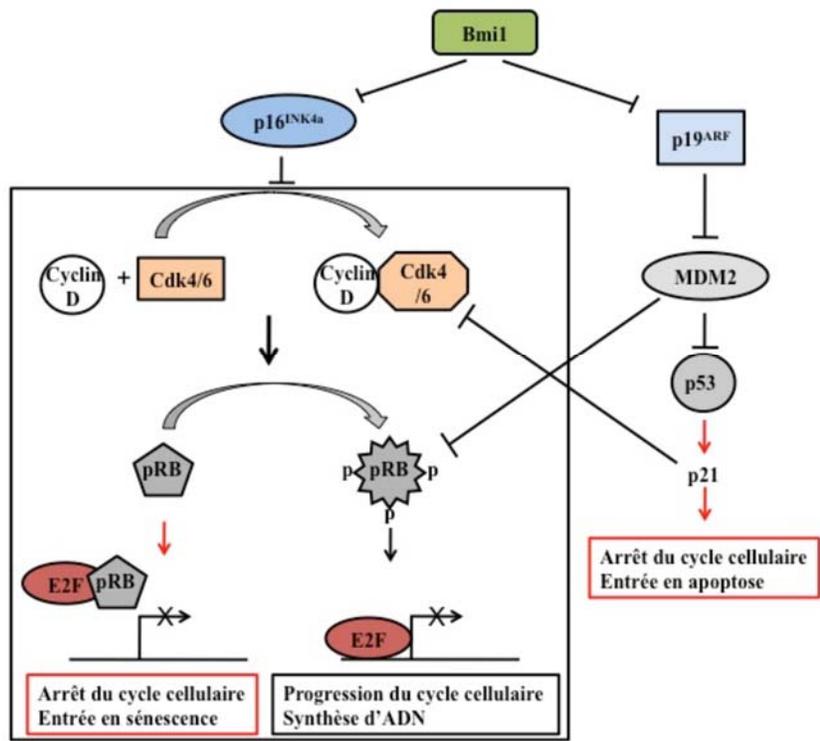


Figure 8. Mécanisme d'action de BMI1.

Adaptée de Park I.K. et al., 2004 (64)

Cependant, dans les cellules cancéreuses du glioblastome, on note dans la majorité des cas la délétion du locus INK4A sans modifier les effets de BMI1. Il est probable que BMI1 agissent sur des voies alternatives notamment en réprimant directement les gènes qui codent pour des protéines régulant négativement le cycle cellulaire dont p21, p18, p14^{ARF}, FOXO3A (65). La figure ci-dessous illustre le mécanisme d'action de BMI1 dans les cellules cancéreuses du GBM.

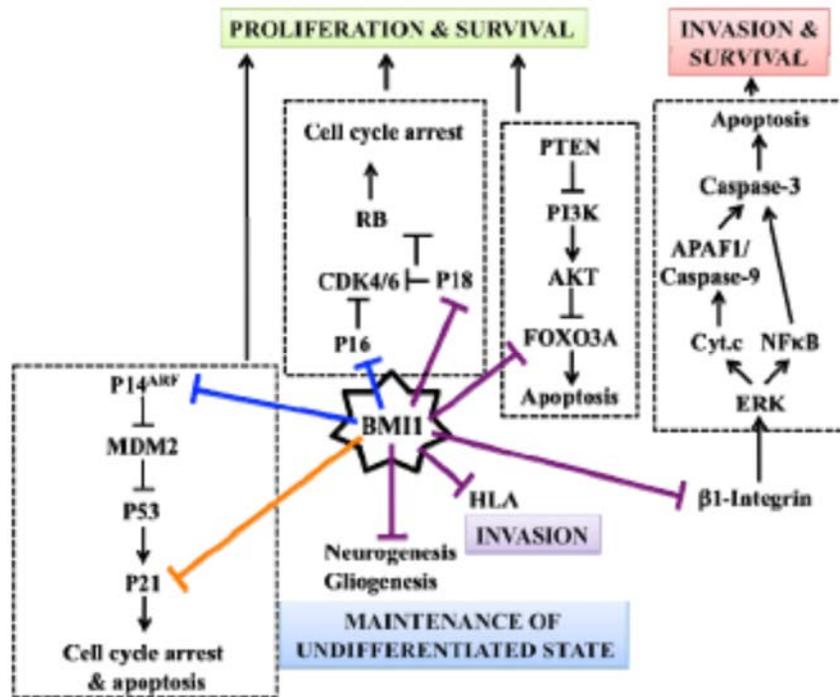


Figure 9. Mécanisme d'action de BMI1 dans les cellules cancéreuses du GBM.

Adaptée de Facchino et al., 2011 (65)

1.6.5 Le rôle de BMI1 dans le glioblastome multiforme

1.6.5.1 *BMI1 et la formation du GBM*

L'enrichissement en BMI1 ne pouvait être un fait anodin d'autant plus qu'il a été démontré que cette protéine est importante dans l'auto-renouveaulement et la prolifération des cellules souches leucémiques. Par ailleurs, les difficultés thérapeutiques et les récives des GBM après un traitement bien conduit ont cristallisé l'attention des chercheurs dans la recherche des facteurs génétiques et moléculaires conférant aux GBM des propriétés agressives. Dans une étude menée par Abdoul et al. en 2009, qui a consisté en la culture des CSG transfectées, il ressort que BMI1 est requis pour la croissance des cellules souches cancéreuses du GBM. En outre, la transplantation intracrânienne de ces cellules souches cancéreuses déplétées en BMI1 par un ShBMI1 chez des souris immunodéficientes a révélé dans la grande majorité des cas, l'absence des tumeurs à l'examen des cerveaux de ces souris, ce qui traduit que BMI1 est requis pour la formation du GBM in vivo (63).

De ce point de vue, un ciblage épigénétique du GBM réduirait la croissance tumorale et permettrait d'améliorer la survie de patients atteints par cette maladie. Cette hypothèse a été confirmée sur des souris immunodéprimées chez qui l'injection intracrânienne des CSGs déplétées en BMI1 par un ShBMI1 a amélioré leur survie (63).

1.6.5.2 *BMI1 et la radiorésistance des cellules souches cancéreuses du GBM*

A priori, il est admis que la résistance des CSG résulte de leur état de quiescence lors des irradiations aux rayons ionisants sur le GBM. L'irradiation de cellules souches cancéreuses du GBM transfectées par un ShBMI1 avec 3 à 7 grays des radiations ionisantes a cependant révélé une réduction importante des colonies cellules déplétées en BMI1 avec une forte réduction des cellules exprimant γ H2Ax et pCheck2, respectivement une marque de dommage à l'ADN et une protéine de réponse au dommage à l'ADN, traduisant une sensibilité accrue aux radiations ionisantes et l'altération des mécanismes de reconnaissance et de réponses au dommage à l'ADN (57). De ce qui précède, un ciblage du GBM par les inhibiteurs de BMI1 devrait logiquement améliorer la sensibilité du glioblastome multiforme aux radiations ionisantes.

1.7 Histologie du GBM

La description histologique des tumeurs cérébrales et de leur malignité se base sur la classification de l'OMS de 2007, qui se réfèrent aux 4 critères histologiques : l'atypie cytonucléaire, l'index mitotique, la présence ou non des foyers de nécrose et la néoangiogenèse (66,67).

Cette classification distingue les gliomes de bas grade à ceux de haut grade de malignité et permet d'hiérarchiser les gliomes de grade I à IV. Le glioblastome multiforme est classiquement un gliome du type astrocytaire (astrocytome) de grade IV, constitué de cellules astrocytaires pléomorphes, peu différenciées, avec un index mitotique élevé, des atypies cytonucléaires marquées, des zones de nécrose et une néoangiogénèse tumorale (66, 67).

Les foyers de nécrose sont dus à l'augmentation des besoins énergétiques et métaboliques des cellules cancéreuses situées au centre de la tumeur.

La néoangiogénèse intratumorale est due à l'action du facteur de transcription HIF-1 α dont l'expression et la sécrétion constituent une réponse à l'hypoxie. L'HIF-1 α induit l'expression de l'angiopoïétine 2 et la surexpression de VEGF dans les cellules cancéreuses afin d'assurer le recrutement et la prolifération des cellules endothéliales pour la formation des néovaisseaux et les apports de nutriments (68, 69).

1.8 Caractéristiques de la barrière hémato-encéphalique dans le glioblastome

La BHE est une structure neurovasculaire qui assure une séparation physique entre le système nerveux central (encéphale et moelle épinière) et le sang circulant. Elle a été découverte à la suite des travaux de Paul Erlich en 1885 qui observa une faible affinité du cerveau à l'aniline, un colorant injecté par voie intraveineuse à des souris (70) et des travaux d'Edwin Goldmann en 1913 qui nota une coloration du cerveau au bleu trypan après son injection dans le liquide céphalorachidien (71). C'est en 1967 qu'elle fut clairement décrite par Reese et Karnovsky qui observèrent les éléments constitutifs de cette structure au microscope électronique, il s'agit des cellules endothéliales des capillaires cérébraux reposant sur une membrane basale et établissant des jonctions serrées entre-elles, le tout renforcé par les péricytes et les pieds de prolongements astrocytaires (72,73).

Cette barrière assure un passage sélectif des molécules du sang circulant vers le SNC grâce à la présence des transporteurs membranaires et de la transcytose (74,75,76), limitant de ce fait le traitement pharmacologique des maladies du SNC dont les gliomes.

Par ailleurs, il est observé dans le glioblastome une néo-angiogenèse défectueuse qui aboutit à la formation des vaisseaux ayant des anomalies fonctionnelles et morphologiques (77). Ces vaisseaux présentent des fenestrations et des défauts des jonctions serrées, une modification de l'épaisseur de la lame basale ainsi que l'augmentation du nombre de péricytes et de l'espace périvasculaire (78,79). En 2003, Bergers et Benjamin ont révélé que cette vascularisation défectueuse du GBM serait due à un taux intratumoral élevé de VEGF favorisé par l'hypoxie dans certaines régions de la tumeur (80). La hausse des aquaporines (AQP), une famille des protéines membranaires impliquées dans le transport de l'eau, est aussi incriminée dans les perturbations intratumorales de la barrière hémato-encéphalique, il s'agit particulièrement de AQP4 et AQP8 (81, 82).

Bien que la barrière hémato-encéphalique soit altérée dans le glioblastome multiforme, la bonne diffusion intratumorale des anticancéreux n'est pas garantie, d'autant plus que certaines zones tumorales présentent une insuffisance voire une absence de la vascularisation responsable des foyers hypoxiques ou nécrotiques. L'emploi des drogues qui diffusent bien à travers la barrière hémato-encéphalique dans des situations normales, permettent d'obtenir la concentration intratumorale thérapeutique. PTC596 et A1016, deux inhibiteurs pharmacologiques de BMI1, traversent cette barrière et verrons l'accroissement de leur concentration dans les situations pathologiques où la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique se voit majorer.

1.9 Diagnostic

Si le motif de consultation met en avant, pour de raison de localisation, de volume tumoral et de l'inextensibilité de la boîte crânienne, trois groupes de signes : le déficit moteur, sensitif ou sensoriel, l'hypertension intracrânienne et le syndrome épileptique, la confirmation du diagnostic relève de l'examen histopathologique. L'IRM cérébral permet une description préopératoire de la tumeur, le GBM a l'aspect d'une masse hétérogène avec un hyposignal en séquence T1, une prise de contraste périphérique en anneau avec un centre nécrotique délimité par un œdème traduit par un hypersignal en séquence T2 Flair. En l'absence de l'IRM, le scanner cérébral peut servir d'alternative.

1.10 Traitement

1.10.1 Traitement chirurgical

L'exérèse chirurgicale est l'élément essentiel du traitement du GBM, elle permet de réaliser la biopsie pour un examen anatomo-pathologique de la tumeur afin de confirmer le diagnostic. Des études révèlent que l'exérèse de plus de 90% de la tumeur améliore la survie et la qualité de vie des patients (85-87).

1.10.2 Traitement adjuvant

Il combine la radiothérapie à la chimiothérapie au témozolomide (TMZ). Le protocole de Stupp comprend :

- une phase d'induction au cours de laquelle on administre le TMZ en raison de $75 \text{ mg/m}^2/\text{j}$ chaque jour + séances de radiothérapie de 2 grays par séance 5 jours/7 pendant 6 semaines jusqu'à une dose totale de 60 grays ;
- une pause de 4 semaines
- une phase de consolidation faite d'une chimiothérapie au TMZ en raison de $150 \text{ à } 200 \text{ mg/m}^2/\text{j}$ les 5 premiers jours du cycle de 28 jours jusqu'à 6 cycles (88).

Dans certains cas, une chimiothérapie locale in situ avec des implants de carmustine (Gliadel®) est administrée. Cependant il existe peu de preuves de son efficacité, parmi lesquelles une étude randomisée de phase 3 qui a montré l'efficacité de Gliadel® sur l'amélioration de la survie lorsqu'il a été comparé à un placebo administré après la combinaison TMZ-radiothérapie (89).

Les anti-angiogéniques sont également utilisés dans la prise en charge du GBM en cas d'échec du traitement standard (TMZ-radiothérapie) ou en association avec ce dernier. En réduisant la néoangiogenèse tumorale et l'œdème vasogénique, ces anticorps monoclonaux ont un effet direct sur la tumeur. Le bévacicumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le facteur de croissance VEGF, a amélioré la survie de 3 à 4 mois dans deux essais cliniques randomisés de phase III où il a été associé au traitement standard. Cependant, une augmentation des complications avait été aussi observée (90, 91).

D'autres molécules sont utilisées dans le traitement symptomatique de patients avec GBM, il s'agit des anticonvulsivants, des corticoïdes en cas d'œdème péri-lésionnel pour réduire l'hypertension intracrânienne.

Hypothèse et objectifs

En référant à des études antérieures qui ont montré que les cellules souches cancéreuses du glioblastome présentent un enrichissement en BMI1, une protéine du groupe polycomb PRC1, impliquée dans l'auto-renouveaulement, la protection contre l'apoptose, la prolifération et la radiorésistance de ces cellules (57, 63) et dont la répression du gène réduit le taux de cellules souches cancéreuses tout en les sensibilisant à la radiothérapie (57), nous avons émis l'hypothèse que les inhibiteurs pharmacologiques des BMI1 améliorent la survie des patients atteints du glioblastome multiforme.

Pour vérifier cette hypothèse, les objectifs spécifiques de mon projet de maîtrise étaient de :

1. Analyser les effets de PTC596 et d'A1016 sur le taux de la protéine BMI1 dans les cellules souches cancéreuses du GBM et les neurones in vitro

BMI1 étant enrichi dans les cellules souches cancéreuses du glioblastome dont il permet l'auto-renouveaulement, la prolifération et la protection contre l'apoptose (65), l'inhibition de cette protéine par des moyens pharmacologiques serait pratique et plus efficace dans le traitement du glioblastome. D'autre part, les résultats d'une étude récente impliquant la déficience en BMI1 dans l'étiopathogénie de la maladie d'Alzheimer sporadique (92), nous ont poussés à rechercher les effets des inhibiteurs de BMI1 sur des neurones en culture afin de comparer les bénéfices aux risques éventuels de ce traitement.

2. Evaluer après xénotransplantation, la survie des souris traitées avec PTC596 et A1016
Cet objectif permet de rechercher l'écart entre les effets en culture et les effets in vivo de ces molécules étant donné la présence de la barrière hémato-encéphalique, structure limitant les échanges entre le milieu plasmatique et le parenchyme cérébral, et les contraintes pharmacocinétiques auxquelles sont soumises les médicaments chez l'homme comme chez les mammifères.

3. Décrire le volume des tumeurs des souris traitées

En général, le cancer est une maladie chronique, celui du cerveau aggrave l'hypertension intracrânienne par augmentation progressive du volume. Le traitement de ces tumeurs solides devrait logiquement réduire le volume tumoral à défaut de guérir le malade afin d'améliorer la qualité de vie et de prolonger la vie.

4. Analyser les caractéristiques moléculaires et histologiques des tumeurs traitées

Les cellules souches cancéreuses CD133⁺ et d'autres types cellulaires du GBM.

Cette étude devrait confirmer la nature gliale de la tumeur induite par la mise en évidence de la GFAP, Glial fibrillary acidic protein, décrite en 1971 par Eng et al., et exprimée spécifiquement par les cellules gliales (93-97). En outre, elle devrait vérifier d'autres caractéristiques biologiques du GBM dont l'enrichissement de ses cellules en protéines BMI1 et EZH2, la prolifération cellulaire et la présence des cellules souches cancéreuses par la recherche des marqueurs Sox2 et CD133

5. Vérifier le mécanisme d'action de PTC596 et A1016

PTC596 agirait par l'activation de la Cdk1, une kinase intervenant dans la phase G2 et dans la transition G2/M du cycle cellulaire, afin de phosphoryler BMI1 et induire sa dégradation par le protéasome. Nous avons associé l'inhibiteur de BMI1 à un inhibiteur du protéasome afin de confirmer l'intervention du protéasome dans le mécanisme d'action des inhibiteurs de BMI1.

Matériel et méthodes

1. Les animaux

Vingt-trois souris immunodéprimées (NOD/SCID) ont été achetées à Jax Laboratory et ont été manipulées dans le respect des recommandations du conseil canadien de protection des animaux (CCPA) et en conformité à la réglementation du centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont (CRHMR).

2. Isolement et culture des cellules souches cancéreuses du GBM

Des échantillons de GBM 1205 et 0811 étaient obtenus au département de pathologie de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (Montréal, Canada) et à la Banque de tissus des tumeurs cérébrales (Toronto, ON, Canada) après consentement des patients et ont été utilisés avec la permission du comité d'éthique de notre établissement.

Ces échantillons ont été coupés en petits fragments puis incubés dans une solution contenant la trypsine et le HBSS (1:1) pendant 10 minutes à 37°C. Ensuite, les morceaux de GBM obtenus, ont été dissociés de façon mécanique avec une pipette portant un tips de 1000µl. les suspensions cellulaires ont été centrifugées et les cellules recueillies ont été remises dans le DMEM/F12 (Invitrogen) contenant 0,25% glucose ; le supplément en N2 et B27 à 1% ; FGF2 recombinant humaine 10ng/ml (peprotech) et EGF recombinant humaine 20ng/ml (sigma) puis mises en culture sur des plaques non adhérentes de six puits à 37°C et 5% de CO₂ avec un changement du milieu tous les 5 jours. Au bout de 3 semaines, les cellules souches proneurales (CD133+) du GBM ont formé des neurosphères. Les passages sur des plaques de 6 puits ont été réalisés après incubation pendant 20 minutes des neurosphères dans une solution de dissociation dépourvue d'enzyme (Millipore Bioscience Research Reagents) à 37 °C et dissociées mécaniquement avec une aiguille 20G. Ensuite, les cellules ont été remises en suspension puis cultivées avec le même milieu.

3. Différenciation des cellules souches embryonnaires humaines en neurones corticaux
Le protocole de différenciation était basé sur une étude antérieure de Espuny-Camacho et al., 2013 (83). Cependant, l'agoniste LDN193189 de Noggin a été utilisé pour réduire la concentration de Noggin recombinant. Les lignées cellulaires H9 (WiCell), HUES9 (Harvard), étaient dissociées à l'aide d'Accutase (Innovative Cell Technology #AT-104) et plaquées sur matrigel (Corning #356231) dans le milieu de culture cellulaire hES PeproGrow (PeproTech #BM-hESC) supplémenté en inhibiteur ROCK (Y-27632; 10 μ M, Cayman Chemical #10005583). Après 70% de confluence, le milieu a été changé en milieu de différenciation neuronale (LN) composé de DDM-F12 contenant le supplément de N2 (1X final), B27 (1X final), Noggin (10 ng/ml, PeproTech #120-10C) et LDN193189 (0.5 μ M ; Sigma #SML0559, Glutamax (1x final), NEAA, B-mercaptoethanol (0.1 mM). Le changement du milieu se faisait tous les jours. Après 16 jours de différenciation, le milieu a été changé en DDM/B27 et réapprovisionné tous les jours. Au jour 24, les progéniteurs neuronaux ont été dissociés manuellement de la plaque et mélangés au DDM/B27 supplémenté avec un inhibiteur de ROCK (Y-27632 ; 10 μ M) et plaqués sur du matrigel ou chamber slides (LabTek #154534) avec réduction du facteur de croissance. Cinq jours après la dissociation, la moitié du milieu a été remplacé et renouvelé tous les trois jours.

4. Culture des cellules 293FT

Les cellules 293FT conservées dans l'azote liquide, ont été décongelées pendant quelques secondes au bain-marie puis remises en suspension dans le milieu DMEM/F12 contenant le NEAA 1x, le FBS 10%. Ensuite nous avons fait l'expansion de ces cellules sur une plaque adhérente à 6 puits et incubées à 37°C et 5% de CO₂. Le changement de milieu a été réalisé chaque jour jusqu'à la confluence de 70%. Nous avons par la suite dissocié les cellules mécaniquement à l'aide d'une pipette munie d'un tips de 1000 μ l puis leur centrifugation pendant 5 minutes. Le culot cellulaire a été remis en suspension dans le même milieu frais, la suspension cellulaire a été placée dans une plaque non adhérente à 12 puits en raison de 2ml/puits et

incubées à 37°C et 5% de CO₂ avec un changement quotidien de milieu jusqu'à la confluence de 70%.

5. Traitement des cellules.

A la confluence de 70%, le milieu de culture des cellules souches de GBM et des neurones ont été exposés aux inhibiteurs de BMI1 : A1016 et PTC596 à 50nM, les cellules des puits contrôles ont été traitées avec du DMSO. Ensuite, ces cellules ont été incubées à 37°C et 5% de CO₂ pendant 24 heures.

Lorsque les cellules 293FT ont atteint une confluence de 70%, nous avons changé le milieu de chaque puits avec du milieu frais de DMEM contenant respectivement A1016 (100nM) ; PTC596 (100nM) ; MG132 (10mM) ; A1016 (100nM) et MG132 (10mM) ; PTC596 (100nM) et MG132 (10mM) ; DMSO. Le MG132 est un inhibiteur du protéasome.

6. Western blot

Les progéniteurs neuronaux, les neurones et les cellules 293FT ont été chacun lysés et homogénéisés dans une solution composée de RIPA 1X (abcam) et d'un inhibiteur des protéases 1X (Complete, EDTA-free) puis soniqués 4 fois pendant 10 secondes à une amplitude de 30%. Les protéines contenues dans le lysat de chaque type cellulaire ont été quantifiées par la méthode de Bradford, lues au spectrophotomètre Tecan. Ces lysats ont été mélangés avec le tampon laemmli 1x ensuite dénaturés à 97°C.

Les protéines dénaturées ont été séparées par électrophorèse sur le gel de polyacrylamide 10% dans un tampon contenant le SDS, le Tris et la glycine.

Par la suite, les protéines séparées ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (BioRad). Le marqueur de poids moléculaires de protéines Precision plus proteinTM (BioRad) était utilisé.

Ensuite, nous avons réalisé le blocage de la membrane avec le tampon TBS-T 1x (Tris buffer saline-Tween20 0,05%) contenant 5% de lait écrémé en poudre pendant une heure à la température ambiante sous agitation. Ensuite, nous avons incubé la membrane avec l'anticorps primaire spécifique à chaque protéine d'intérêt et dilué dans une solution de TBS-T 1x contenant du lait écrémé en poudre à 1% pendant au moins 16 heures à 4°C. Après 3 lavages de la membrane au TBS-T 1x, nous l'avons

incubée avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, spécifique à chaque anticorps primaire (anti-lapin ou anti-souris) et dilué à 1/5000 dans le lait écrémé dissout dans le TBS-T 1x à 1% à la température ambiante pendant 1 heure. Ensuite, nous avons réalisé trois lavages de la membrane au TBS-T 1x et révélé par chimioluminescence les protéines d'intérêt avec le kit Immobilon western à l'aide de la caméra « charge-coupled device Fujifilm LAS 4000.

Les anticorps primaires ci-après ont été utilisés : Anti BM1 1 :1000 (Cell signaling), Anti EZH2 1 :1000 (Cell signaling), Anti H2Aub 1 :1000 (Abcam), Anti GAPDH 1 :1000 (Santa Cruz Biotechnology).

7. Greffe intracrânienne de cellules souches cancéreuses du GBM

Les cellules souches cancéreuses du GBM ont été remises en suspension dans une solution oxygénée de HBSS et réparties en aliquotes de 3µl.

En se référant sur la technique d'injection orthotopique développée par Ji-Yoen Kim et al., 2014 (84) ; les souris immunodéficiences combinées (NOD/SCID) âgées de six semaines ont reçu chacune une injection stéréotaxique d'une suspension de 3µl des cellules souches du GBM dans le cerveau après une anesthésie générale à l'isoflurane. Pour cette injection, les souris ont été placées dans un cadre stéréotaxique se basant sur les bords supérieurs des oreilles et le trou était percé aux repères ci-après : 2 mm à droite de la suture sagittale, 2mm en postérieur de la suture coronale, 3mm de profondeur. Les cellules des lignées 1205 et 0811 ont été respectivement greffées dans la première et deuxième cohorte des souris. Le cuir chevelu était fermé à l'aide des petites agrafes chirurgicales. Les souris ont reçu le méloxicam au deuxième jour post-opératoire. Le suivi quotidien des souris s'est poursuivi jusqu'à l'apparition de déficits neurologiques et/ou altération de l'état général.

Dès l'apparition des manifestations neurologiques ou l'altération de l'état général dans les 3 à 5 mois après la greffe selon la lignée de cellules cancéreuses greffées, les souris ont été réparties dans un 1^{er} temps en deux groupes de 4 souris. Par gavage, le 1^{er} groupe était traité avec le PTC596 12mg/kg tous les 3 jours et le groupe contrôle avait reçu le HPMC, le solvant avec lequel était dissout PTC596. Dans un 2^{ème} temps, nous avons formés trois groupes de 5 souris. Le 1^{er} groupe était traité avec le PTC596

12mg/kg tous les 3 jours et 2^{ème} groupe avait reçu A1016 12mg/kg/jour et le groupe contrôle avait reçu le HPMC, le solvant avec lequel était dissout les deux drogues. La durée du traitement était de 21 jours avec un suivi quotidien de l'état neurologique et général des souris.

8. Coloration à l'hématoxyline/éosine

Après euthanasie des souris par dissociation cervicale, chaque hémisphère cérébral a été fixé au formol 10% et incorporé dans la paraffine selon le protocole standard.

Les sections de 8µm d'épaisseur ont été montées sur des lames en verre (Thermo Fisher Scientific). Ensuite, les sections ont été successivement déparaffinées au xylène, réhydratées par des bains successifs d'alcool, lavées à l'eau distillée, colorées à l'hématoxyline pendant 3 minutes et bleuies dans l'acide acétique glacial suivi d'une coloration à l'éosine pendant 45 secondes, la déshydratation aux bains d'alcool et d'un montage au permount. L'observation a été faite au microscope à fluorescence (AxioCam MRm) et les images prises avec le logiciel Axiovision ou Zen 2.5.

9. Immunohistochimie

Après montage sur les lames en verre, les sections de cerveau ont été déparaffinées au xylène puis réhydratées avec des bains successifs d'alcool (100, 95 et 70%). Le démasquage des antigènes a été fait dans le citrate de sodium 10mM avec un pH à 6,0 et à une température de sous-ébullition pendant 10 à 20 minutes. Après le bain dans l'eau oxygénée 3%, les anticorps primaires d'intérêt ont été placés sur les sections et incubés à 4°C pendant toute la nuit (16h). Les sections ont été analysées avec le kit ABC vectastain (vector laboratory) et les anticorps secondaires ont été révélés à l'aide du DAB (3,3'Diaminobenzidine).

Les anticorps anti BMI1 1:300 (abcam), EZH2 1:50 (cell signaling), Sox2 1:1000 (abcam), Ki67 1 :1000 (abcam), GFAP 1:300 (Dako) ont été utilisés.

10. Analyses statistiques

Le test t-student a servi à l'analyse statistique des données avec seuil de signification de 0,05.

Résultats

1. PTC596 et A1016 modifient le taux de BMI1 et d'EZH2 dans les cellules cancéreuses du GBM et les neurones corticaux humains.

Afin de vérifier si PTC596 et A1016 inhibent BMI1 dans les cellules cancéreuses du GBM, nous avons traité les cellules cancéreuses du GBM en culture avec PTC596, A1016 et DMSO pendant 24 heures. Le résultat du western blot montre que BMI1 et EZH2 diminue jusqu'à 30% dans les cellules cancéreuses GBM traitées. Une observation allant dans le même sens concernant EZH2, une histone méthyltransférase du complexe PRC2 non régulée par BMI1 dont le taux était réduit jusqu'à 32%. En outre, nous avons traité en culture sur des plaques non adhérentes les cellules souches cancéreuses du GBM avec PTC596 et A1016 pendant 7 jours. Le résultat montre de petites neurosphères formées par les cellules souches cancéreuses traitées alors que les cellules souches cancéreuses non traitées (DMSO) forment des neurosphères plus grandes avec tendance à la confluence. La figure 10 présente les résultats observés.

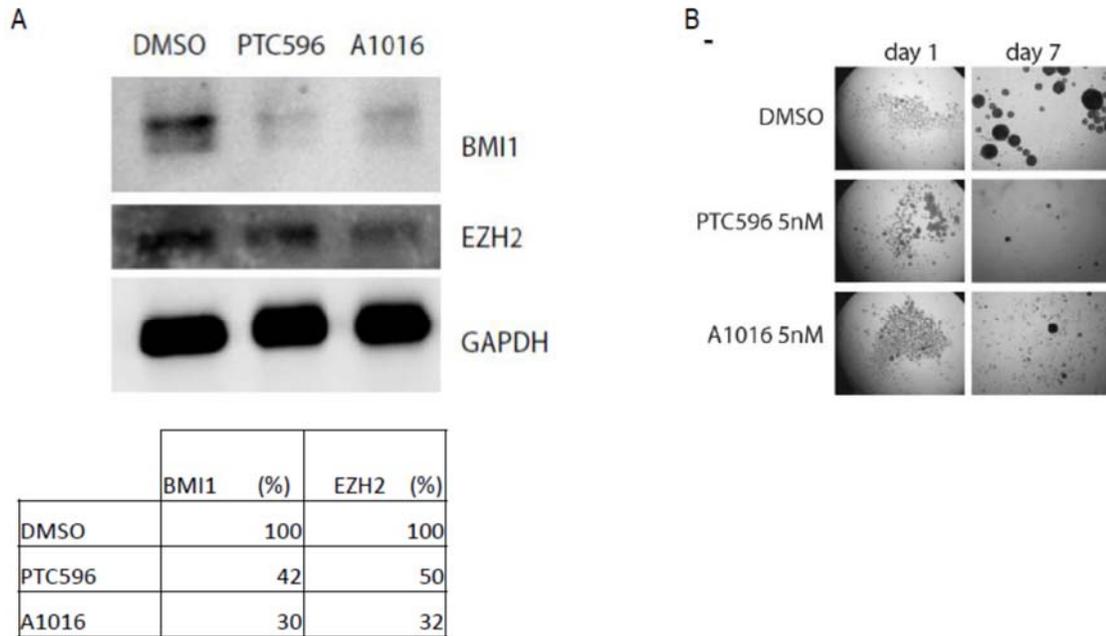


Figure 10. Traitement *in vitro* des cellules cancéreuses du GBM aux PTC596 et A1016.

- (A) Analyse au western blot la réduction du taux de BMI1 et EZH2 dans les cellules cancéreuses du GBM traitées avec PTC596 et A1016 pendant 24h. La quantité de BMI1 et d'EZH2 était normalisée en fonction de GAPDH. Cette expérience a été faite à trois reprises.
- (B) Traitement en culture sur des plaques non adhérentes des cellules souches cancéreuses du GBM aux PTC596, A1016 pendant 7 jours. Expérience répétée 3 fois. DMSO était utilisé comme véhicule et contrôle des effets de PTC596 et A1016.

2. PTC596 améliore la survie des souris ayant le GBM

Dans le but d'évaluer l'efficacité de PTC596 et d'A1016 contre le glioblastome multiforme, les 2 cohortes des souris immunodéficientes ont reçu la greffe intracrânienne des cellules souches cancéreuses du GBM à l'âge de 6 semaines. Par la suite, elles ont été traitées au A1016 et/ ou PTC596 pendant 21 jours. Les résultats montrent que les deux inhibiteurs de BMI1 semblent améliorer la survie médiane de souris traitées (27 à 46 jours) par rapport aux souris non-traitées (5 à 6,5 jours). La figure 11 présente les résultats de la survie des souris greffées et traitées au PTC596 et A1016.

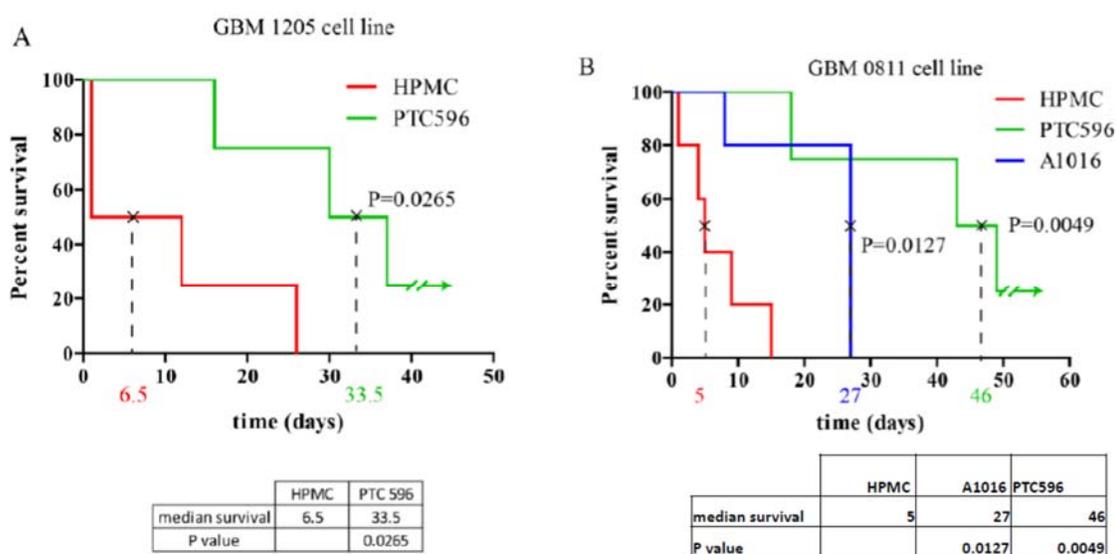


Figure 11. Diagramme de Kaplan-Meier de la survie des souris traitées aux PTC596 et A1016 après greffe intracrânienne des cellules souches cancéreuses du GBM. A) La survie des souris ayant reçu la greffe des cellules souches du GBM de la lignée 1205 et gavées avec le PTC596 12mg/kg a été comparée à celle des souris contrôle gavées avec l'HPMC (Hydroxypropylméthylcellulose). Dès l'apparition des symptômes, ces souris (5/groupe) ont été gavées tous les 3 jours pendant 21 jours. La survie médiane est de 33,5 jours pour le groupe traité et de 6,5 jours pour le groupe contrôle (* : $p < 0,05$). Cette observation a été faite à deux reprises. B) La survie des souris ayant reçu la greffe des cellules souches du GBM de la lignée 0811 et traitées aux PTC596 12 mg/kg tous les 3 jours et A1016 12 mg/kg/jour à partir de l'apparition des symptômes, était comparée aux souris non-traitées (HPMC). 5 souris par groupe ont été gavées pendant 21 jours dès l'apparition des symptômes. La survie médiane était de 46 et 27 jours respectivement pour PTC596 et A1016. Elle est de 5 jours

chez des souris non-traitées (** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$). Les résultats obtenus avec A1016 sont préliminaires, n'ayant été fait qu'une fois.

3. Les cellules souches cancéreuses du GBM reproduisent la tumeur in vivo

Afin de s'assurer de la formation in vivo du glioblastome multiforme à partir des cellules souches cancéreuses du GBM, les cerveaux des souris ayant subi la transplantation intracrânienne des CSG puis euthanasiées pendant ou après le traitement, ont été sectionnés au microtome, ensuite colorés à l'hématoxyline-éosine suivies d'un marquage de la GFAP à l'IHC. Les résultats confirment la présence de la tumeur par histologie. La figure 12 montre les images du glioblastome multiforme formé dans les cerveaux des souris ayant subi la greffe intracrânienne des cellules souches cancéreuses du GBM.

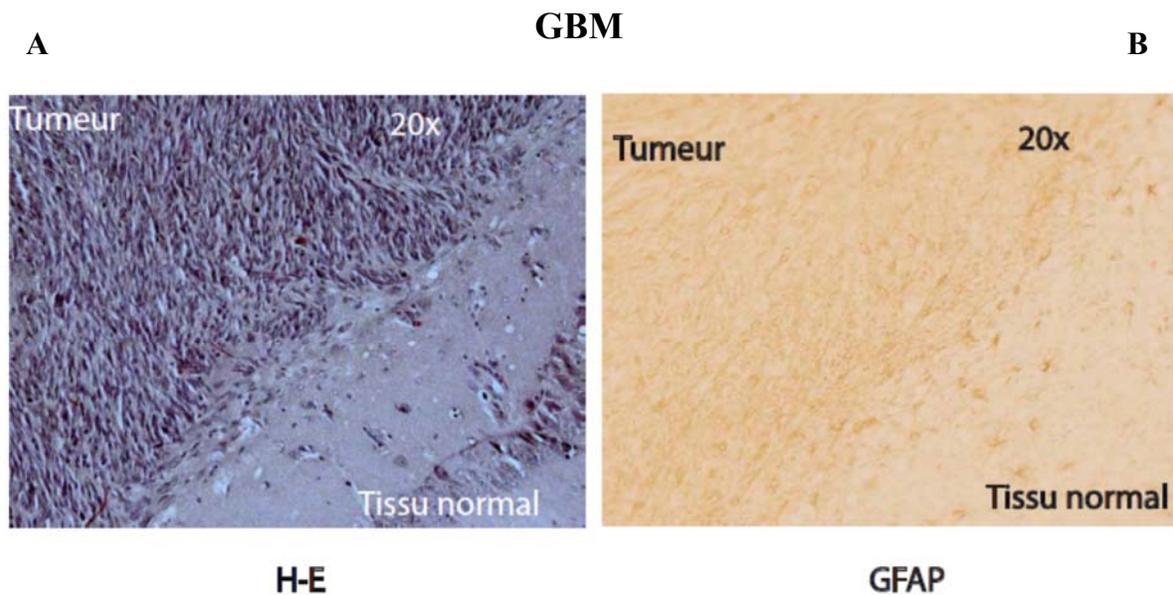


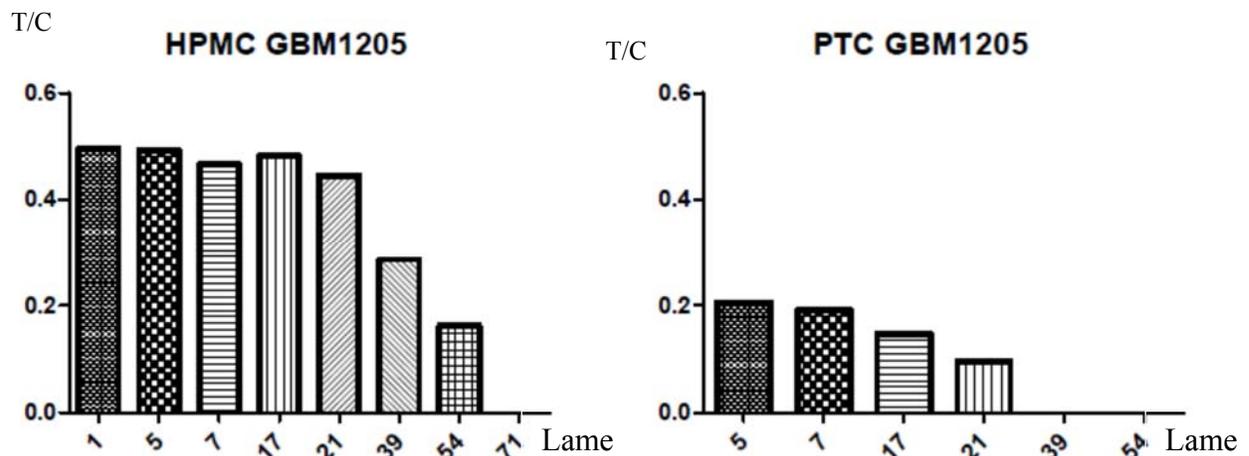
Figure 12. Formation du glioblastome dans le cerveau de souris à partir des cellules souches cancéreuses du GBM humain.

- (A) Coloration à l'hématoxyline-éosine du cerveau d'une souris ayant subi la greffe intracrânienne des cellules souches cancéreuses du GBM. On note une zone tumorale très riche en cellules.
- (B) Immunohistochimie de ce cerveau montre une zone tumorale prenant un bon marquage de la GFAP (Glial fibrillary acidic protein), une protéine exprimée spécifiquement par les cellules gliales.

4. PTC596 permet de réduire le volume tumoral

Le volume tumoral étant l'un des éléments essentiels pour la traduction clinique du GBM suite à l'élévation de la pression intracrânienne qui en découle, nous l'avons évalué chez des souris ayant reçu la greffe des cellules souches cancéreuses du GBM et traitées avec PTC596. Des sections cérébrales des souris ont été faites à plusieurs niveaux afin de faire une représentation tridimensionnelle de la tumeur faite des moyens d'imagerie médicale (IRM ou CT-scan). Après coloration à l'hématoxyline-éosine et le marquage à l'IHC des antigènes exprimés par les cellules tumorales, les images en mosaïque nous ont permis de reconstituer les sections de cerveaux des souris. Les résultats montrent une tumeur qui occupe près de 50% du cerveau des souris non-traitées alors qu'elle occupe moins de 20% du cerveau des souris traitées avec PTC596. La figure 13 présente les résultats observés.

A



B

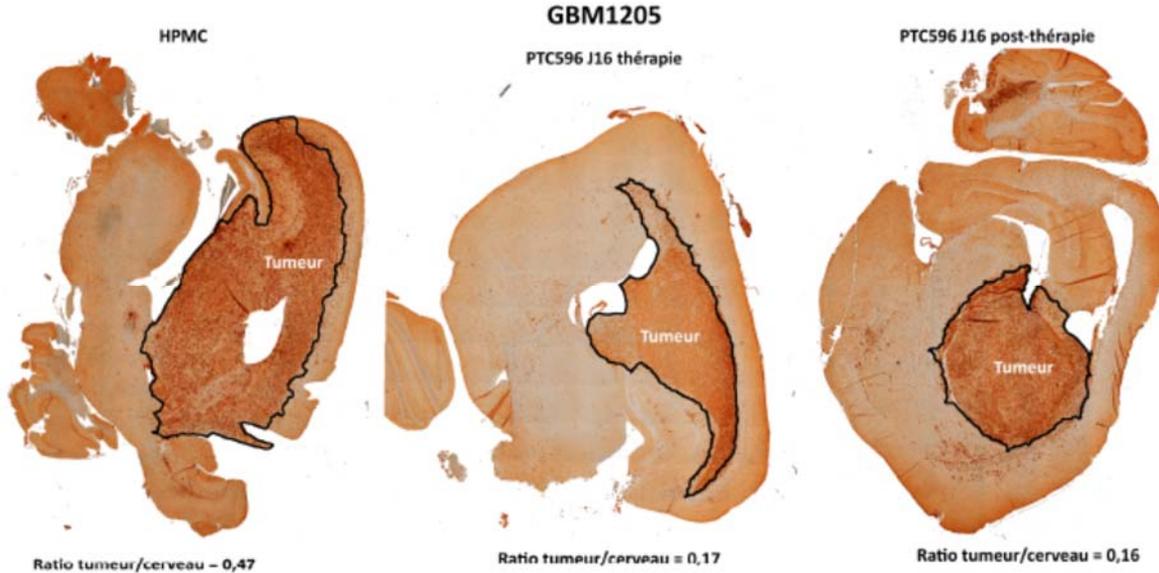


Figure 13. Estimation du volume tumoral dans le cerveau des souris greffées et traitées au PTC596.

- (A) Ratio tumeur-cerveau sur des sections sagittales du cerveau réalisées à différent niveau. Chaque niveau étant représenté par une lame comportant trois sections de $8\mu\text{m}$. La tumeur occupe moins de 20% du cerveau chez des souris traitées au PTC596. Les groupe contrôle avait un volume tumoral d'environ 50% du cerveau. Cette expérience a été faite 2 fois avec 5 souris par groupe d'étude, $p < 0,001$.
- (B) Images d'illustration de la surface tumorale par le marquage de sox2 à l'immunohistochimie chez les souris non traitées et celles traitées au PTC596. Le GBM occupe près de 20% de la surface cérébrale des souris traitées (2 semaines de traitement et 2 semaines après traitement) contre 47% dans le groupe contrôle.

T : tumeur C : cerveau

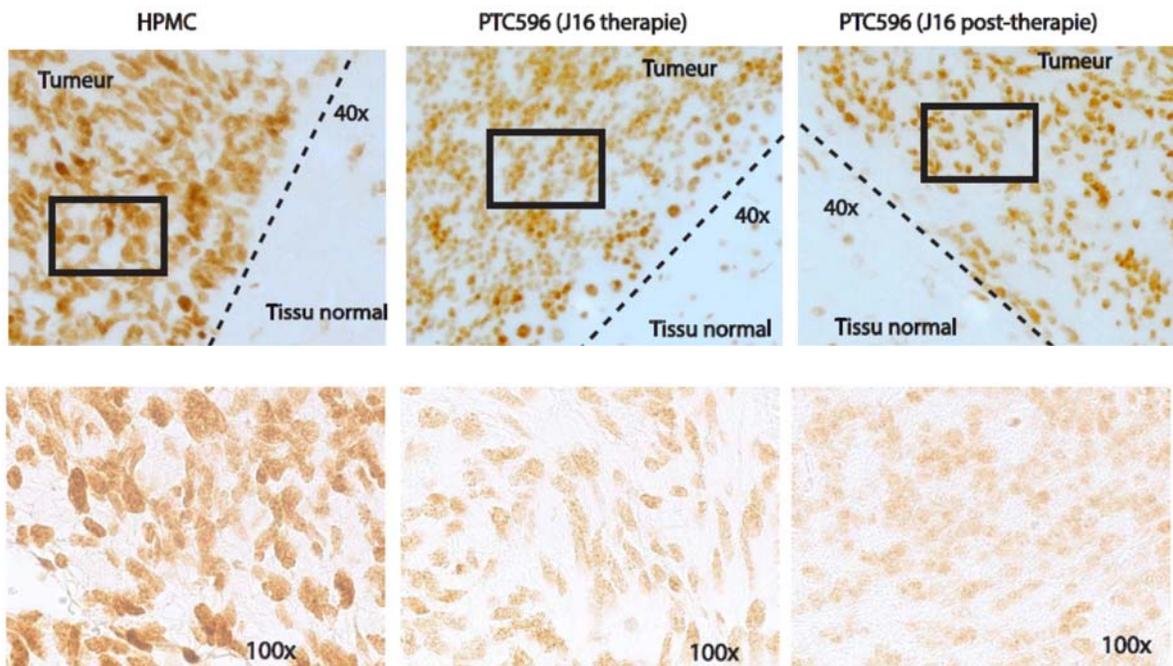
5. PTC596 et A1016 diminuent BMI11, EZH2 et la prolifération des cellules du GBM in vivo

La prolifération cellulaire continue étant une caractéristique majeure des cellules cancéreuses, nous avons par IHC évalué les effets des inhibiteurs des BMI1 sur la prolifération des populations cellulaires du GBM en appréciant l'expression de Ki67 sur le cerveau des souris traitées après greffe intracrânienne des cellules souches cancéreuses du GBM. Bien avant, nous avons évalué BMI1 et EZH2 par IHC. Le résultat montre une diminution du nombre et de l'intensité des noyaux positifs en BMI1, EZH2 et Ki67 sur la tumeur des cerveaux des souris euthanasiées pendant et deux semaines après le traitement au PTC596. La Figure 14 illustre la prolifération in vivo des cellules du GBM traité par les inhibiteurs de BMI1.

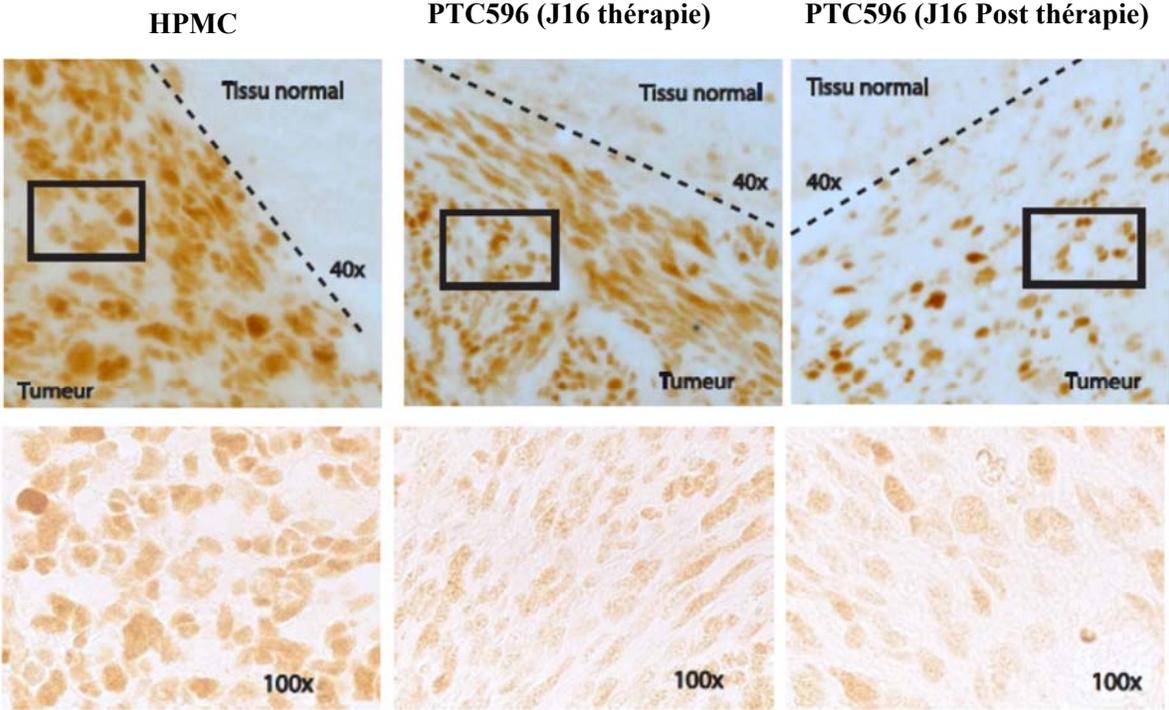
(A)

GBM1205

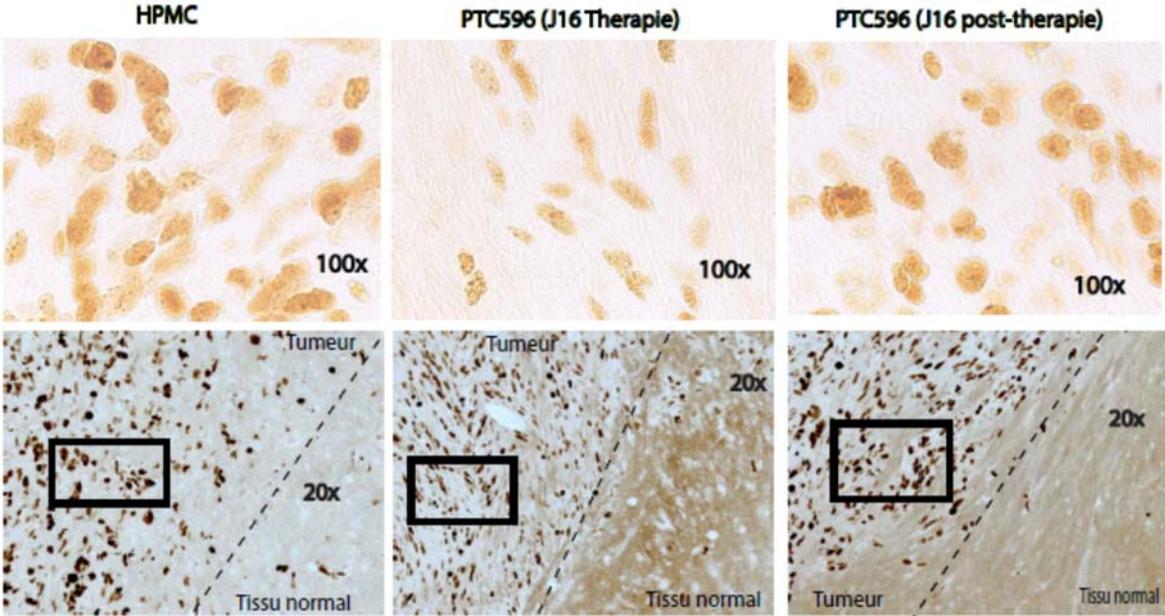
BMI1



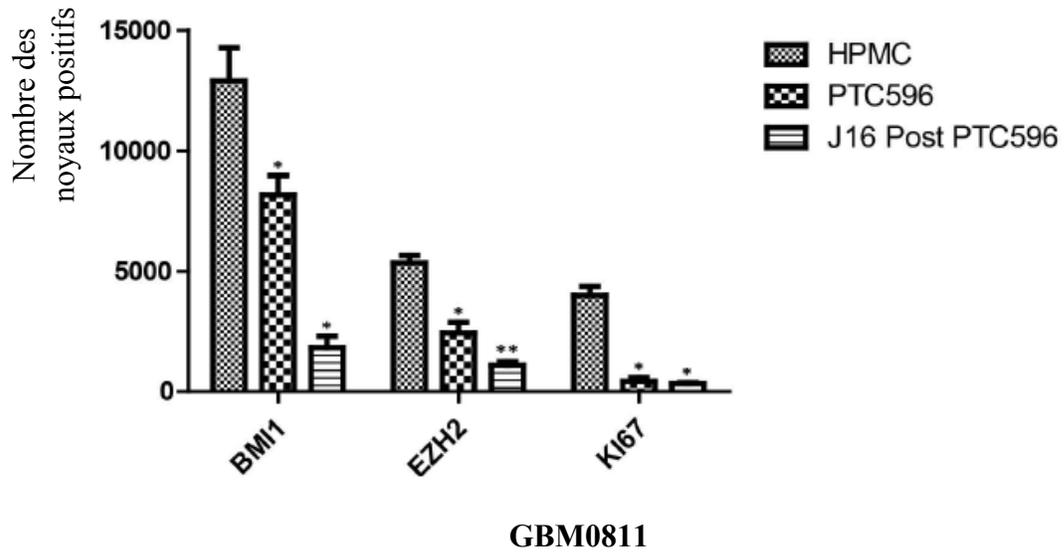
EZH2



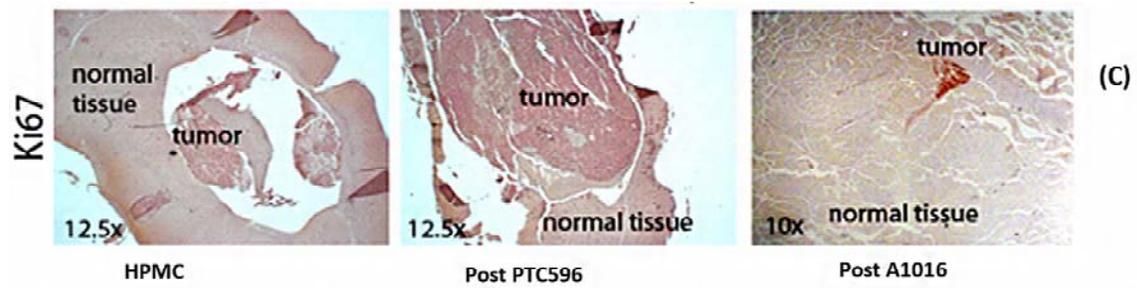
KI67



(B)



(C)



(D)

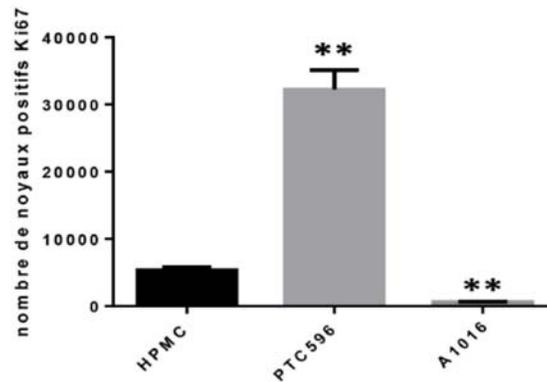
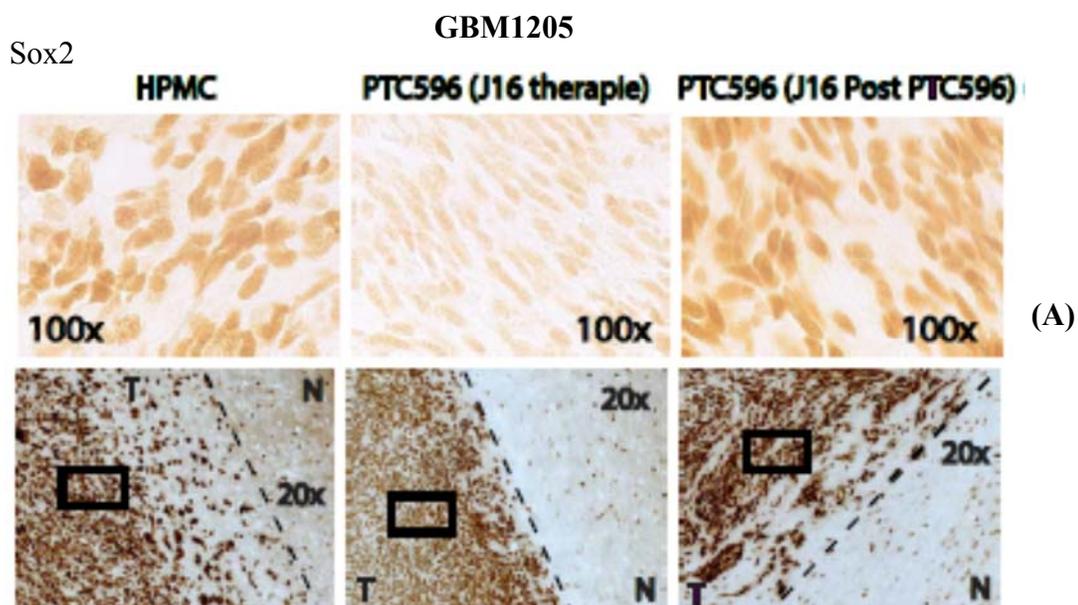


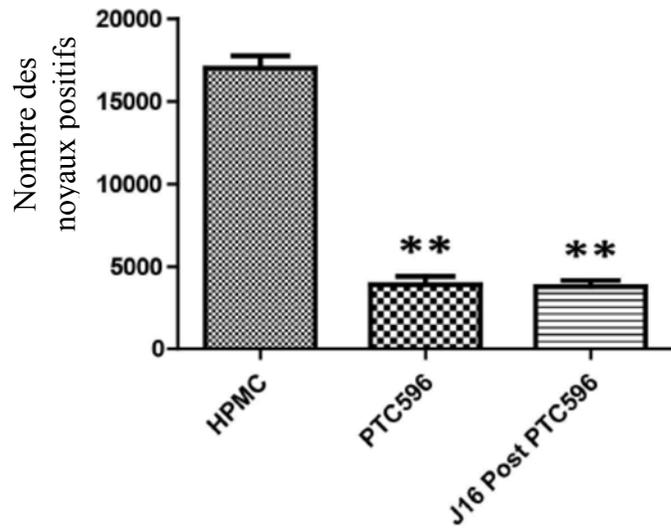
Figure 14. Evaluation de BMI1, EZH2 et de la prolifération cellulaire dans le modèle murin de GBM traité avec les inhibiteurs de BMI1.

- (A) Immunohistochimie de BMI1, EZH2 et Ki67 sur les sections des cerveaux des souris de la 1^{ère} cohorte ayant reçu la greffe intracrânienne des cellules souches cancéreuses du GBM de la lignée 1205 et traitées avec PTC596 a révélé une diminution de l'intensité du signal pour BMI1 et d'EZH2 pendant et après le traitement. Le signal de Ki67 diminue pendant le traitement avec une tendance à la remontée 2 semaines après le traitement. HPMC était administré pour le contrôle des souris traitées (n=5).
- (B) Quantification de BMI1, EZH2 et Ki67 sur des sections de cerveaux des souris greffées avec les cellules souches cancéreuses du GBM et traitées avec PTC596 montre une diminution du nombre de noyaux positifs en BMI1, EZH2 et Ki67 dans le GBM des souris traitées (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$).
- (C) Immunohistochimie de Ki67 sur les sections des cerveaux des souris ayant reçu la greffe intracrânienne des cellules souches cancéreuses du GBM de la lignée 0811 et traitées avec PTC596 et A1016. Deux semaines après le traitement, elle montre une diminution du niveau de Ki67 dans le groupe ayant reçu A1016 contre une augmentation du niveau de Ki67 dans le groupe ayant reçu PTC596.
- (D) Quantification de Ki67 sur des sections de cerveaux des souris greffées avec les cellules souches cancéreuses du GBM et traitées avec PTC596 et A1016 montrant une diminution du nombre des noyaux positifs en Ki67 dans le groupe ayant reçu A1016 et une augmentation des noyaux positifs dans le groupe ayant reçu PTC596 (n=5). ** : $p < 0,01$.

6. PTC596 induit un changement du phénotypique du GBM

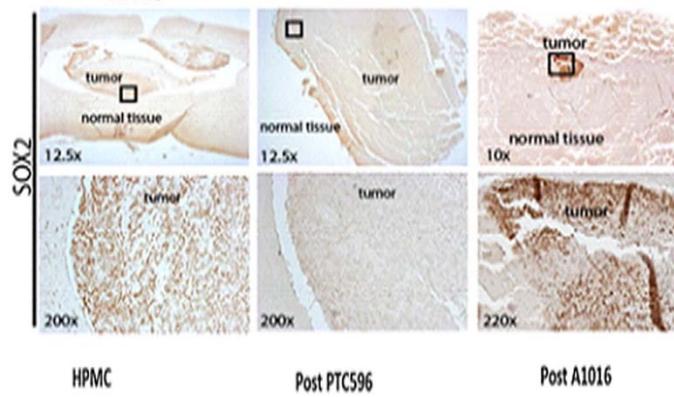
Sachant que les cellules souches cancéreuses du GBM utilisées lors de la greffe intracrânienne sont de type proneural et exprime les protéines Sox2 et CD133 (99), nous avons analysé par IHC Sox2 sur le cerveau des souris traitées par PTC596 et A1016. Les images montrent dans la première cohorte des souris qui ont reçu la greffe de CSG de la lignée 1205, une réduction en intensité de Sox2 sur la tumeur pour PTC596, de même pour la lignée de CSG 0811. Cette intensité remonte 2 semaines après arrêt du traitement. Cependant, on note dans la deuxième cohorte (souris ayant été greffées avec des CSG de la lignée 0811), une expression quasi-nulle de Sox2 dans la tumeur des souris euthanasiées 3 semaines post-thérapie au PTC596. La figure 15 présente les images de l'expression tumorale de Sox2 dans les souris traitées par les inhibiteurs pharmacologiques de BMI1 après greffe intracrânienne de cellules souches cancéreuses du GBM des lignées 1205 et 0811.





(B)

GBM0811



(C)

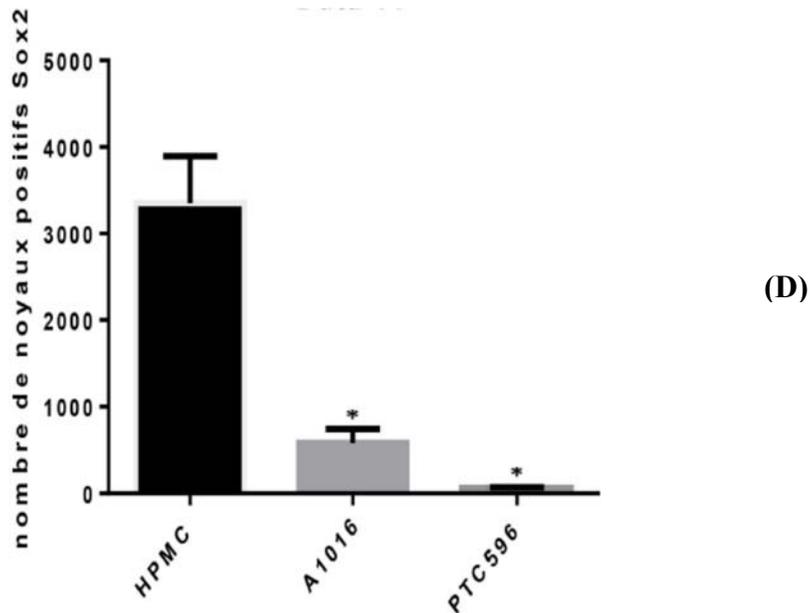


Figure 15 Identification des cellules souches cancéreuses du GBM par l'immunomarquage de sox2 sur des sections cérébrales des souris ayant reçu la greffe intracrânienne des cellules souches cancéreuses du GBM.

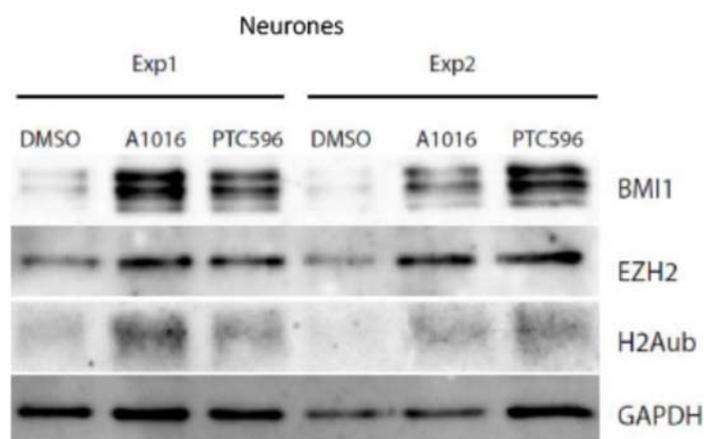
- (A) Le marquage par IHC de sox2 sur les sections cérébrales des souris ayant reçu la greffe des cellules souches du glioblastome de la lignée 1205 et le traitement au PTC596 montre une diminution du signal pendant le traitement, suivie de son augmentation deux semaines après le traitement.
- (B) Quantification de sox2 sur les sections cérébrales des souris ayant reçu la greffe des cellules souches du glioblastome de la lignée 1205 et le traitement au PTC596. Le graphique montre une diminution significative des noyaux positifs en sox2 dans le groupe traité (pendant et 2 semaines après le traitement). HPMC était utilisé comme véhicule et contrôle (**: $p < 0,01$).
- (C) Le marquage par IHC de sox2 sur les sections cérébrales des souris ayant reçu la greffe des cellules souches du glioblastome de la lignée 0811 et le traitement aux PTC596 et A1016 montre une diminution du signal dans le groupe traité avec A1016 et un signal quasi absent de sox2 dans le groupe traité avec PTC596.
- (D) Quantification de sox2 sur les sections cérébrales des souris ayant reçu la greffe des cellules souches du glioblastome de la lignée 0811 et le traitement aux PTC596 et A1016. On note une diminution significative des noyaux positifs en sox2 dans les deux

groupes traités, sox2 étant quasiment absente dans le GBM des souris traitées avec PTC596 (n=5 par groupe, * : $p < 0,05$).

T : tumeur, N : tissu normal

7. PTC596 et A1016 augmentent BMI1 et EZH2 dans les neurones humains.

En se basant sur une récente étude d'Antony Flamier qui décrit le rôle de la déficience en BMI1 dans le développement de la maladie d'Alzheimer sporadique, il était nécessaire de déterminer les effets des PTC596 et A1016 dans les neurones humains (92). Nous avons réalisé deux expériences indépendantes consistant chacune au traitement par PTC596 et A1016 pendant 24 heures des neurones humains dérivés des cellules souches embryonnaires, l'immunoblot a révélé une majoration de BMI1 et d'EZH2 allant respectivement jusqu'à plus de 10 et 7 fois le taux dans les neurones non traités. Une majoration de plus de 10 fois le contrôle était aussi observée sur H2Aub, une histone 2A ubiquitinée impliquée dans la voie de signalisation de BMI1. La figure 16 présente les résultats observés.



Expérience 1

	BMI1 (%)	EZH2 (%)	H2Aub (%)
DMSO	100	100	100
A1016	1304	180	357
PTC596	768	133	171

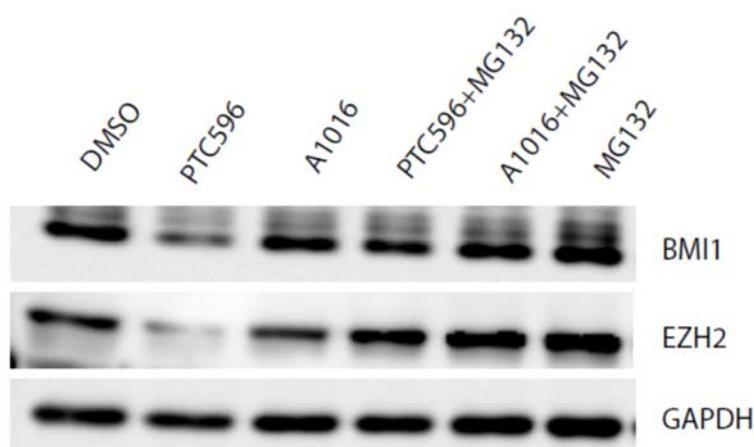
Expérience2

	BMI1 (%)	EZH2 (%)	H2Aub (%)
DMSO	100	100	100
A1016	1081	367	579
PTC596	3244	751	1416

Figure 16. Western blot des neurones humains traités avec les inhibiteurs de BMI1 (PTC596 et A1016 50 nM). Deux expériences réalisées sur des neurones dérivés de deux lignées de cellules souches embryonnaires. Les niveaux de BMI1, EZH2 et H2Aub sont normalisés en fonction du niveau de GAPDH. Le DMSO était utilisé pour le contrôle des neurones traités.

8. PTC596 et A1016 favorisent la dégradation de BMI1 et EZH2 par le protéasome

PTC596 et A1016 favoriseraient la dégradation de BMI1. Nous avons vérifié l'implication du protéasome dans la pharmacodynamique de ces inhibiteurs de BMI1 en traitant les 293FT avec PTC596, A1016, combinaison inhibiteur de BMI1 et inhibiteur du protéasome (MG132) pendant 24 heures. Le western blot montre une diminution de BMI1 et EZH2 par PTC596 et A1016 ainsi qu'une majoration de BMI1 et EZH2 lorsque l'inhibiteur du protéasome est utilisé. La figure 17 montre les variations des BMI1 et EZH2 dans les 293FT traités avec les inhibiteurs de BMI1 et/ou l'inhibiteur du protéasome.



	BMI1(%)	EZH2(%)
DMSO	100	100
PTC596	39	22
PTC596+MG132	56	85
A1016	79	80
A1016+MG132	103	111
MG132	114	118

Figure 17. Quantification de BMI1 et EZH2 par western blot sur des 293FT traités avec un inhibiteur de BMI1 et/ou inhibiteur du protéasome. Les niveaux de BMI1 et d'EZH2 sont normalisés en fonction du niveau de GAPDH. Le DMSO était utilisé pour le contrôle de

Cellules 293FT traités. Les résultats de cette expérience sont préliminaires, n'ayant été faite qu'une fois sur un duplicata de 293FT.

Discussion

1. PTC596 et A1016 modifient le taux de BMI1 et d'EZH2 dans les cellules cancéreuses du GBM et les neurones corticaux humains.

La diminution de l'expression de BMI1 par mutation ou par des inhibiteurs pharmacologiques de BMI1 régule à la baisse la prolifération et l'auto-renouveaulement des cellules du GBM, plus particulièrement des cellules souches cancéreuses *in vitro* et *in vivo* (63, 98, 99). Ainsi, nous avons pour de raison pratique, testé deux inhibiteurs de BMI1, PTC596 et A1016, des molécules ayant la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique afin d'évaluer et prédire *in vitro* leur efficacité thérapeutique, les effets secondaires sur les cellules normales. Tenant compte de la CI50 et de la demi-vie de chaque principe actif, nous avons traité les cellules cancéreuses du GBM et les neurones pendant 24h puis pendant 2 semaines avec nos inhibiteurs. Nous avons noté la diminution de BMI1 dans cellules cancéreuses du GBM (Figure 10A). Cependant, dans une étude réalisée en 2018 par Anthony Flamier, la répression du gène BMI1 dans les neurones corticaux induit l'apparition de la maladie d'Alzheimer sporadique (92). Etant donné que les inhibiteurs de BMI1 agissent dans le même sens, nous avons traité pendant 24 heures un duplicata des neurones humains dérivés de cellules souches embryonnaires par PTC596 et A1016 afin de prédire le risque sur les maladies neurodégénératives. Nous avons observé une majoration de plus de 10 fois du taux de BMI1 dans les neurones corticaux traités par rapport au contrôle (Figure 16). Nous pensons que PTC596 et A1016 étant des composés qui agissent en activant la kinase Cdk1 de la phase G2 et transition G2/M du cycle cellulaire, seules les cellules cancéreuses et les autres cellules en division sont les plus sensibles à ces drogues, les neurones étant des cellules post-mitotiques, sont logiquement protégés contre les effets inhibiteurs de ces drogues. Par ailleurs, reste à savoir de quelle façon ces deux drogues rehaussent l'expression de BMI1 dans les neurones corticaux et dans quel aspect thérapeutique peut-on mettre à profit l'atout de ces drogues sur la prise en charge des maladies neurodégénératives. En outre des essais *in vivo* de ces deux drogues sur des neurones sains permettraient de confirmer les observations *in vitro*.

Certaines études ont révélé une expression plus marquée d'EZH2, une histone méthyltransférase appartenant au groupe polycomb PRC2 dans certain sous-groupe de GBM,

notamment celui ayant un phénotype proneural ou classique (100). Dans certains cas, on note à la fois une forte expression de BMI1 et d'EZH2 comme régulateurs du destin des CSG. Nous avons constaté que PTC596 et A1016 présente un effet off target sur EZH2, qui à l'instar de BMI1 se voit diminuer dans les CSG, ce qui permet à ces molécules pharmacologiques de cibler à la fois le complexe PRC1 et PRC2 (Figure 10A).

En outre, PTC596 et A1016 ont sensiblement réduit le nombre des neurosphères des CSG in vitro en 2 semaines de traitement (Figure 10B).

2. PTC596 améliore la survie des souris ayant le GBM

Une étude de 2018 avait déjà comparé l'efficacité in vivo de PTC209, un autre inhibiteur de BMI1, par rapport au TMZ ou au contrôle sur des souris immunodéficientes chez qui une greffe intracrânienne des CSG avait été réalisée et ayant révélé l'amélioration de la survie des souris traitées avec PTC209 par rapport aux 2 autres groupes (98). Cependant, l'administration de cet inhibiteur de BMI1 une semaine après greffe intracrânienne ne permet pas de bien évaluer l'efficacité du traitement étant donné que ce laps de temps ne permet pas un développement optimal de la tumeur. Dans une autre étude similaire de 2017, PTC596 et un inhibiteur d'EZH2 (EPZ6438) étaient administrés après 4 jours ou 10 jours en fonction de la détection de la luciférine sur des CSG transplantées sur des souris immunodéficientes, la survie médiane de ces souris était majorée d'une semaine et de 3 semaines respectivement avec PTC596 et la combinaison PTC596-EPZ6438 par rapport au contrôle (99). Comme l'étude précédente, la période de développement tumoral après greffe reste non optimale pour en tirer une conclusion objective. La présente étude accorde un temps optimal au développement tumoral attesté par l'apparition de la symptomatologie chez des souris à partir de laquelle le traitement au PTC596 a été initié. Nous avons noté dans la première cohorte de souris, à partir du début du traitement, une survie médiane de 33,5 jours chez des souris traitées avec PTC596 par rapport aux souris contrôle (figure 11A). Dans la deuxième cohorte, cette survie médiane était de 46 jours et 27 jours pour des souris traitées respectivement avec PTC596 et A1016 (figure 11B), résultat allant dans le même sens de celui obtenu sur des souris ayant subi une greffe intracrânienne des CSG ayant une délétion du gène BMI1(63). Bien que 75% de ces souris traitées avec A1016 aient survécu tout au

long du traitement, nous avons cependant observé leur décès au sixième jour post-thérapeutique, la toxicité médicamenteuse semble la raison la plus plausible.

3. Les cellules souches cancéreuses du GBM reproduisent la tumeur in vivo

Etant donné que le GBM comme les autres cancers présentent une cellularité importante suite à des divisions cellulaires permanentes et illimitées, nous avons par coloration à l'hématoxyline-éosine et le marquage à l'immunohistochimie de la GFAP, une protéine fibrillaire exprimée par les cellules du GBM, afin d'évaluer la cellularité et de localiser le GBM induit chez les souris. Nous avons observé sur chaque coupe, une zone très riche en cellule (figure 12A) et prenant un bon marquage de la GFAP (figure 12B), ce résultat correspond aux observations de 2009 des expériences d'Abdoul et al (63).

4. PTC596 permet de réduire le volume tumoral

Le volume tumoral étant déterminant pour la traduction clinique du GBM et la survie des patients, il était nécessaire d'en savoir l'évolution. Cependant nous n'avons pas pu réaliser un suivi tumoral par tomodensitométrie et par détection de la luciférine suite respectivement au manque de la logistique et à l'échec de la transfection du lentivirus de la luciférase à des CSG pour des raisons encore non identifiées. Néanmoins, nous avons réalisé la coloration à l'hématoxyline-éosine sur des cerveaux des souris euthanasiées en cours de traitement et de celles décédées une semaine après la fin du traitement. Par des images en mosaïque de reconstitution de la surface des tranches de section, nous avons noté que surface tumorale représentait environ 20% du volume du cerveau des souris traitées avec PTC596 alors qu'elle était de près de 50% chez la souris non traitées (figure 13). Ce résultat atteste l'efficacité de PTC596.

5. PTC596 et A1016 diminuent la prolifération des cellules du GBM in vivo

Les expériences in vitro ayant donné des résultats satisfaisants, nous avons d'abord vérifié indirectement si PTC596 atteignait sa cible au niveau cérébral au regard de la barrière hémato-encéphalique qui constitue l'obstacle majeur à la diffusion des médicaments, en évaluant le marquage de BMI1 et EZH2 par IHC de cerveaux des souris traitées après greffe intracrânienne des CSG. Nous avons observé une diminution de l'expression de ces protéines

sur les tumeurs des souris euthanasiées pendant ou 2 semaines après le traitement au PTC596 le par rapport aux tumeurs contrôles (figure 14A et 14B).

À l'instar des résultats *in vitro*, nous avons noté une baisse de la prolifération cellulaire dans la tumeur traduite par un faible marquage de Ki67 sur les tumeurs en cours de traitement au PTC596 et A1016 par rapport aux tumeurs non traitées (figure 14A-14D). Par contre, le marquage de Ki67 était rehaussé sur les tumeurs des souris euthanasiées 2 semaines après la fin du traitement, ce phénomène était plus marqué dans la lignée 0811 de GBM, suggérant une tendance à la récurrence tumorale (figure 14C et 14D).

6. PTC596 induit un changement du phénotypique du GBM

Vu que les cellules souches cancéreuses proneurales exprimant le marqueur CD133+ et Sox2, ont été injectées chez les souris dans le but de former le GBM *in vivo*, nous avons évalué Sox2 sur des traitées. Il a été constaté une réduction des cellules souches cancéreuses du GBM traduite par une baisse de marquage de Sox2 sur des tumeurs en cours de traitement au PTC596 (figure 15), fait également observé par Y. Kong et al dans une étude similaire testant PTC209, un autre inhibiteur de BMI1 (98). Cependant, les tumeurs formées à partir de cellules souches cancéreuses de la lignée 0811 chez des souris traitées avec PTC596 et euthanasiées 2 semaines après traitement avaient un marquage presque nul de sox2 suggérant un changement de phénotype cellulaire, une transition épithélio-mésenchymateuse est la plus probable (figure 15C et 15D).

7. PTC596 et A1016 favorisent la dégradation de BMI1 par le protéasome

Etant décrits comme des molécules qui favoriseraient la dégradation de BMI1 via la phosphorylation par la Cdk1 de la phase G2 et transition G2/M du cycle cellulaire, nous avons cherché à savoir si le protéasome était réellement impliqué dans le mécanisme d'action de PTC596 et A1016. Ainsi, les cellules 293FT étaient traitées pendant 24 heures avec PTC596, A1016, MG132 (un inhibiteur du protéasome), la combinaison PTC596-MG132, combinaison A1016-MG132 et le DMSO. Nous avons noté une baisse significative du taux de BMI1 dans les 293FT traités avec PTC596 en monothérapie par rapport à celui des cellules traitées avec la combinaison PTC596-MG132. Curieusement, la diminution de BMI1 n'était

pas significative dans les 293FT traitées avec A1016 en monothérapie par rapport à la combinaison A1016-MG132.

En outre, nous avons noté que le taux d'EZH2 était significativement bas dans les 293FT traitées avec PTC596 et A1016 en monothérapie par rapport aux combinaisons PTC596-MG132 et A1016-MG132, suggérant que ces deux inhibiteurs de BMI1 induisent aussi la dégradation d'EZH2 par le protéasome. Mais la question est de savoir si ces 2 molécules initient la dégradation d'EZH2 par l'activation de la kinase Cdk1.

Conclusion

Cette étude a permis de produire un modèle animal de glioblastome multiforme à partir duquel différents types d'essais précliniques et cliniques peuvent être réalisés en vue de trouver des alternatives thérapeutiques plus efficaces au traitement standard.

Nous avons démontré dans cette étude que les inhibiteurs pharmacologiques de BMI1, PTC596 et A1016 semblent améliorer la survie des souris ayant un glioblastome multiforme induit, par la réduction significative de la prolifération cellulaire et de la masse tumorale.

Le décès de la majorité des souris traitées avec A1016 semble être dû à la toxicité médicamenteuse. La réduction de la dose thérapeutique pourrait améliorer davantage la survie de souris.

La rechute du GBM reste un problème majeur dans la prise en charge. Dans certaines lignées de GBM, PTC596 induit un changement de phénotype sur la tumeur récidivante faisant évoquer une transition épithélio-mésenchymateuse.

Par les effets de ces molécules sur leur cible cérébrale, cette étude confirme la diffusion de PTC596 et A1016 à travers la barrière hémato-encéphalique et ouvre la voie à des essais précliniques sur d'autres tumeurs du système nerveux central.

PTC596 et A1016 permettent de cibler à la fois BMI1 et EZH2 faisant partie respectivement du complexe PRC1 et PRC2 des protéines du groupe polycomb.

Si l'effet inducteur de PTC596 et A1016 sur BMI1 dans les neurones corticaux humains se confirme par des expériences ultérieures in vitro et in vivo, ces 2 drogues pourraient servir à ralentir ou stopper la progression de certaines maladies neurodégénératives, particulièrement la maladie d'Alzheimer.

Perspectives

Le glioblastome multiforme étant une tumeur récidivante et au regard de sa radiosensibilité majorée par la déficience en BMI1, les études ultérieures devraient combiner un inhibiteur de BMI1 à la radiothérapie afin d'améliorer davantage la survie des souris ayant le GBM.

Une association d'un inhibiteur de BMI1 avec un antimitotique classiquement utilisé dans le traitement du GBM serait aussi souhaitable, de même un traitement cyclique par les inhibiteurs de BMI1 avec des intervalles libres pour éviter l'effet cumulatif toxique de ces drogues.

Il serait également très utile de suivre les souris ayant reçu la greffe de cellules souches du glioblastome par les examens d'imagerie médicale (Imagerie par résonance magnétique ou scanner cérébral) avant, pendant et après le traitement aux inhibiteurs de BMI1.

Enfin, des essais cliniques chez des patients permettraient de valider chez l'homme les résultats obtenus in vivo.

Références

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; 114:97-109.
2. Kleihues PC, Cavenee WK. *Tumours of the Nervous System*. IARC Press, 2000, 55, 314.
3. ALMAIRAC F, Paquis P. Glioblastomes. *Encyclopédie de neurochirurgie*, 2015.
4. Kroonen J, Nguyen-Khac M.T, Deprez M, Rogister B, Robe P. Les glioblastomes, un exemple de recherche translationnelle ? *Rev Med Liege* 2008; 63 : 5-6 : 251-256
5. Baldi I, Huchet A, Bauchet L, Loiseau H. Epidemiology of glioblastoma. *Neurochirurgie*. 2010; 56(6):433-40.
6. Zouaoui S, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Darlix A, Bessaoud F, Fabbro-Peray P et al. L. Recensement national histologique des tumeurs primitives du système nerveux central : résultats généraux sur 40 000 cas, principales applications actuelles et perspectives. *Neurochirurgie* 2012;58:4-13.
7. Loiseau H, Huchet A, Rué M, Cowppli-Bony A, Baldi I. [Epidemiology of primary brain tumor]. *Rev Neurol (Paris)*. 2009 Sep; 165(8-9):650–70.
8. Stupp Rs, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005; 352:987-96.
9. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*. 2001; 95:190-8.
10. Hottinger AF, Stupp R. Therapeutic strategies for the management of gliomas. *Rev Neurol*. 2008:523-30.
11. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008; 359:492-507.
12. Stupp R, Hegi M. E, Mason W. P, Van den Bent M. J, Taphoorn M. J, Janzer R. C et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009; 5:459-466.

13. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006; 7: 392-401.
14. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*, 2005, 109: 93-108.
15. Jeannin S, Lebrun C, Van Den Bos F, Olschwang S, Bourg V, Frenay M. Turcot's syndrome confirmed by molecular biological tests. *Rev. Neurol. (Paris)* 2006; 162: 741–746.
16. Melean G, Sestini R, Ammannati F, Papi L. Genetic insights into familial tumors of the nervous system. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 2004, 129C: 74–84.
17. Birch J.M. Li-Fraumeni syndrome. *Eur. J. Cancer* 1994, 30A: 1935–1941.
18. Varley J.M. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum. Mutat.* 2003, 21: 313–320.
19. Nishizaki T, Ozaki S, Harada K, et al. Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 1998; 21: 340-6.
20. Parsons D, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008; 321: 1807-12.
21. Watanabe K, Peraud A, Gratas C, et al. p53 and PTEN gene mutations in gemistocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol (Berl.)* 1998; 95: 559-64.
22. Meyer J, Mueller W, et al. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol (Berl.)* 2008; 116: 597-602.
23. Hermanson M, Funa K, Hartman M, et al. Plateledderived growth factor and its receptors in human glioma tissue: Expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res* 1992; 52: 3213-9.
24. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastomas. *Am J Pathol* 2007; 170:1445-53.

25. Figarella-Branger D, Colin C, Tchoghandjian A, Baeza N, Bouvier C. [Glioblastomas : gliomagenesis, genetics, angiogenesis, and microenvironment]. *Neurochirurgie* 2010; 56: 441-8.
26. Faury D, Nantel A, Dunn SE, et al. Molecular profiling identifies prognostic subgroups of pediatric glioblastoma and shows increased YB-1 expression in tumors. *J Clin Oncol* 2007 ; 25 : 1196-208.
27. Haque T, Faury D, Albrecht S, et al. Gene expression profiling from formalin-fixed paraffin-embedded tumors of pediatric glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6284-92.
28. Paugh BS, Qu C, Jones C, et al. Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3061-8.
29. Qu HQ, Jacob K, Fatet S, et al. Genome-wide profiling using single-nucleotide polymorphism arrays identifies novel chromosomal imbalances in pediatric glioblastomas. *Neuro Oncol* 2010; 12: 153-63.
30. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009; 360: 765-73.
31. Verreault M, Delattre JY, Ahmed Idbah A. Les tumeurs gliales diffuses de l'adulte : heterogeneite genetique et implications therapeutiques. *Med Sci (Paris)* 2012; 28: 812-6.
32. Pollack IF, Finkelstein SD, Burnham J, et al. Age and TP53 mutation frequency in childhood malignant gliomas : results in a multi-institutional cohort. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 7404-7.
33. Smith JL, Schoenwolf GC. Neurulation: coming to closure. *Trends Neuroscience* 1997; 20: 510-7.
34. Delhaye-Bouchaud N. Développement du système nerveux central chez les mammifères. *Neurophysiol Clin* 2001; 31: 63-82.
35. Sasai Y, Lu B, Steinbesser H, De Robertis EM. Regulation of neural induction by the Chd and BMP-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* 1995; 376: 333-6.

36. Malatesta P, Götz M. Radial glia - from boring cables to stem cell stars. *Development* 2013, 140: 483–486.
37. Bayraktar OA, Fuentealba LC, Alvarez-Buylla A, Rowitch DH. Astrocyte Development and Heterogeneity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2014.
38. Jourdon A. Prss56Cre, un nouvel outil pour l'étude de la neurogenèse adulte chez la souris. Thèse, 2015.
39. Rowitch D.H, Kriegstein A.R. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 2010; 468.
40. Altman J, Das G. D. Autoradiographic and Histological Evidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats. *Comparative Neurology* 1965; 124: 3.
41. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255:1707–1710.
42. Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8591–8595.
43. Gage FH, Coates PW, Palmer TD, et al. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:11879–11883.
44. Angonin D, Marcy G, Raineteau O. Influence des morphogenes sur la regionalisation de la zone sous-ventriculaire postnatale. *Med Sci (Paris)* 2015; 31: 968-70.
45. Heitzler P, Simpson P. The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 1991; 64: 1083-92.
46. Traiffort E, Ferent J. Cellules souches neurales et signalisation Notch. *Médecine/sciences* 2015; 31 : 1115-25.
47. Persano L, Rampozzo E, Basso G, et al. Glioblastoma Cancer Stem Cells: Role of the Microenvironment and Therapeutic Targeting. *Biochemical Pharmacology*. 2013; 85 (5): 612-22.
48. Visvader J.E, Lindeman G.J. Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. *Cell Stem Cell*. 2012; 10 (6): 717-28.
49. Wang Y, Armstrong S.A. Cancer: Inappropriate Expression of Stem Cell Programs? *Cell Stem Cell*. 2008; 2 (4): 297-99.

50. Park C.Y, Tseng D, Weissman I.L. Cancer Stem Cell-Directed Therapies: Recent Data from the Laboratory and Clinic. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 2009; 17 (2): 219-30.
51. Friedmann-Morvinski D, Bushong E.A, Ke E et al. Dedifferentiation of Neurons and Astrocytes by Oncogenes Can Induce Gliomas in Mice. *Science (New York, N.Y.)*. 2012; 338 (6110): 1080-84.
52. Goldthwaite C. A. Are stem cells involved in Cancer? *Stem cell information*.
53. Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Andrountou-Selis-Theotokis A, McKay RD, et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 α . *Oncogene* 2009; 28(45):3949–59.
54. Filatova A, Acker T, Garvalov BK. The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830 (2):2496–508.
55. Dirks P.B. Brain tumour stem cells: the undercurrents of human brain cancer and their relationship to neural stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2008. 363(1489): 139-52.
56. Singh SK, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 2004. 432(7015): 396-401.
57. Facchino S, Abdouh M, Chatoo W, Bernier G. BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *Journal of neuroscience*, 2010; 30(30):10096-10111.
58. Haupt Y, Alexander WS, Barri G, Klinken SP, Adams JM. Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell*, 1991; 65(5):753-763.
59. van Lohuizen M, Verbeek S, Scheijen B, Wientjens E, van der Gulden H, Berns A. Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell*, 1991; 65(5):737-752.
60. Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*, 2003; 423(6937):255-260.

61. Bruggeman SW, Hulsman D, Tanger H, Buckle T, Blom M, Zevenhoven J, van Tellingem O, van Lohuizen M. Bmi1 Controls Tumor Development in an Ink4a/Arf-Independent Manner in a Mouse Model for Glioma. *Cancer Cell*, 2007; 12:328-341.
62. Chatoo W, Abdouh M, David J, Champagne MP, Ferreira J, Rodier F, Bernier G. The polycomb group gene Bmi1 regulates antioxidant defenses in neurons by repressing p53 pro-oxidant activity. *Journal of Neuroscience*, 2009; 29(2):529-542.
63. Abdouh M, Facchino S, Chatoo W, Balasingam V, Ferreira J, Bernier G. BMI1 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal. *Journal of Neuroscience*, 2009; 29(28):8884–8896.
64. Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. BMI1, stem cells and senescence regulation. *Journal clinical investigation*, 2004, 113, 175-179.
65. Facchino S, Abdouh M, Bernier G. Brain Cancer Stem Cells: Current Status on Glioblastoma Multiforme. *Cancers* 2011, 3.
66. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2007; 114(2):97–109.
67. Figarella-Branger D, Labrousse F, Mohktari K, Société française de neuropathologie, Réseau de neuro-oncologie pathologique. [Guidelines for adult diffuse gliomas WHO grade II, III and IV: pathology and biology. Société française de neuropathologie. Réseau de neuro-oncologie pathologique]. *Ann Pathol*. 2012; 32(5):318–27.
68. Acker T, Plate KH. Hypoxia and hypoxia inducible factors (HIF) as important regulators of tumor physiology. *Cancer Treat Res* 2004; 117: 219-48.
69. Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, Heidenreich R, Erber R, Wunder A, Tonn JC, Menger MD, Breier G. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J. Clin. Invest* 2002; 109 (6) 777-85.
70. Erlich P. Das sauerstoffbedürfnis des organismus. Ein farbenanalytische studie. , A Hirschwald Edit Berlin, 1885.
71. Goldmann E. Vitalfärbung am zentral nerven system. Beitrag zur physiologie des plexus choroïdus und der hirnhaut. Berlin, 1913.

72. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 1967, 34, 207–217.
73. Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 1998, 23: 1-10.
74. Dallas S, Miller DS, Bendayan R. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 2006, 58: 140-161.
75. Ohtsuki S, Terasaki T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm. Res.* 2007, 24: 1745-1758.
76. Bickel U, Yoshikawa T, Pardridge WM. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, 46: 247-279.
77. Dvorak HF. Rous-Whipple Award Lecture .How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am.J.Pathol.*2003, 162, 1747–1757.
78. Hirano A, Matsui T. Vascular structures in brain tumors. *Hum. Pathol.*1975, 6, 611–621.[doi:10.1016/s0046-8177\(75\)80045-1](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(75)80045-1).
79. Bertossi M, Virgintino D, Maiorano E, Occhiogrosso M, Roncali L. Ultrastructural and morphometric investigation of human brain capillaries in normal and peritumoral tissues. *Ultrastruct.Pathol.*1997, 21, 41–49.
80. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic witch. *Nat.Rev.Cancer*, 2003, 3, 401–410.
81. Zhu SJ, Wang KJ, Gan SW, Xu J, Xu SY, Sun SQ. Expression of aquaporin-8 in human astrocytomas : correlation with pathologic grade. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013, 440, 168–172.
82. Noell S, Ritz R, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Fallier-Becker P. An allograft glioma model reveals the dependence of aquaporin-4 expression on the brain microenvironment. *PLoS One*, 2012, 7:e36555.
83. Espuny-Camacho I, Michelsen KA, Gall D, Linaro D, Hasche A, Bonnefont J, Bali C, Orduz D, Bilheu A, Herpoel A, et al. Pyramidal neurons derived from human

- pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits in vivo. *Neuron*, 2013, 77: 440–456.
84. Kim JY, Grunke SD, Levites Y, Golde TE, Jankowsky JL. Intracerebroventricular Viral Injection of the Neonatal Mouse Brain for Persistent and Widespread Neuronal Transduction. *J. Vis. Exp.* 2014, 91.
 85. Orringer D, Lau D, Khatri S, Zamora-Berridi GJ, Zhang K, Wu C, et al. Extent of resection in patients with glioblastoma: limiting factors, perception of resectability, and effect on survival. *J Neurosurg.* 2012 Nov; 117(5):851–9.
 86. Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R, Raza SM, Pascual-Gallego M, Ibrahim A, et al. Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2014; 16(1):113-22.
 87. Ryken TC, Kalkanis SN, Buatti JM, Olson JJ, AANS/CNS Joint Guidelines Committee. The role of cytoreductive surgery in the management of progressive glioblastoma: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol.* 2014 Jul; 118 (3):479–88.
 88. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10; 352(10):987–96.
 89. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol* 2003; 5:79-88.
 90. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014; 370:709-22.
 91. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014; 370:699-708.
 92. Flamier A, El Hajjar J, Adjaye J, Fernandes K J, Abdouh M, Bernier G. Modeling Late-Onset Sporadic Alzheimer’s Disease through BMI1 Deficiency. *Cell Reports*, May 2018; 23, 2653–2666.

93. Eng L.F, Vanderhaeghen J.J, Bignami A, Gerstl B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.*, 28 (1971), pp. 351-354.
94. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 2000 Oct; 25(9-10):1439-51.
95. Jacque CM, Vinner C, Kujas M, Raoul M, Racadot J, Baumann NA. Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *J Neurol Sci.* 1978; 35 (1):147-55.
96. Hamaya K, Doi K, Tanaka T, Nishimoto A. The determination of glial fibrillary acidic protein for the diagnosis and histogenetic study of central nervous system tumors: a study of 152 cases. *Acta Medica Okayama*, Dec 1985, 39(6):453-462.
97. Abaza MS, Shaban F, Narayan RK, Atassi MZ. Human glioma associated intermediate filament proteins: over-expression, co-localization and cross-reactivity. *Anticancer Res*, 1998; 18:1333-40.
98. Kong Y, Ai C, Dong F, Xia X, Zhao X, Yang C, Kang C, Zhou Y, Zhao Q, Sun X, Wu X. Targeting of BMI-1 with PTC-209 inhibits glioblastoma development. *Cell Cycle* 2018, 17; 10:1199-1211.
99. Jin X , Kim L J Y, Wu Q, Wallace L C, Prager B C, Sanvoranart T, Gimple R C, Wang X, Mack S C, Miller T E, Huang P, Valentim C L, Zhou Q, Barnholtz-Sloan J S, Bao S, Sloan A E, Rich J N. Targeting glioma stem cells through combined BMI1 and EZH2 inhibition. *Nature medicine* 2017; 23: 1352–1361.
100. Lu C, Han HD, Mangala LS, Ali-Fehmi R, Newton CS, Ozbun L et al. Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. *Cancer Cell*, 2010, 18: 185–197.