

Thesis, COLLÉGIALITÉ

Auteur : Rouschop, Tatiana

Promoteur(s) : Neirinckx, Virginie

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2023-2024

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/20555>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

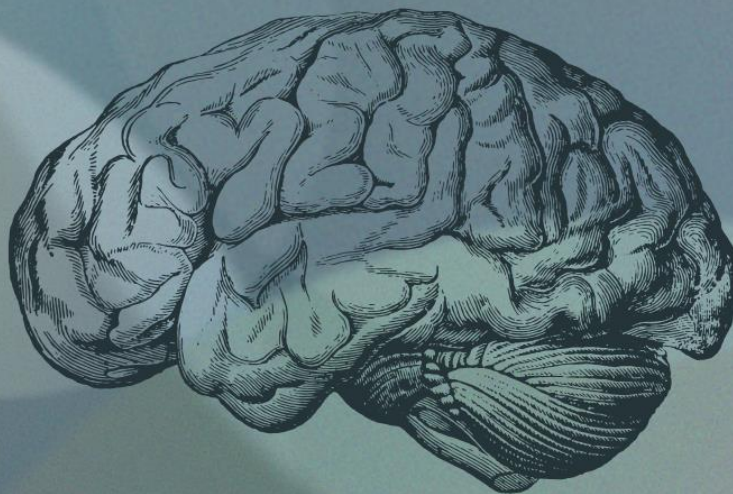
Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

INFLUENCE DU SÉCRÉTOME DES PLEXUS CHOROÏDES SUR LE PHÉNOTYPE DES GLIOMES PÉDIATRIQUES DE HAUT GRADE

Promotrice: NEIRINCKX Virginie

Co-promoteur: ROGISTER Bernard

ROUSCHOP
TATIANA



Année académique 2023-2024

Mémoire de fin d'étude présenté en vue de l'obtention du
grade de Master en Sciences Biomédicales

Remerciements :

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au Pr. Bernard Rogister, mon co-promoteur, pour l'accueil dans son laboratoire et la confiance qu'il m'a accordée au cours de ces derniers mois. Ce stage m'a permis d'acquérir une expérience enrichissante, tant sur le plan théorique que pratique. Je souhaite adresser des remerciements particuliers à ma promotrice, Dr. Virginie Neirinckx, pour ses précieux conseils, sa présence constante et sa disponibilité tout au long de ce travail. Merci également à Caroline Piette, pour ses conseils et son suivi du projet.

Je remercie aussi Marc-Antoine Da-Veiga, qui m'a offert l'opportunité de travailler sur son projet, m'a formée et supervisée pendant ce mémoire. Ma gratitude va aussi à toute l'équipe pour les moments partagés. Un merci spécial à Kim Mottard, qui m'a accueillie dès mon arrivée et qui a toujours été là pour m'écouter et m'aider. Je n'oublie pas Célia Lemoine et Louise Leparç, toujours bienveillantes et disponibles lorsque j'avais besoin d'elles, ainsi que Laetitia Velazquez Saez et Thérèse Aldenhoff, qui ont également contribué à ma formation.

Je souhaite remercier ma formidable « team neuro » : Chloé Buttenaers, Thomas Vrancken et Enes Spahic. Merci pour votre soutien durant ces cinq mois, ainsi que pour les moments de discussion, de repas et de rires.

Je voudrais également remercier mes amies rencontrées durant mon année passerelle : Alexandra Pirnay, Emilie Laverdeur et Camille Eloy. Vous avez été des partenaires de cours exceptionnelles mais surtout de véritables amies avec lesquelles mon amitié continuera bien au-delà de nos études.

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers ma famille, en particulier mes parents. Merci de m'avoir toujours soutenue et encouragée au cours de ces nombreuses années d'étude et de m'avoir permis de débiter ce master après mes années d'études en kinésithérapie.

Liste des abréviations :

SNC	Système nerveux central
OMS	Organisation mondiale de la santé
GpBG	Gliome pédiatrique diffus de bas grade
GpHG	Gliome pédiatrique diffus de haut grade
GDM	Gliome diffus de la ligne médiane H3 K27 altéré
IDH	Isocitrate déshydrogénase
Histone H3.1	Première sous-unité de l'histone 3
Histone H3.3	Troisième sous-unité de l'histone 3
PRC2	Complexe polycomb répressif 2
H3K27me3	Triméthylation de la lysine en position 27 de l'histone 3
GBM	Glioblastome
EGFR	Récepteur au facteur de croissance épithélial
PDGFRA	Récepteur A du facteur de croissance dérivé des plaquettes
IHC	Test immunohistochimique
IRM	Imagerie par résonance magnétique
TDM	Tomodensitométrie
K27I	Substitution de la lysine par une isoleucine
TMZ	Témzolomide
MGMT	O ⁶ -méthylguanine-méthyltransférase
NF1	Neurofibromatose de type 1
CSN	Cellule souche neurale
ZSV	Zone sous-ventriculaire
CSC	Cellule souche cancéreuse
CSG	Cellule souche de gliome
VL	Ventricule latéral
LCR	Liquide céphalo-rachidien
BHE	Barrière hémato-encéphalique
PGD2	Système de prostaglandine D2
PGDS	Synthase du système de prostaglandine D2
IGF2	Facteur de croissance 2 analogue à l'insuline
NT-3	Neurotrophine-3
SLIT2	Ligand de guidage de fente 2
GNDF	Facteur neurotrophique dérivé de la glie
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
EGF	Facteur de croissance épithélial
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
Milieu CSG	Milieu adapté à la culture de cellules souches de gliomes pédiatriques
Milieu NPC	Milieu adapté à la culture de cellules progénitrices neurales
CM-Z310	Milieu conditionné par des cellules Z310
CM-MCF7	Milieu conditionné par des cellules MCF-7
PFA 4%	Paraformaldéhyde 4%
TTBS	Tween-Tris-Buffered Saline

Table des matières :

Introduction	1
1. Les gliomes pédiatriques	1
1.1. Définition	1
1.2. Classification	1
1.3. Epidémiologie	4
1.4. Diagnostic et traitement	4
1.5. Etiologie et symptômes.....	7
1.6. Les cellules souches de gliomes	7
1.7. Hétérogénéité et plasticité des gliomes pédiatriques.....	8
2. La zone sous-ventriculaire	9
2.1. Description et structure de la zone sous-ventriculaire	9
2.2. La zone sous-ventriculaire et les gliomes pédiatriques.....	9
3. Le plexus choroïde et le liquide céphalo-rachidien.....	11
3.1. Localisation et structure du plexus choroïde	11
3.2. Sécrétion et circulation du liquide céphalo-rachidien.....	11
3.3. Fonctions du système plexus choroïde – liquide céphalo-rachidien	13
3.4. Composition du liquide céphalo-rachidien	13
3.5. Le liquide céphalo-rachidien et les gliomes pédiatriques	14
Objectifs.....	16
Matériel et méthodes.....	17
1. Culture cellulaire.....	17
1.1. Culture de cellules dérivées de patients	17
1.2. Culture de cellules de plexus choroïdes immortalisées (Z310)	18
1.3. Préparation de milieux conditionnés	18
2. Caractérisation des cellules	20
2.1. Cellules Z310.....	20

2.2. Cellules tumorales.....	21
3. Analyse de la morphologie des cellules tumorales	21
4. Analyse du destin cellulaire par Western Blot	21
5. Analyse de la prolifération.....	23
5.1. Cytométrie en flux	23
5.2. Comptages cellulaires	23
6. Test de résistance au traitement ONC 201	24
7. Test de migration/invasion	
7.1. Chambre de Boyden	24
8. Analyse de la morphologie dans le liquide céphalo-rachidien	25
9. Étude de l'expression de la vimentine et de la protéine Ki67 dans le liquide céphalo-rachidien par immunofluorescence	26
10. Statistiques	26
Résultats.....	27
1. Caractérisation des cellules.....	27
1.2. Cellules Z310.....	27
1.3. Cellules tumorales.....	27
2. Influence du CM-Z310 sur la morphologie des cellules tumorales.....	28
3. Influence du CM-Z310 sur la prolifération des cellules tumorales	29
4. Influence du CM-Z310 sur la réponse au ONC201 des cellules tumorales	30
5. Influence du CM-Z310 sur la migration/invasion des cellules tumorales.....	30
5.1. Analyse de la migration/invasion des cellules tumorales en réponse au CM-Z310	31
5.2. Analyse de la migration/invasion des cellules tumorales induites par le CM-Z310	31
6. Influence du CM-Z310 sur le destin cellulaire des cellules tumorales	32
7. Influence du liquide céphalo-rachidien sur la morphologie des cellules tumorales.....	33
8. Influence du liquide céphalo-rachidien sur l'expression de Ki67 et de vimentine dans les cellules tumorales.....	33
Discussion	35
Bibliographie	41

Résumé :

Les gliomes pédiatriques de haut grade (GpHG) sont les gliomes les plus agressifs chez l'enfant, causant plus de 40 % des décès dus à des tumeurs cérébrales dans cette population. Le traitement standard comprend une résection chirurgicale, quand elle est applicable, suivie de radiothérapie et de chimiothérapie. Malgré cette approche combinée, le pronostic demeure sombre en raison de la résistance aux traitements, conduisant à des récives. Cette résistance est partiellement liée à la présence de cellules souches de gliome, qui possèdent des capacités invasives et migrent vers la zone sous-ventriculaire (ZSV), une région neurogène active tout au long de la vie. Les cellules souches neurales (CSNs) se situant dans cette zone interagissent avec le liquide céphalo-rachidien (LCR), sécrété par les plexus choroïdes. Ce liquide, dont le rôle physiologique est bien connu, peut agir sur les CSNs se trouvant dans la ZSV et ainsi influencer la neurogenèse. Il a également été récemment démontré que le LCR jouait un rôle pro-tumoral dans le cadre du glioblastome (GBM) adulte.

L'objectif de ce mémoire était d'étudier l'influence du sécrétome des plexus choroïdes sur le phénotype des cellules de GpHG. Pour reproduire l'effet du LCR, un milieu conditionné par des cellules épithéliales de plexus choroïdes a été créé et son impact sur les cellules de GpHG a été analysé. Par microscopie optique, il a été observé que ce milieu modifiait la morphologie des cellules tumorales, les rendant plus allongées, adhérentes et créant des connexions intercellulaires. Les analyses par cytométrie en flux et comptages cellulaires n'ont montré aucun impact sur la prolifération des cellules tumorales. L'effet de ce milieu sur la réponse au traitement avec l'ONC201, une molécule en essai clinique, n'a également révélé aucun effet notable. En revanche, des tests de migration/invasion utilisant une chambre de Boyden ont démontré un effet significatif du milieu conditionné sur les capacités migratoires et invasives des cellules de GpHG. Enfin, l'analyse par Western Blot de diverses protéines (liées à la différenciation cellulaire, l'adhérence, l'invasion, etc.) n'a montré aucun effet clair du milieu conditionné sur le destin cellulaire. Pour finir, l'effet du LCR provenant de patient a été analysé, montrant une tendance à la diminution de la prolifération des cellules de GpHG ainsi qu'une modification de la morphologie similaire à celle observée dans le milieu conditionné.

En conclusion, ce travail a démontré l'impact d'un modèle imitant le LCR sur la morphologie et la migration/invasion des cellules de GpHG, ainsi que l'effet du LCR sur la morphologie cellulaire.

Abstract :

Pediatric high-grade gliomas (pHGG) are the most aggressive gliomas in children, accounting for over 40% of brain tumor-related deaths in this population. The standard treatment involves surgical resection, when feasible, followed by radiotherapy and chemotherapy. Despite this combined approach, the prognosis remains poor due to treatment resistance, leading to recurrences. This resistance is partially due to the presence of glioma stem cells (GSCs), which possess invasive capabilities and migrate towards the subventricular zone (SVZ), a neurogenic region active throughout life. Neural stem cells (NSCs) in this area interact with cerebrospinal fluid (CSF), secreted by the choroid plexuses. It is well known that the CSF influences NSCs in the SVZ, affecting neurogenesis. Recently, it has also been shown that CSF has a pro-tumoral role in adult glioblastoma (GBM).

The objective of this thesis was to study the influence of the choroid plexuses secretome on the phenotype of pHGG cells. As a surrogate for the CSF, a conditioned medium from choroid plexus epithelial cells was created and its impact on pHGG cells was analyzed. Optical microscopy revealed that this medium altered the morphology of tumor cells, making them more elongated, adherent, and forming intercellular connections. Flow cytometry analysis and cell counts showed no impact on tumor cell proliferation. The effect of this medium on the response to ONC201, a molecule in clinical trials, also showed no significant impact. However, migration/invasion assays using a Boyden chamber demonstrated a significant effect of the conditioned medium on the migratory and invasive abilities of pHGG cells. Finally, Western Blot analysis of various proteins (related to cell differentiation, adherence, invasion...), did not show any clear effect of the conditioned medium on cell fate. To conclude, the effect of patient-derived CSF from was analyzed, showing a tendency to decrease pHGG cell proliferation and inducing a morphological change similar to that observed with the conditioned medium.

In summary, this study demonstrated the impact of a CSF surrogate model on the morphology and migration/invasion of pHGG cells, as well as the effect of CSF on cell morphology.

1. INTRODUCTION

Introduction :

1. Les gliomes pédiatriques :

1.1. Définition :

Les tumeurs malignes solides les plus fréquentes chez les individus âgés de 0 à 19 ans sont les tumeurs du système nerveux central (SNC). Parmi celles-ci, les gliomes sont les plus répandus, ils représentent 45,7% des tumeurs du SNC, constituant respectivement 51,6 % et 31,1 % des tumeurs du SNC chez les enfants âgés de 0 à 14 ans et les adolescents âgés de 15 à 19 ans.^{1,2} Les gliomes sont des tumeurs primaires avec des caractéristiques de cellules gliales, pouvant adopter une nature circonscrite ou diffuse.

1.2. Classification :

Les gliomes diffus peuvent être classés en quatre grades différents selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS). En pédiatrie, les gliomes diffus peuvent se manifester avec une différenciation astrocytaire ou oligodendrogliale et se déclinent en deux catégories bien définies : les gliomes pédiatriques diffus de bas grade (GpBG) et les gliomes pédiatriques diffus de haut grade (GpHG). Les GpBG présentent un pronostic favorable et sont classés au grade I et II selon la classification de l'OMS. Leur catégorisation repose sur les altérations des voies *MYB/MYB1* et *MAPK*, ainsi que sur l'observation de l'histopathologie caractéristique. Il en existe différents types : les astrocytomes diffus *MYB* ou *MYBL1* altérés, les gliomes angiocentriques, les tumeurs neuroépithéliales polymorphes de bas grade et les gliomes diffus de bas grade avec altération de la voie *MAPK*. Les GpHG représentent 8 à 12% des tumeurs du SNC chez l'enfant et constituent une classe hétérogène de gliomes pédiatriques. Ils sont classés au grade III et IV selon la classification de l'OMS, indiquant ainsi le plus haut niveau d'agressivité.^{3,4}

Pendant une longue période, les gliomes pédiatriques étaient classés de la même manière que leurs équivalents adultes, bien que des différences notables étaient connues. Depuis 2021, grâce à l'identification d'anomalies génétiques spécifiques aux gliomes pédiatriques, la cinquième édition de la classification de l'OMS des tumeurs du système nerveux central a introduit une catégorisation distincte pour les GpHG par rapport à celle des adultes. Ces tumeurs manifestent fréquemment des

mutations dans les gènes des histones et leur pronostic est généralement défavorable. Il existe une variabilité dans leur histopathologie, cependant, des caractéristiques anaplasiques telles qu'une augmentation du nombre de mitoses, une forte densité cellulaire, des zones de nécrose et des proliférations microvasculaires sont couramment observées. Elles peuvent être subdivisées en quatre classes moléculaires distinctes (**Figure 1**) en fonction de leurs altérations génétiques : les gliomes diffus de la ligne médiane H3 K27M altérés (GDM), les gliomes hémisphériques diffus H3 G34R/V mutés, les gliomes diffus de haut grade de type pédiatrique de type H3 sauvage et *IDH* (isocitrate déshydrogénase) sauvage, les gliomes hémisphériques de type infantile.^{3,4,5}

Les GDM concernent majoritairement les jeunes enfants âgés de 6 à 9 ans. Ils constituent environ 50% des GpHG et sont souvent localisés dans le thalamus, le tronc cérébral (dans le pont dans 80% des cas) ainsi que la moelle épinière. L'altération H3 K27M affecte les gènes de l'histone 3, à savoir *H3F3A* ou *HIST1H3B*. Elle entraîne le remplacement de la lysine par une méthionine en position 27 de la première sous-unité de l'histone 3 (histone H3.1) ou de la troisième sous-unité de l'histone 3 (histone H3.3). Ce changement induit des modifications épigénétiques en perturbant le complexe polycomb répressif 2 (PRC2), qui a normalement pour fonction de méthyliser l'histone H3. Par conséquent, il en résulte une diminution globale de la triméthylation sur la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3), favorisant l'ouverture de la chromatine et activant ainsi la transcription de certains gènes liés à la croissance, à la prolifération et à la survie des cellules, contribuant ainsi au développement de la tumeur.^{6,7}

Les gliomes hémisphériques diffus H3 G34R/V mutés touchent principalement les adolescents et les jeunes adultes, se localisant dans les hémisphères cérébraux. Ils sont moins fréquents que les GDM car ils constituent 5 à 10% des GpHG. La mutation H3 G34R/V altère le gène *H3F3A*, entraînant le remplacement de la glycine par une arginine ou une valine en position 34 de l'histone H3.3. La manière dont la mutation G34 influence l'épigénome demeure incertaine, contrairement à l'altération K27M pour laquelle les mécanismes sont mieux connus. Cette modification conduirait à une surexpression de *MYCN*, un oncogène puissant.⁸

Les gliomes diffus de haut grade de type pédiatrique de type H3 sauvage et *IDH* sauvage ne possèdent de mutation ni dans l'histone H3, ni dans le gène *IDH*. Ils représentent 20 à 25% des GpHG. Bien qu'ils apparaissent chez des patients plus jeunes, leur histopathologie et leur comportement clinique sont similaires aux glioblastomes (GBM) adultes. Ce type de tumeur est généralement localisé dans le tronc

cérébral, le cervelet et en supratentoriel. Ils peuvent porter des altérations de *PDGFRA* et *EGFR*, une mutation BRAF p.V600E, ou une surexpression de *MYCN*⁹

Les gliomes hémisphériques de type infantile représentent 5% des GpHG et surviennent généralement chez les nouveau-nés. Ils sont caractérisés par un profil moléculaire spécifique présentant des fusions de gènes associées à *ALK*, *ROS1*, *NTRK1/2/3* ou *MET*.¹⁰

D'autres mutations existent et sont reprises dans la **Figure 2**.

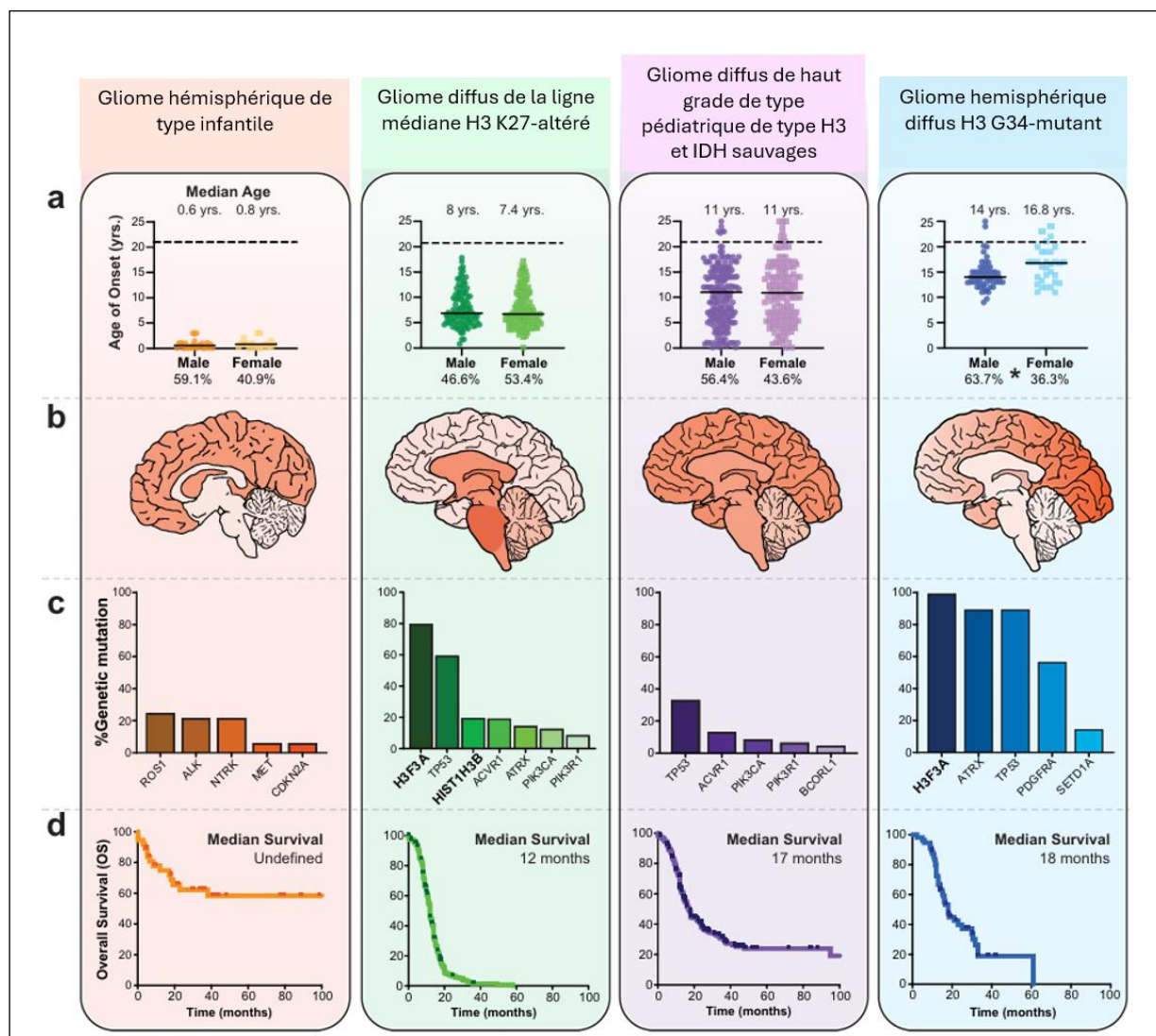


Figure 1 : Classification de l'OMS des gliomes pédiatriques (2021). (a) Age médian d'apparition pour chaque sexe, (b) Localisations courantes (c) Mutations les plus fréquentes associées à chaque sous-groupe, (d) survies médianes propres à chaque type de gliome (adapté de Ocasio JK et al, 2023)⁷⁹

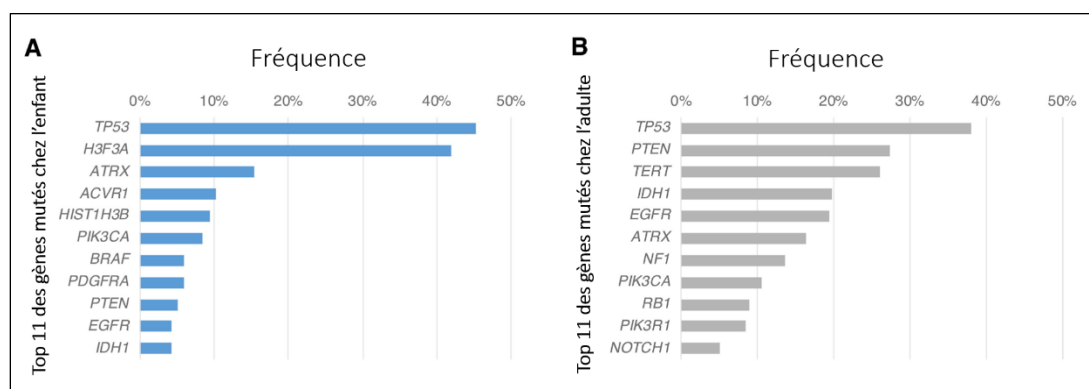


Figure 2 : Résumé des mutations présentes dans les gliomes pédiatriques de haut grade (A), comparé aux adultes (B) (adapté de Das A et Nobre L, 2023)¹⁹

1.3. Epidémiologie

Aux États-Unis, le GBM, classé en grade IV par l'OMS, prédomine chez les adultes par rapport aux enfants, affichant un taux d'incidence annuel moyen de 3,2 pour 100 000 dans la population adulte. En ce qui concerne les enfants, les gliomes de grades III et IV sont moins fréquents, avec des taux d'incidence annuels de 0,08 et 0,15 pour 100 000, respectivement.¹ La localisation et la biologie de la tumeur jouent un rôle crucial dans la survie des patients atteints de GpHG. Une méta-analyse portant sur 1000 enfants et jeunes adultes a révélé une meilleure survie pour les GpHG hémisphériques (survie médiane de 18,5 mois) par rapport aux GpHG de la ligne médiane (survie médiane de 13,5 mois).¹¹

Bien que leur incidence soit faible, les GpHG causent plus de 40% de l'ensemble des décès dus à des tumeurs cérébrales chez les enfants. Dans l'ensemble, ils représentent la principale cause de mortalité liée aux tumeurs dans cette tranche d'âge.¹

1.4. Diagnostic et traitement :

Autrefois, le **diagnostic** des tumeurs pédiatriques du SNC reposait sur l'analyse histopathologique, complétée par des résultats radiologiques et des tests immunohistochimiques (IHC) standardisés pour identifier des biomarqueurs spécifiques. Cependant, au cours des dix dernières années, l'analyse génétique moléculaire est devenue de plus en plus essentielle. Le profilage moléculaire des tumeurs a ainsi permis de mettre en lumière des facteurs pronostiques, des marqueurs prédictifs de sensibilité aux médicaments, de résistance et d'événements indésirables.¹²

Le processus diagnostique actuel se déroule en plusieurs étapes. Initialement, en cas de suspicion de tumeur cérébrale, des examens d'imagerie médicale tels que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou la tomodensitométrie (TDM) sont couramment utilisés pour observer la tumeur, déterminer sa localisation et évaluer son étendue (**Figure 3**). Par la suite, une résection chirurgicale est nécessaire pour procéder à l'analyse de la biopsie, contribuant ainsi à préciser le diagnostic.

Le diagnostic moléculaire des gliomes H3 K27M altérés est établi par IHC. Il repose sur la perte de H3K27me3 et sur la présence d'au moins l'un des critères suivants : une mutation pathogène dans H3 K27M, la substitution de la lysine par une isoleucine (K27I), une mutation ou une amplification de la protéine EGFR, une surexpression de la protéine EZHIP (protéine inhibant la méthylation de H3K27), ou un profil de méthylation similaire.

Concernant les gliomes H3 G34R/V mutés, les critères diagnostiques comprennent une activité mitotique située dans l'hémisphère cérébral, ainsi que la détection d'une mutation spécifique, soit H3.3 G34R ou H3.3 G34V, ou un profil de méthylation correspondant. Les tests immunohistochimiques montrent une perte d'expression d'*ATRX* et *Olig2*, et l'expression diffuse de *p53*.

Les gliomes diffus de haut grade de type pédiatrique de type H3 sauvage et IDH sauvage sont, quant à eux, moléculairement diagnostiqués par identification immunohistochimique des altérations *PDGFRA* et *EGFR*, de la mutation BRAF p.V600E ou de l'amplification *MYCN*.

Finalement, les tests moléculaires nécessaires au diagnostic des gliomes hémisphériques de type infantile reposent sur la détection d'une anomalie typique du récepteur tyrosine kinase comme une fusion dans l'un des gènes de la famille *NTRK*, ou dans *ROS1*, *MET1* ou *ALK*.^{13,19}

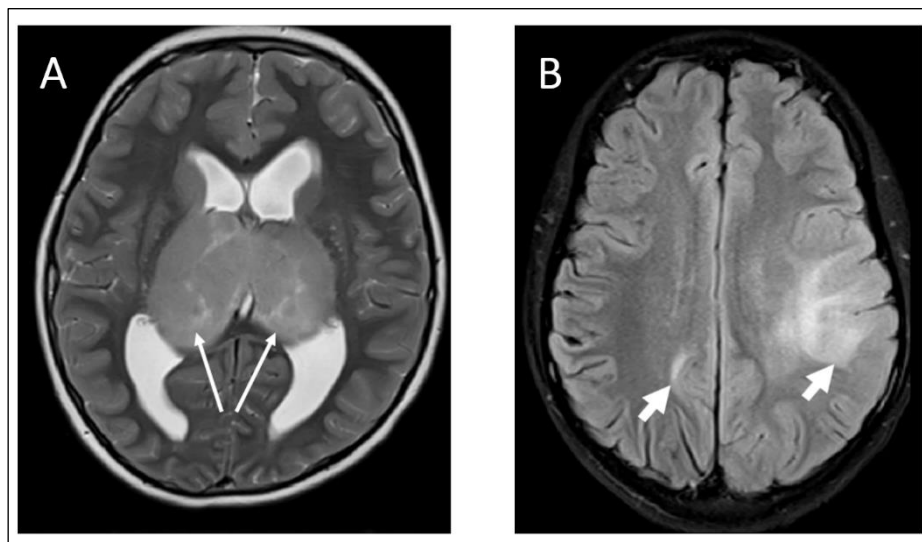


Figure 3 : Gliome diffus de la ligne médiane H3 K27M altéré bi-thalamique d'un enfant de 6 ans (A), gliome hémisphérique diffus H3 G34R muté d'un adolescent de 14 ans (B) (extrait de McNamara C et al, 2022)¹³

Depuis 2005, le **traitement** standard pour les gliomes de haut grade chez les adultes consiste en une combinaison thérapeutique qui débute par la résection chirurgicale, suivie de la radiothérapie et d'une chimiothérapie concomitante utilisant le témozolomide (TMZ). Le TMZ, un agent alkylant, ajoute un groupement méthyle sur l'oxygène en position 6 de la guanine provoquant ainsi des erreurs de réplication d'ADN et donc des lésions qui aboutiront à la mort des cellules. Ces lésions pouvant être réparées par O⁶-méthylguanine-méthyltransférase (MGMT), il est nécessaire d'étudier le statut de méthylation du promoteur de cette enzyme avant l'administration de ce traitement. En effet, dans les cas où le promoteur est méthylé, la protéine MGMT sera faiblement exprimée, laissant ainsi le TMZ exercer son effet, ce qui permet une meilleure réponse au traitement.^{14,15}

Le traitement standard pour les GpHG comprend généralement la radiothérapie, la chimiothérapie au TMZ ainsi que la résection chirurgicale lorsque celle-ci est réalisable. La résection chirurgicale est associée à une meilleure survie globale. Elle a pour but, premièrement, d'obtenir des échantillons de tissus pour le diagnostic pathologique ; deuxièmement, de soulager la pression intracrânienne ; et troisièmement, de réduire la taille de la tumeur. Celle-ci ne peut malheureusement pas être réalisée dans le cas de GDM, qui touchent le tronc cérébral, en raison de la présence des noyaux des nerfs crâniens, aggravant le pronostic de ce type de tumeurs.^{16, 17, 18, 19}

L'utilisation du TMZ dans le traitement des GDM a récemment été contestée car certaines preuves cliniques ont démontré son inefficacité. De plus, les changements épigénétiques induits par les mutations des histones entraînent une diminution de l'expression de MGMT contribuant ainsi à une augmentation de la résistance au traitement.^{20,21} La recherche de nouveaux traitements est donc nécessaire.

Malheureusement, malgré ces thérapies combinées actuelles, les récives sont inévitables car les cellules tumorales développent une résistance aux traitements, empêchant ainsi l'éradication complète de la tumeur. Par conséquent, le pronostic pour ce type de cancer demeure sombre. La recherche de nouveaux traitements est donc cruciale.

Actuellement, plusieurs agents font l'objet d'essais cliniques. Parmi ceux-ci, l'ONC201, un membre de la famille des imipridones, se distingue en tant qu'antagoniste du récepteur dopaminergique DRD2. Des résultats préliminaires ont signalé une efficacité clinique prometteuse de cette molécule, avec une amélioration de la survie, chez des patients enfants et adultes atteints de GDM H3 K27M.^{22,23}

Bien que les mécanismes d'action ne soient pas encore pleinement compris, une étude a montré que l'ONC201 empêche la diminution de H3K27me3 dans les modèles de gliome présentant des altérations H3 K27M, ainsi que dans des échantillons prélevés lors d'autopsies de patients traités.²⁴

1.5. Etiologie et symptômes :

Aucune cause environnementale spécifique n'a clairement été établie pour les GpHG, à l'exception d'une exposition antérieure aux rayonnements. Cependant, plusieurs syndromes génétiques sont liés aux GpHG. Parmi ceux-ci, on retrouve le syndrome de Turcot, le syndrome de Li-Fraumeni et la neurofibromatose de type 1 (NF1). Le syndrome de Turcot désigne la combinaison de la polypose colorectale et des tumeurs primitives SNC. Le syndrome de Li-Fraumeni, un syndrome héréditaire, résulte de mutations dans le gène suppresseur de tumeur *TP53*, pouvant entraîner divers GpHG. La NF1, une maladie autosomique dominante, est souvent associée aux gliomes des voies optiques mais accroît également le risque de GpHG.¹⁸

Les manifestations cliniques varient selon la localisation anatomique, le type de gliome et l'âge du patient. Les symptômes peuvent comprendre de multiples déficiences telles que l'hémiplégie, la monoparésie, la perte de sensibilité, des difficultés de langage comme la dysphasie et l'aphasie, ainsi que des troubles de la mémoire. Cependant, les symptômes peuvent également être non spécifiques, se manifestant par des conséquences de l'augmentation de la pression intracrânienne, tels que des maux de tête, des nausées et des vomissements.^{14,18}

1.6. Les cellules souches de gliomes :

Les cellules souches adultes, présentes dans le corps humain, sont des cellules qui ne sont pas spécialisées et qui ont la capacité de se différencier en divers types de cellules constituant un organisme mais aussi de s'auto-renouveler. Elles sont multipotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de se différencier en différents types de cellules d'un organisme donné, ce qui est essentiel pour la régénération et la réparation des tissus dans le corps.²⁵ Dans le SNC, les cellules souches neurales (CSNs) ont la capacité de s'auto-renouveler et de produire des neurones mais également des cellules gliales. Elles se situent dans des niches neurogènes appelées zone sous-ventriculaire (ZSV) et gyrus denté de l'hippocampe où elles peuvent se différencier en neurones, en astrocytes et en oligodendrocytes.²⁶

Dans le cadre de nombreux cancers, un concept important est celui des cellules souches cancéreuses (CSCs) qui est apparu pour la première fois dans les années 1990. En effet, Dick et ses collaborateurs ont découvert un groupe spécifique de cellules leucémiques provenant de patients, capables de migrer vers la moëlle osseuse de souris immunodéficientes puis de proliférer de manière active tout en préservant des caractéristiques initiales des cellules leucémiques. Ils ont ensuite pu observer que ce sous-groupe de cellules était capable de se diviser à long terme, étant en mesure d'initier le cancer chez plusieurs souris lors de transplantations en série.^{27,28} Ces CSCs ont été identifiées dans plusieurs cancers, notamment dans le cancer colorectal²⁹, le cancer du sein³⁰, le cancer de la prostate³¹, le cancer du pancréas³² mais également dans le GBM et les gliomes pédiatriques.^{33,36}

L'échec thérapeutique dans les GpHG ainsi que dans le GBM a été attribué à leur forte hétérogénéité, leur croissance infiltrante et leur résistance aux thérapies.³⁴ En effet, dans les années 2000, il a été suggéré que ces caractéristiques étaient liées à la présence de **cellules souches de gliomes (CSGs)**. Il a été démontré qu'elles étaient capables d'induire chez l'adulte des capacités tumorigènes, multipotentes et invasives mais également un pouvoir de résistance au traitement.³³ Bao et al ont en effet montré que les CSGs exprimant la protéine CD133 (prominine-1) étaient radio-résistantes grâce à l'amélioration de l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN et pourraient être à l'origine de la récurrence de la tumeur.³⁵ Dans les GpHG, les CSGs ont été moins bien étudiées par rapport aux adultes au vu de leur incidence faible et donc du manque de tissus disponibles pour la recherche. Cependant, plusieurs protéines ont également été mises en évidence dans les CSGs pédiatriques, notamment CD133, la nestine et SOX2.³⁶

Les CSGs sont donc des cellules dotées de capacités d'auto-renouvellement, de prolifération persistante, d'initiation tumorale et de différenciation multipotente.³⁷ L'analyse unicellulaire du GBM a révélé qu'un nombre de cellules étonnamment élevé, soit environ 40 % de l'entièreté de la tumeur, présente une signature de cellules souches, cependant, toutes ne sont pas des CSGs.³⁸ Il est donc crucial d'identifier des marqueurs pour détecter les CSGs.

1.7. Hétérogénéité et plasticité des gliomes pédiatriques :

Les GpHG sont des tumeurs très hétérogènes. En effet, comme mentionné au point 1.2., ces tumeurs présentent de nombreuses altérations génétiques et épigénétiques distinctes, notamment au niveau de l'histone H3, ce qui constitue la différence principale avec le GBM adulte qui ne possède que rarement cette mutation. Il existe donc une variabilité intertumorale importante, ce qui représente

un défi important pour le traitement de ce type de tumeur. Le séquençage unicellulaire de l'ARN a révélé que différentes régions au sein d'une même tumeur peuvent avoir des profils génétiques et transcriptomiques différents. Par exemple, dans les GDM, différents états cellulaires ont été identifiés. Tout d'abord, les cellules ressemblant aux progéniteurs d'oligodendrocytes (OPC-like) sont présents de manière abondante et sont capables de s'auto-renouveler et de donner naissance à des cellules non-cycliques et plus différenciées ressemblant aux oligodendrocytes (OC-like). Il existe également des cellules ayant des propriétés d'astrocytes (AC-like), des propriétés mésenchymateuses (MES-like), des propriétés de types progéniteur neural (NPC-like) et des cellules ressemblant aux cellules de la glie radiaire (RG-like) impliquées dans la progression et l'invasion des GpHG. Ces différents états peuvent co-exister au sein d'une même tumeur et sont dépendants du microenvironnement tumoral.^{39,40} En plus d'être hétérogènes, les GpHG possèdent également une grande plasticité, c'est-à-dire que les cellules sont capables de passer d'un état à l'autre, sans respecter de hiérarchie. Ces mécanismes contribuent à la résistance au traitement et aux phénomènes de récidives.⁴¹

2. La zone sous-ventriculaire :

2.1. Description et structure de la zone sous-ventriculaire :

Comme indiqué précédemment, la ZSV constitue l'une des deux régions neurogènes du cerveau qui persiste après la naissance durant toute notre vie, localisée dans les parois latérales des ventricules latéraux (VL). Chez l'humain, elle est composée de quatre couches cellulaires distinctes : la première couche est formée de cellules épendymaires, suivie d'une couche hypocellulaire, puis d'une couche d'astrocytes, et enfin d'une zone de transition vers le parenchyme cérébral.⁴² (Figure 4)

2.2. La zone sous-ventriculaire et les gliomes pédiatriques :

Plusieurs arguments tentent à montrer que cette zone sert de réservoir aux cellules tumorales, ce qui explique l'impact sur le pronostic des patients mais également les récidives. En effet, dans les GBM mais également dans les GpHG, les tumeurs entrant en contact avec la ZSV sont associées à un moins bon pronostic pour les patients, comparé aux tumeurs n'étant pas en contact avec cette région.⁴³ En 2011, le laboratoire a d'abord mis en évidence que les cellules de GBM adultes nichées dans la ZSV présentent des capacités d'initiation tumorale supérieures.⁴⁴ Il a ensuite été démontré que les cellules tumorales sont capables de quitter leur masse tumorale pour envahir la ZSV via la voie CXCL12-CXCR4⁴⁵, CXCL12 étant une chimiokine libérée dans l'environnement ZSV et CXCR4 étant exprimé par les cellules tumorales. Une fois installée dans cette région, les cellules développent une résistance à

la radiothérapie.⁴⁶ Ces caractéristiques sont associées à un phénotype semblable à celui des cellules souches.

Dans le cadre des GpHG, en analysant l'autopsie de 16 patients pédiatriques atteints de GDM situés dans le pont, Caretti et al ont observé que 10 d'entre eux, c'est-à-dire 62,5% présentaient une invasion de la ZSV au cours de l'évolution de leur maladie.⁴⁷ Selon 2 études différentes, une invasion de la ZSV a été détectée par imagerie au diagnostic chez 53 % (34/63) et 40 % (21/52) des enfants et adolescents atteints d'un GpHG supratentorial, le contact avec cette zone diminuant la survie des patients.^{48,49} De plus, Qin et ses collègues ont montré que lorsque des cellules de GDM du pont provenant de patients sont injectées dans le pont de souris immunodéficientes, elles migrent vers la ZSV. En effet, il a été démontré que les cellules progénitrices neurales sont capables de sécréter de la pléiotrophine, une protéine favorisant la croissance des neurites, et que l'inhibition de celle-ci diminue l'invasion de la tumeur vers la ZSV murine. Il a également été suggéré que cette protéine exerce son effet en se liant à 2 autres protéines, SPARC/SPARCL1 et HSP90B qui sont des médiateurs importants de l'effet chimioattractant. Ce complexe protéique active finalement la voie Rho/ROCK dans les cellules de gliomes, induisant la migration de celles-ci vers la ZSV.⁵⁰

Tous ces éléments sont donc en faveur d'un rôle pro-tumoral de la ZSV.

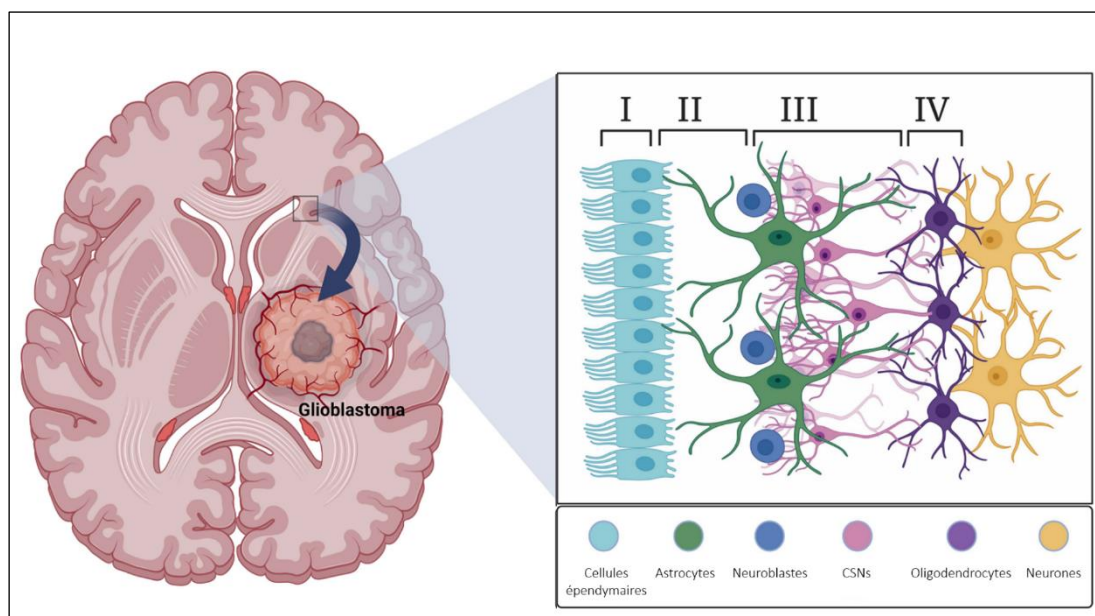


Figure 4 : Structure de la zone sous-ventriculaire humaine (adapté de Beiriger et al, 2022)⁵¹

3. Le plexus choroïde et le liquide céphalo-rachidien :

3.1. Localisation et structure du plexus choroïde :

Le plexus choroïde est un tissu sécrétoire, fortement vascularisé, qui joue un rôle essentiel dans la production de liquide céphalo-rachidien (LCR) présent dans le cerveau des vertébrés. Il tapisse la paroi des VLs, la partie supérieure du troisième ventricule et la partie inférieure du quatrième ventricule (**Figure 5**).⁵²

La structure du plexus choroïde se compose de trois couches (**Figure 6**). La couche externe, entrant en contact avec les ventricules, est constituée de cellules épithéliales cuboïdales reliées par des jonctions serrées qui servent de barrière et empêchent le passage libre de molécules au travers de l'épithélium. Ces cellules possèdent des microvillosités et des cils primaires sur leur membrane apicale, facilitant ainsi la circulation du LCR et augmentant la surface de contact avec la lumière des ventricules. Elles enveloppent un réseau de capillaires fenestrés, constituant la couche interne et comprenant des cellules endothéliales entourées de péricytes. Les capillaires fenestrés, caractérisés par une ouverture de 60 à 80 nm, permettent un passage rapide de l'eau du sang vers les cellules épithéliales pour produire le LCR. Ils présentent une perméabilité accrue, les distinguant ainsi des vaisseaux sanguins cérébraux pénétrants qui sont liés par des jonctions serrées, telles que les occludines, les claudines et les molécules d'adhésion, formant ainsi la barrière hémato-encéphalique (BHE). Entre ces deux couches se situe un compartiment interstitiel composé de cellules stromales mais également de cellules immunitaires.^{52,53}

3.2. Sécrétion et circulation du liquide céphalo-rachidien :

Environ 150 ml de LCR circulent dans le SNC, tandis que 400 à 600 ml sont produits en 24 heures. Celui-ci est ainsi renouvelé 3 à 4 fois par jour.⁵⁴ La production de LCR s'effectue en 2 étapes. Tout d'abord, le plasma est filtré de manière **passive** au travers des capillaires fenestrés vers le compartiment interstitiel. Ensuite, un **transport actif** se fait au travers de l'épithélium choroïdien vers la lumière des ventricules. Celui-ci requière l'intervention de l'anhydrase carbonique et de protéines membranaires transporteuses d'ions. L'anhydrase carbonique se situe dans le cytoplasme des cellules épithéliales de plexus choroïdes et catalyse la formation de H^+ et HCO_3^- à partir d' H_2O et de CO_2 . Ces ions formés vont ensuite être échangés contre des ions Na^+ et Cl^- grâce aux protéines transporteuses d'ions situées au niveau de la membrane basolatérale des cellules épithéliales choroïdiennes. Par la suite, les pompes ATP-dépendantes présentes sur la membrane apicale des cellules choroïdiennes

vont envoyer les ions Na^+ , Cl^- , H^+ , HCO_3^- ainsi que des ions K^+ vers la lumière des ventricules. Ce mouvement d'ions va générer un gradient osmotique qui va faciliter le transport d'eau du sang vers les ventricules, au travers des aquaporines I de la membrane apicale. Le transporteur NaK2Cl situé dans la membrane apicale facilite le mouvement bidirectionnel des ions et joue un rôle dans le contrôle de la sécrétion et de la composition du LCR.^{54, 56, 57, 58} (Figure 7)

Une fois sécrété, le LCR s'écoule du VL au troisième ventricule via le foramen interventriculaire (foramen de Monro), puis continue son cheminement par l'aqueduc cérébral (également appelé aqueduc de Sylvius) jusqu'au quatrième ventricule. De là, le LCR s'écoule dans le canal central de la moelle épinière et se diffuse dans l'espace sous-arachnoïdien par les foramen de Luschka et de Magendie. Arrivé dans cet espace, le LCR est réabsorbé par les villosités et les granulations arachnoïdiennes (connues sous le nom de granulations de Pacchioni), qui le dirigent vers les sinus veineux durs, le faisant ainsi pénétrer dans la circulation veineuse.^{53, 54, 56} (Figure 5)

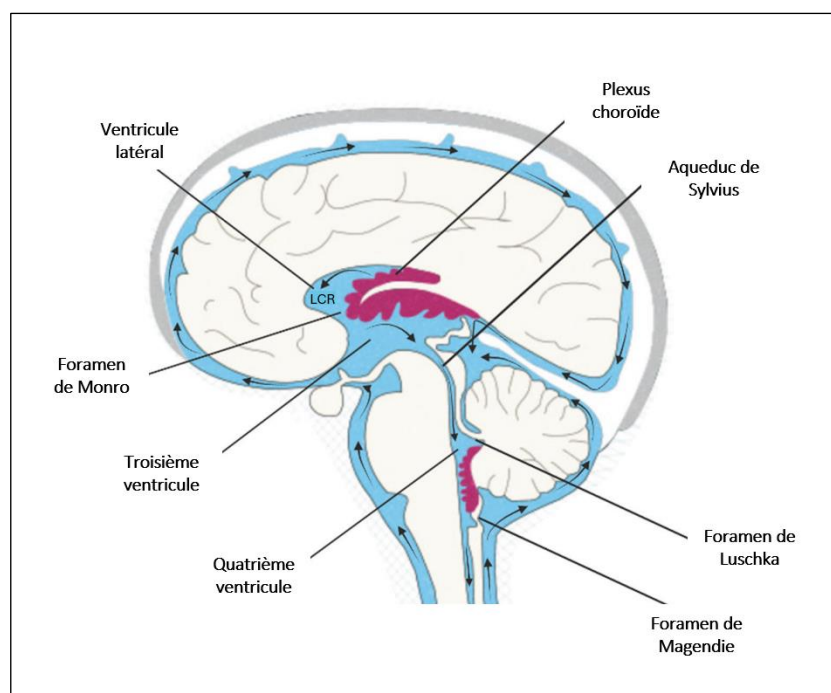


Figure 5 : Localisation du plexus choroïde et circulation du LCR. Les flèches noires représentent le sens de l'écoulement du LCR après sa sécrétion (adapté de Bitanhirwe BKY et al, 2022)⁵⁶

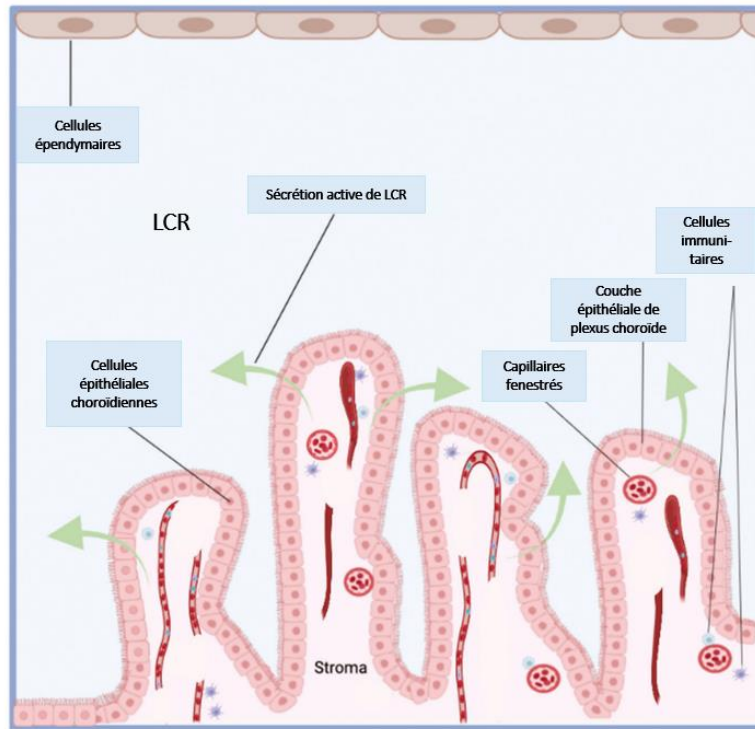


Figure 6 : Histologie et structure du plexus choroïde. Les flèches vertes représentent la deuxième étape de production de LCR, c'est-à-dire le transport actif au travers de l'épithélium choroïdien (adapté de Bitanirhwe BKY et al, 2022)⁵⁶

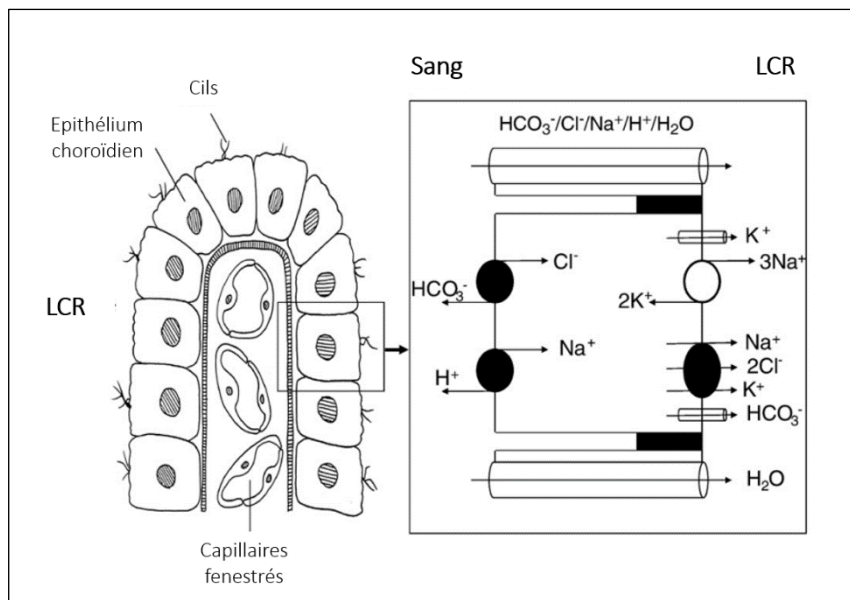


Figure 7 : Sécrétion du LCR par le plexus choroïde, transport actif au travers de l'épithélium choroïdien (adapté de Orešković D et al, 2010)⁵⁸

3.3. Fonctions du système plexus choroïde – liquide céphalo-rachidien :

La fonction principale du plexus choroïde est la sécrétion du LCR. En effet, celui-ci est responsable d'environ 80% de la production de LCR, tandis que les 20% restants proviennent du transport d'ions et de molécules à travers la BHE, constituée de cellules endothéliales recouvrant les capillaires cérébraux et liées par des jonctions serrées.^{55, 57, 58} Le LCR permet de protéger le parenchyme cérébral et a donc un rôle de protection mécanique du cerveau et de la moëlle épinière. En outre, le LCR joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie métabolique du SNC en régulant l'équilibre électrolytique et acido-basique. Il agit également comme un vecteur de nutriments essentiels pour les cellules neuronales et gliales, éliminant les déchets métaboliques cellulaires et transportant diverses substances telles que les hormones, les neurotransmetteurs et les neuropeptides à travers tout le SNC.^{59,60} De plus, le LCR joue un rôle direct dans le contrôle du cycle veille-sommeil grâce à la présence en concentrations élevées du système de prostaglandine D2 (PGD2) et de sa synthase (PGDS). La PGD2 déclenche son effet somnogène en se liant spécifiquement aux récepteurs de PGD2 situés à la surface ventrostrale du cerveau basal.⁶¹

Plusieurs études démontrent que le plexus choroïde et le LCR qu'il sécrète jouent un rôle dans la régulation de la neurogenèse. En effet, il a été prouvé que les CSNs s'étendent jusqu'à la paroi des ventricules, où leurs prolongements ciliaires entrent en contact avec le LCR. Cette interaction CSNs-LCR est impliquée dans la régulation de l'auto-renouvellement, la prolifération et la migration des CSNs, d'une part, par les influences mécaniques liées à la circulation du LCR et d'autre part, par les facteurs transportés par celui-ci (voir section 3.4.).^{62,63} En 2016, Silva-Vargas et ses collègues ont mis en évidence chez la souris que le plexus choroïde situé dans les VLs agissait comme une niche pour les CSNs adultes, les facteurs qu'il sécrète étant capables de moduler le recrutement, la prolifération et la différenciation des cellules de la ZSV. De plus, ils ont observé que les CSNs étaient sensibles aux variations liées à l'âge de ce secrétome, ce qui affecte notamment leur prolifération et leur différenciation.⁶⁴

3.4. Composition du liquide céphalo-rachidien :

Le LCR est constitué de 99% d'eau. Sa composition résulte du passage de molécules et d'ions du sang vers le LCR lors de la production de celui-ci (voir section 3.2.), mais également du secrétome des cellules épithéliales de plexus choroïde. En effet, celles-ci sécrètent de nombreux facteurs de croissance et neurotrophiques qui composent donc le LCR. Parmi ceux-ci, le facteur de croissance 2 analogue à l'insuline (IGF2) stimule le renouvellement des CSNs adultes⁶⁵, la neurotrophine-3 (NT-3)

favorise leur quiescence⁶⁶, le ligand de guidage de fente 2 (SLIT2) participe à la migration des neuroblastes^{62,67}, l'homéoprotéine OTX2 agit sur les astrocytes de soutien afin de réguler l'expression de facteurs extracellulaires qui influencent la migration des neuroblastes.⁶⁸ Le LCR contient également d'autres facteurs de croissance tels que le facteur neurotrophique dérivé de la glie (GDNF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance épithélial (EGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF).⁶⁹ De plus, il est composé de cellules immunitaires, d'hormones, de lipides et de vésicules extracellulaires contenant des protéines et des acides nucléiques. Tous ces éléments sont essentiels pour assurer le bon fonctionnement du cerveau.^{53, 65, 70, 71}

3.5. Le liquide céphalo-rachidien et les gliomes pédiatriques :

Une action du LCR pourrait être l'une des raisons expliquant le rôle « pro-tumoral » de la ZSV. En effet, le LCR entre en contact avec les cellules de la ZSV et est capable de moduler la neurogenèse^{62, 63, 64}, c'est-à-dire, d'agir sur des cellules souches. Il pourrait donc avoir un impact sur les CSGs ayant migré vers la ZSV.

Une étude réalisée chez la souris a montré que les GBMs proches des VLs sont capables de perturber physiquement les cellules épendymaires, entraînant des perturbations dans leur biologie et une interaction accrue du LCR avec la masse tumorale.⁷² Les patients atteints de GBMs proches des VLs contenant du LCR ont un taux de survie inférieur.⁷³ Après la résection chirurgicale, le creux laissé par l'ablation de la tumeur tend à se remplir spontanément de LCR. Les cellules de GBM qui demeurent aux marges de la zone d'exérèse chirurgicale peuvent être entraînées par le flux de LCR circulant dans cette cavité.⁷⁴

Comme mentionné précédemment, le LCR contient divers facteurs de croissance. Une étude pilote menée sur 19 participants adultes (8 atteints de gliome de bas grade, 6 atteints de gliome de haut grade, et 5 témoins sains) a révélé que le taux de VEGF était plus élevé dans le LCR des patients atteints de gliome de haut grade par rapport à ceux atteints de gliome de bas grade et aux témoins. Cela suggère que les patients atteints d'un gliome de haut grade pourraient avoir une capacité angiogénique plus active et une progression tumorale plus rapide.⁷⁵ Le LCR est également composé de cellules immunitaires. Une étude a démontré que le LCR de patients atteints de gliomes contenaient des exosomes chargés de microARNs « miR-3591-3p » sécrétés par les cellules tumorales, favorisant la polarisation M2 des macrophages et ainsi contribuant à la progression du

gliome.⁷⁶ Les macrophages de type M2 sécrètent des facteurs anti-inflammatoires et éliminent les débris cellulaires, favorisant ainsi l'angiogenèse et supprimant l'immunité adaptative. Ils jouent un rôle crucial dans la promotion de la prolifération des cellules tumorales, les métastases et l'angiogenèse.⁷⁷

Stringer et al ont récemment démontré que le LCR humain modifie la morphologie des cellules de GBM adultes, les rendant plus allongées. Il favorise l'état de quiescence des cellules, les rendant plus résistantes au traitement par le TMZ, à la radiothérapie et à la combinaison des deux traitements. Finalement, il modifie le profil des cellules vers un état mésenchymateux.⁷⁸ (**Figure 8**)

Ces résultats pris ensemble suggèrent que le LCR pourrait favoriser la croissance tumorale des gliomes chez les adultes, ce qui soulève des interrogations sur son impact potentiel dans le contexte des gliomes pédiatriques.

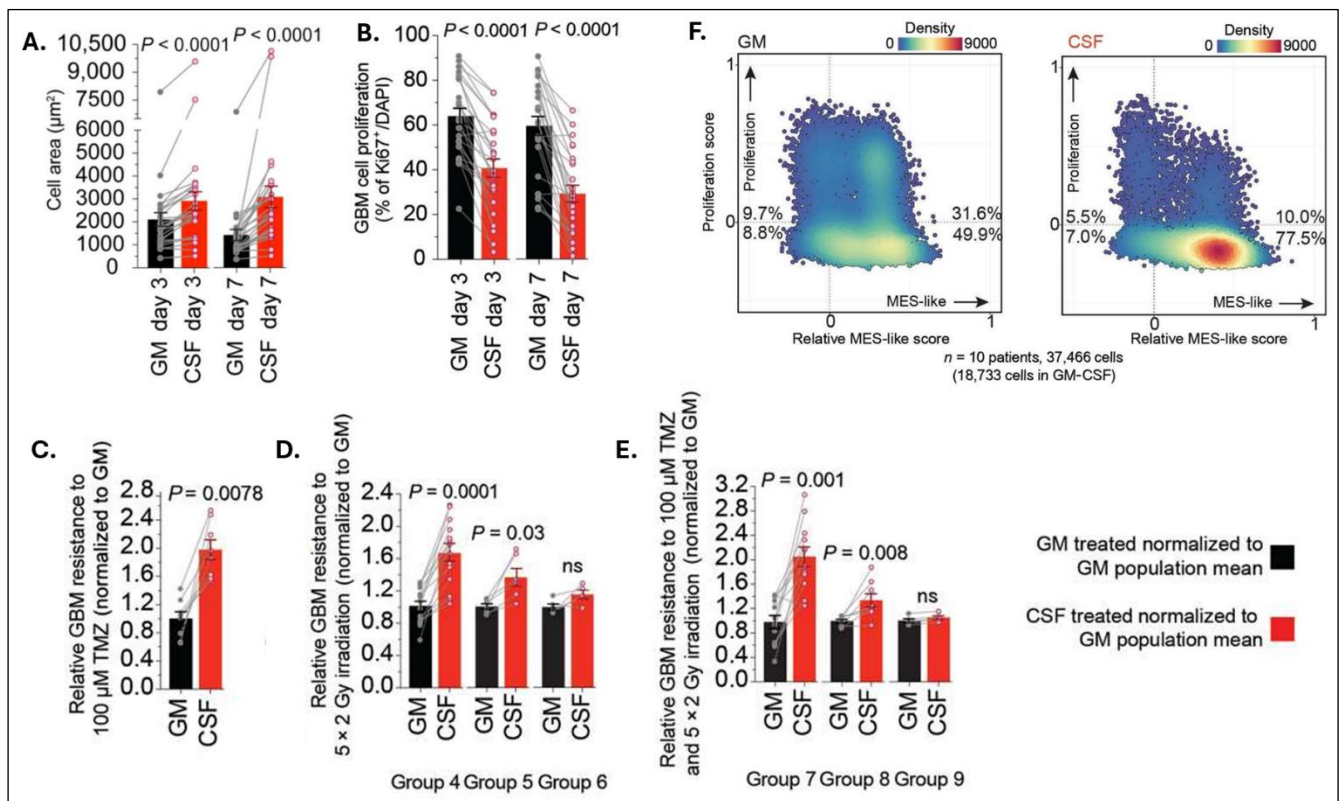


Figure 8 : Effet du LCR sur les cellules de GBM adulte. Comparaison du milieu de culture standard « glioma medium » (GM) au LCR (CSF) (A) Effet du LCR sur la morphologie des cellules de GBM. (B) Effet du LCR sur la prolifération des cellules de GBM. (C-E) Effet du LCR sur la résistance au traitement (C) au témozolomide (TMZ) (D) à la radiothérapie (E) à la combinaison des 2 traitements. Cellules sensibles (groupe 4), modérément sensibles (groupe 5) et insensibles (groupe 6) à la radiothérapie. Cellules sensibles (groupe 7), modérément sensibles (groupe 8) et insensibles (groupe 9) à la combinaison des 2 traitements. (F) Effet du LCR sur le profil mésenchymateux des cellules de GBM. (extrait de Stringer et al, 2023)⁷⁸

2. OBJECTIFS

Objectifs :

1. Hypothèse :

Des recherches antérieures ont démontré que les cellules de GBM peuvent migrer vers la ZSV, les rendant résistantes à la radiothérapie. Cela contribue à un pronostic défavorable chez les patients dont la tumeur entre en contact avec cette région. Des découvertes similaires ont été faites chez l'enfant, bien que l'effet de la ZSV sur les GpHG ait été moins bien étudié.

Compte tenu de l'infiltration connue des cellules de gliome dans cette niche neurogénique, et son impact pronostique, ce projet propose d'étudier les profils des cellules de GpHG dans cette région spécifique. Il est bien connu que, chez tout individu, le LCR, sécrété par les plexus choroïdes situés dans les ventricules, a un rôle clé dans la neurogenèse, en influençant les CSNs situées dans la ZSV chez un patient. Le sécrétome des plexus choroïdes peut forcément influencer aussi les cellules de GpHG situées dans la ZSV. Au vu des preuves précédemment décrites du potentiel effet pro-tumoral du LCR dans le cadre du glioblastome adulte, il est raisonnable d'interroger l'effet de celui-ci dans les GpHG. Dans ce mémoire, nous allons donc vérifier si le sécrétome des plexus choroïdes exerce un effet favorable au développement tumoral dans les gliomes pédiatriques de haut grade.

2. Objectifs :

Ce projet vise à étudier l'influence du sécrétome des cellules de plexus choroïdes sur le phénotype des cellules de GpHG.

3. Stratégie expérimentale :

Pour ce faire, un milieu conditionné imitant le LCR est préparé à partir de cellules épithéliales de plexus choroïdes. L'effet de celui-ci sur le phénotype des cellules de GpHG est ensuite étudié au travers de quatre aspects cellulaires. (1) L'effet de ce milieu sur la morphologie des cellules de GpHG ; (2) son effet sur la prolifération ; (3) son effet sur le destin cellulaire analysé sur base de l'expression de différentes protéines et enfin, (4) son effet sur les capacités migratoires et invasives. Ce protocole de milieu conditionné a été préalablement utilisé dans une étude portant sur l'effet du sécrétome des plexus choroïdes sur la différenciation des CSNs.⁸⁰

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel et méthodes :

1. Culture cellulaire :

1.1. Culture de cellules dérivées de patients :

Quatre lignées cellulaires de CSGs pédiatriques sont utilisées dans le cadre des expériences (DIPGX7, DIPGX37, HGGX42, GBM2-002). Trois lignées proviennent de l'hôpital de recherche pour enfants Saint Jude, aux Etats-Unis (**Tableau 1**).

Nom de la lignée :	Groupe :	Grade :	Localisation :	Age au diagnostic :	Sexe :
SJ-DIPGX7	Gliome diffus de la ligne médiane (H3.3 K27M altéré)	IV	Pont	17 ans	Fille
SJ-DIPGX37	Gliome diffus de la ligne médiane (H3.3 K27M altéré)	IV	Pont	8 ans	Garçon
SJ-HGGX42	Gliome cortical (H3.3 G34R muté)	IV	Cortex	13 ans	Garçon

Tableau 1 : Cultures cellulaires provenant de l'hôpital St. Jude

La lignée GBM2-002, mutée H3.3 G34R, a été établie au sein du laboratoire. L'échantillon obtenu par résection chirurgicale provenant du patient est d'abord nettoyé avec du « Hanks' Balanced Salt Solution » (HBSS, Gibco, 14175095) puis dissocié mécaniquement et de manière enzymatique grâce à une solution contenant de l'Hibernate-A (Gibco, A12475-01), de la Dnase (Sigma, D-5025) et de la papaïne (Worthington, LK003176). La solution est ensuite diluée dans du « Dulbecco's modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12 » (DMEM/F-12, Gibco, A41920-01) supplémenté de 1% de B-27® sans vitamine A (Gibco, 12587-010) puis filtrée à travers des pores de 100µm afin de retirer les débris. Les cellules sont finalement récoltées après centrifugation à 160g pendant 10 minutes et mises en culture dans du milieu adapté à la culture de cellules souches de gliomes pédiatriques (milieu CSG) composé de 100 mL de « Neurobasal™ Medium » (Gibco, 12348-017), 100mL de « KnockOut™ DMEM/F-12 » (Gibco, 12660-012), 2 mL de B-27™ sans vitamine A, 1mL de « N-2 Supplement » (Gibco, 17502-048), 2mL de « StemPro™ Neural Supplement » (Gibco, A10508-01), 8 µl d'héparine (LEO, 030710), 2mL d'HEPES Buffer (Gibco, L0180-100), 2mL de sodium pyruvate (Gibco, 11360-070), 2mL

de GlutaMAX™ (Gibco, 35050-038), 2mL de « MEM non-Essential Amino Acids Solution » (Gibco, 11140-050), 200 µL de primocin™ (InvivoGen, ant-pm-05). A ce milieu est ajouté fraîchement 20ng/mL de facteurs de croissance épidermique recombinant humain (EGF) (Peprotech, AF-100-15), 20ng/mL de facteurs de croissance des fibroblastes recombinant humain (FGF) (Peprotech, 100-18B), 10ng/mL de facteurs de croissance dérivés des plaquettes : PDGF-AA (StemCell Technologies, 78095.1) et PDGF-BB (StemCell Technologies, 78097.1). Toutes les lignées cellulaires sont cultivées dans ce milieu CSG qui va permettre la sélection et l'auto-renouvellement des CSGs qui vont former des neurosphères en suspension. Elles sont maintenues dans un incubateur à une température de 37°C, à un taux de 5% de CO₂. Les cellules sont passées tous les trois ou quatre jours en les dissociant avec de l'acutase (StemCell Technologies, 07922).

Suite à un problème d'approvisionnement en StemPro™ Neural Supplement, les cellules ont également été cultivées dans du milieu de cellules progénitrices neurales (NPC), habituellement utilisé pour les cellules dérivées de patients atteints de GBM adulte. Celui-ci est composé de milieu DMEM/F-12 supplémenté de B27® 1% sans vitamine A, de 2µg/mL d'héparine (LEO, 030710), de pénicilline/streptomycine 1% (Biowest, L0022-100) et de 100µg/mL de normocin™ (InvivoGen, ant-nr-2).

1.2. Culture de cellules de plexus choroïdes immortalisées (Z310) :

Les cellules Z310 (Zheng & Zhao, RRID : CVCL_F753) sont des cellules dérivées de plexus choroïdes de rat Sprague-Dawley. Elles sont cultivées dans du milieu approprié à la culture en 2 dimensions (milieu 2D) composé de « Dulbecco's modified Eagle Medium high Glucose » (DMEM High Glucose, Biowest, L0104-500) supplémenté de 1% de pénicilline-streptomycine (Biowest, L022-100), de 1% de GlutaMAX™ (Gibco, 35050-038) et de 10% de sérum fœtal bovin (FBS) (Gibco, 10270-106). Elles sont maintenues dans un incubateur à une température de 37°C à un taux de 5% de CO₂. Elles sont passées deux fois par semaine.

1.3. Préparation de milieux conditionnés :

1.3.1. *Milieu CSG conditionné par des cellules Z310 (CM-Z310 CSG) :*

500 000 cellules Z310 sont mises en culture durant 48 heures à 37°C dans 10mL de milieu 2D dans une flasque de culture. Ce milieu riche en nutriments favorise la croissance et le maintien des cellules Z310. Après ce temps d'incubation, la flasque est rincée trois fois à l'aide de « Dulbecco's phosphate-buffered saline » (PBS, Biowest, L0615-500). Cette étape est essentielle pour éliminer tout résidu de

FBS ou d'autres composants du milieu de culture. Après ce rinçage, 12mL de milieu CSG sont ajoutés pour remplacer le milieu précédent et les cellules sont incubées à 37°C pendant 24 heures pendant lesquelles elles sécrètent divers facteurs. Le milieu conditionné peut finalement être récolté après ce temps d'incubation et être utilisé pour les différentes expériences. (**Figure 9**)

1.3.2. Milieu NPC conditionné par des cellules Z310 (CM-Z310 NPC):

Ce milieu est réalisé de la même manière qu'au point 1.3.1. en remplaçant le milieu CSG par du milieu NPC.

1.3.3. Milieu CSG conditionné par des cellules MCF-7 (CM-MCF7 CSG) :

À la suite des observations au microscope, la présence d'un effet adhérent des cellules a été identifié dans le CM-Z310. Des expérimentations ont été conduites pour déterminer si cet effet était transitoire ou persistant. Ces tests ont conduit à la conclusion que le CM-Z310 CSG provoque une adhérence, en particulier dans 2 des 4 lignées cellulaires (GBM2-002 et DIPGX37), et que cet effet peut être maintenu en renouvelant le milieu toutes les 24 heures. Afin de démontrer que cet effet est spécifiquement lié au CM-Z310 CSG et non aux résidus potentiels de FBS du milieu 2D, le milieu conditionné CM-MCF7 CSG a été utilisé comme contrôle.

Ce milieu est réalisé de la même manière qu'au point 1.3.1. en remplaçant les cellules Z310 par des cellules MCF-7, une lignée cellulaire de cancer du sein.

1.3.4. Milieu NPC conditionné par des cellules MCF-7 (CM-MCF7 CSG) :

Ce milieu est réalisé de la même manière qu'au point 1.3.3. en remplaçant le milieu CSG par du milieu NPC.

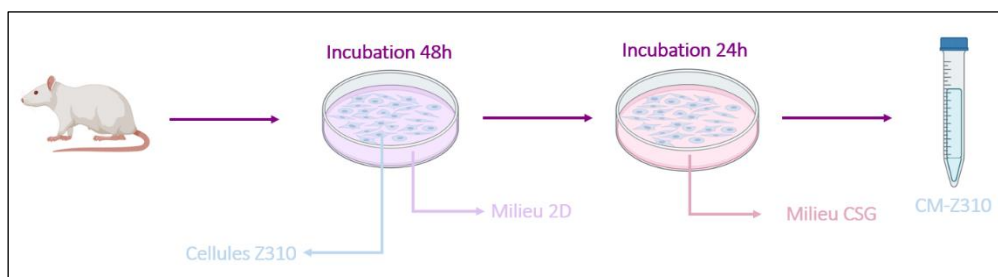


Figure 9 : Préparation du CM-Z310 CSG

2. Caractérisation des cellules :

2.1. Cellules Z310 :

La caractérisation de ces cellules a été réalisée par immunofluorescence en mettant en évidence 3 protéines spécifiques : la bêta-caténine, la E-cadhérine et la transthyréline. Pour ce faire, des coverslips ont été disposés dans une plaque de 24 puits (1 coverslip par puits) et coatés à l'aide de Poly-L-Ornithine pendant 2 heures. Trois rinçages ont ensuite été effectués. 50 000 cellules ont été ensemencées dans chaque puits avec 500 µl de milieu 2D et la plaque a été incubée pendant 48 heures pour permettre la prolifération cellulaire. Après ce temps d'incubation, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) pendant 10 minutes, et rincées 3 fois avec du PBS. Les sites aspécifiques ont été bloqués avec du « Donkey serum 10% » (Jackson ImmunoResearch, 017-000-121), les cellules ont été perméabilisées avec du PBS-triton 0,1% pendant 1 heure, puis les coverslips ont été rincés 3 fois. Pour éliminer l'autofluorescence des cellules, du « TrueBlack Lipofuscin Autofluorescence Quencher » (Biotium, 23007) dilué 20 fois dans de l'éthanol 70% a été ajouté, suivi de 3 rinçages. Ensuite, les anticorps primaires (**Tableau 2**) dilués dans du PBS ont été appliqués et incubés pendant une nuit à 4°C, avec deux dilutions testées : 1/100 et 1/1000. Le lendemain, les anticorps primaires ont été rincés trois fois et l'anticorps secondaire anti-lapin (Jackson ImmunoResearch, 711-175-152) a été ajouté et incubé pendant 2 heures à température ambiante. Enfin, les coverslips ont été rincés et une solution DAPI (Sigma Aldrich, 28718-90-3) diluée 10 000 fois dans de l'eau a été ajoutée pendant 10 minutes à température ambiante pour mettre en évidence les noyaux des cellules. Les images ont été capturées à l'aide du microscope à épifluorescence ApoTome (Zeiss).

Anticorps :	Espèce :	Firme :	Référence :	Dilution :
Bêta-caténine	Lapin	Cell Signaling	8480S	1/100 et 1/1000
E-cadhérine	Lapin	Cell Signaling	3195S	1/100 et 1/1000
Transthyréline	Lapin	Cell Signaling	29872S	1/100 et 1/1000

Tableau 2 : Anticorps primaires utilisés pour caractériser les cellules Z310 par immunofluorescence

2.2. Cellules tumorales :

La caractérisation des cellules tumorales a également été effectuée par immunofluorescence sur des neurosphères préalablement sectionnées au cryostat. Deux mutations spécifiques à chaque type de gliome pédiatrique ont été mises en évidence : H3 G34 (présente dans les cellules GBM2-002 et HGGX42) et H3 K27 (détectée dans les cellules DIPGX7 et DIPGX37). Les étapes de blocage, de perméabilisation, de coloration des noyaux et d'incubation des anticorps primaires (**Tableau 3**) ont suivi le même protocole que celui décrit précédemment au point 2.1. Le même anticorps secondaire a été employé comme mentionné à la section 2.1.

Anticorps :	Espèce :	Firme :	Référence :	Dilution :
Anti-histone H3.3 G34R/V	Lapin	RevMab Biosciences	31-1193-00-S	1/400
Anti-histone H3 K27M	Lapin	RevMab Biosciences	31-1175-00-S	1/400

Tableau 3 : Anticorps primaires utilisés pour caractériser les lignées cellulaires tumorales par immunofluorescence

3. Analyse de la morphologie des cellules tumorales :

La morphologie a été examinée à l'aide du microscope IRIS permettant l'observation et la capture d'images dans diverses conditions (Milieu CSG, CM-Z310 CSG, CM-Z310 NPC, CM-MCF7 CSG). 100 000 cellules par puits ont étéensemencées dans des plaques 24 puits. Les images ont été capturées à différents temps (3h, 6h, 24h, 27h, 48h et 72h).

4. Analyse du destin cellulaire par Western Blot :

100 000 cellules de chaque lignée cellulaire ont été cultivées dans une plaque 24 puits avec 500 mL de milieu CSG, de CM-Z310 CSG ou de CM-MCF7 CSG pendant 24 heures à 37°C. Les cellules ont ensuite été collectées par centrifugation à 290g pendant 3 minutes et lysées à l'aide d'un tampon de lyse contenant du Triton 100x, du Tris-HCl et du NaCl, dans lequel des inhibiteurs de protéases et phosphatases (ThermoFisher Scientific, 78440) sont dilués 100 fois. Après une incubation de 10 minutes sur glace, les cellules ont été soniquées (Labsonic U) pour finaliser la lyse. Une centrifugation de 10 minutes à 4°C à 12 000g a ensuite été réalisée pour récolter le surnageant contenant les protéines. Les échantillons ont été préparés de manière à contenir 20µg de protéines et sont composés de tampon de lyse et de tampon de chargement contenant du Tris-HCl, du glycérol 20%,

du SDS 2%, du bleu de Bromophénol 0,01% et du β -mercaptoéthanol 5%. Après préparation, ils ont été chauffés à 95°C pour achever la dénaturation des protéines. Les échantillons peuvent ensuite être chargés sur un gel de polyacrylamide 10% pour effectuer la migration des protéines à une intensité de 400 mA et une puissance de 80 volts pour le gel de concentration, et de 100-120 volts pour le gel de séparation, pendant environ une heure et 30 minutes. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) pendant une heure à une puissance de 100 volts et une intensité de 400 mA. Après ce transfert, les sites aspécifiques ont été bloqués pendant une heure sous agitation dans du lait 5%. La membrane a ensuite été incubée pendant une nuit dans du lait 5% contenant l'anticorps primaire dilué (**Tableau 4**). Après trois rinçages dans du TTBS (« Tween-Tris-Buffered Saline ») sous agitation, elle a été incubée dans du lait où l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la HRP (Cell Signaling Technology, 7074S) ou anti-souris couplé à la HRP (Cell Signaling Technology, 7076S) a été dilué 2000 fois. Après trois lavages dans du TTBS, la révélation a été réalisée à l'aide du kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (ThermoScientific, 34577) ou SuperSignal™ West Femto PLUS Chemiluminescent Substrate (ThermoScientific, 34095). La quantification des Western Blots (WB) a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ.

	Anticorps :	Espèce :	Firme :	Référence :	Dilution :
Marqueurs souches :	SOX2	Lapin	Cell Signaling	3579	1/1000
	Nestine	Souris	Santa Cruz	SC23927	1/1000
Marqueur neuronal :	Beta III-tubuline	Souris	Cell Signaling	MMS-435P	1/1000
Marqueurs associés aux microtubes :	Connexine-43	Lapin	Abcam	ab11370	1/2000
	F-actine	Souris	Abcam	ab205	1/1000
Marqueur d'adhésion :	E-cadhérine	Lapin	Cell Signaling	3195	1/1000
Marqueurs associés à la migration/invasion :	Vimentine	Lapin	Cell Signaling	5741	1/1000
	ZEB-1	Lapin	Cell Signaling	3396P	1/1000

Tableau 4 : Anticorps primaires utilisés pour les western blots

5. Analyse de la prolifération :

5.1. Cytométrie en flux :

L'analyse de l'expression du marqueur Ki67, protéine exprimée durant le cycle cellulaire, a été réalisée par cytométrie en flux. 300 000 cellules ont d'abord étéensemencées dans les différentes conditions (Milieu CSG versus CM-Z310 CSG) dans une plaque 24 puits, durant 24 ou 48 heures. Elles ont ensuite été récoltées et 500 µl de solution zombie Nir (BioLegend, 77184) diluée 1000 fois dans du PBS ont été ajoutés afin de marquer les cellules viables. Après un temps d'incubation de 10 minutes, les cellules ont été rincées avec du PBS et centrifugées à 290g durant 3 minutes. Elles ont ensuite été perméabilisées à l'aide du kit « BD Pharmingen™ Transcription Factor Buffer Set » (BD Biosciences, 562574) pendant 50 minutes à 4°C et ont été rincées à l'aide de « TF Perm/Wash Buffer » dilué 5 fois dans de l'eau. Après cette étape de lavage, les cellules ont été centrifugées à 4°C pendant 5 minutes à 1000g. Elles ont été rincées une deuxième fois avec du « TF Perm/Wash Buffer » pour finalement être incubées avec l'anticorps Ki67 couplé à l'Alexa Fluor™ 647 (Invitrogen, MA5-44140) pendant 1 heure à 4°C. Pour terminer, l'anticorps a été rincé à l'aide de « TF Perm/Wash Buffer » et les cellules positives Ki67 ont été analysées au BD FACSCanto II (BD Biosciences).

5.1. Comptages cellulaires :

5.1.1. *Mise au point de l'expérience :*

Des comptages au bleu de trypan ont été effectués à l'aide du Countess II FL (Life Technologies) pour évaluer la prolifération des cellules dans les diverses conditions. Initialement, 100 000 cellules ont étéensemencées dans 500 µl de milieu dans les différentes conditions (Milieu CSG versus CM-Z310 CSG) dans une plaque 24 puits. Dans un premier temps, un renouvellement du milieu toutes les 24 heures a été réalisé. À cet effet, les cellules ont été récoltées dans chaque condition, centrifugées à 290g, puis resuspendues dans 500 µl de milieu. Elles ont ensuite été incubées à 37°C pendant 72 heures avant d'être comptées.

5.1.2. *Comptage en ajoutant du milieu toutes les 24 heures :*

En raison d'une perte de cellules trop importante par rapport au nombre initial ensemencé, le renouvellement du milieu a été suspendu, et remplacé par un ajout de 200 µl de milieu à chaque condition toutes les 24 heures. Les cellules ont ainsi été incubées à 37°C pendant 72 heures avant d'être comptées. Les expériences ont été effectuées en triplicat.

6. Test de résistance au traitement ONC 201 :

Des tests de viabilité ont été réalisés suite aux traitements des cellules à l'ONC201, une molécule anticancéreuse en cours d'essai clinique. Les concentrations inhibitrices médianes préalablement définies sont les suivantes : 0,9 μM pour la lignée DIPGX7, 1,8 μM pour la lignée DIPGX37, 1,4 μM pour la lignée GBM2-002, 0,9 μM pour la lignée HGGX42. La molécule étant diluée dans du DMSO, le contrôle négatif de cette expérience est donc un volume égal de DMSO seul. 15 000 cellules ont été ensemencées dans les différentes conditions (Milieu CSG, CM-Z310 CSG, CM-MCF7 CSG) avec traitement ou DMSO seul, dans une plaque 96 puits, en triplicat. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C durant 72h, temps préalablement défini nécessaire à l'efficacité de la molécule. Le test de viabilité a été réalisé à l'aide d'un réactif (Cell Titer Glo® 2.0, Promega, G9242) se liant à l'ATP des cellules lysées et permettant la production d'oxyluciférine, une molécule luminescente. L'intensité de luminescence, proportionnelle à la quantité d'ATP et donc à la viabilité des cellules a ensuite été mesurée à l'aide du lecteur de luminescence Tristar² S LB 942 (Berthold Technologies). Le programme utilisé était le suivant : 120 secondes d'agitation, 10 minutes d'attente, 1 seconde par puits de lecture de luminescence.

7. Test de migration/invasion :

7.1. Chambre de Boyden :

7.1.1. *Mise au point de l'expérience :*

Des inserts possédant des pores de 8 μm de diamètre (Thincerts™, Greiner Bio-One, 662638) ont été coatés avec du collagène de type 1 (Sigma Aldrich, C3867-1VL) dilué 100 fois dans du PBS ou avec de la matrice extracellulaire (ECM Gel) (Sigma Aldrich, E1270-1ML) diluée 20 fois dans du milieu CSG. Ces inserts ont été placés dans une plaque 24 puits et ont été incubés durant 2 heures. Le collagène ou l'ECM Gel ont ensuite été aspirés et les inserts ont été placés dans une plaque 24 puits contenant 500 μl de milieu CSG avec 10% de FBS (contrôle positif) ou sans FBS (contrôle négatif). 50 000 cellules par insert ont ensuite été ensemencées dans 300 μl de milieu et ont été incubées durant 24, 48 ou 72 heures afin de déterminer le temps optimal nécessaire à la migration et l'invasion des cellules. A chaque timing, les cellules ont d'abord été fixées à l'aide de PFA 4% durant 10 minutes pour ensuite être rincées 3 fois avec du PBS. Les cellules ont ensuite été colorées au crystal violet 5% dilué dans de l'éthanol 70% qui va permettre de colorer les cellules qui ont migré, c'est-à-dire celles qui sont passées au travers des pores. Ce colorant nécessite un temps d'incubation de 10 minutes qui sera suivi de

rinçages dans un large volume de PBS. L'intérieur des inserts a finalement été nettoyé à l'aide d'un coton pour enlever tout résidu de cellules n'ayant pas migré.

7.1.2. Analyse de la migration/invasion des cellules tumorales en réponse au milieu conditionné :

La durée optimale de migration déterminée étant de 72 heures, les expériences ont été menées sur cette période. Les conditions comprenaient un changement de milieu dans les puits et l'ajout de 100 µl de milieu dans les inserts toutes les 24 heures. Les lignées qui ont été utilisées pour ces expériences sont les cellules DIPGX37 et GBM2-002. L'expérience a été réalisée en triplicat pour chaque condition. Les différentes conditions sont décrites sur la **figure 10**. L'observation des cellules ayant migré a été réalisée à l'aide du microscope optique Echo Revolve (ECHO, a BICO company). Cinq captures d'images par insert ont été obtenues avec l'objectif 10x et une image représentative par condition a été acquise avec l'objectif 20x.



Figure 10 : Conditions du test de migration/invasion des cellules tumorales en réponse au CM-Z310

7.1.3. Analyse de la migration/invasion des cellules tumorales induite par le milieu conditionné :

Le même protocole a été suivi pour les conditions décrites sur la **figure 11**.

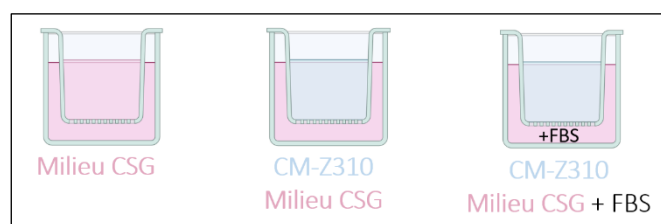


Figure 11 : Conditions du test de migration/invasion des cellules tumorales induite par le CM-Z310

La quantification de ces tests a été réalisée à l'aide du logiciel QuPath-0.5.0.

8. Analyse de la morphologie dans le liquide céphalo-rachidien :

Le laboratoire ayant reçu du LCR provenant de plusieurs patients du CHU, du LCR provenant d'une jeune fille de 19 ans atteinte d'une hypertension intracrânienne bénigne a été utilisé dans le cadre des expériences. 15 000 cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits dans du LCR versus

du NPC comme contrôle. Les images ont été capturées à 3h, 6h et 24h après mise en culture à l'aide du microscope IRIS.

9. Étude de l'expression de la vimentine et de la protéine Ki67 dans le liquide céphalo-rachidien par immunofluorescence :

10 000 cellules ont étéensemencées dans 100 µl de milieu dans une plaque 96 puits et cultivées durant 24h dans du LCR versus du NPC comme contrôle. Les immunofluorescences ont été réalisées de manière similaire à celles décrites à la section 2. Les anticorps primaires utilisés sont décrits dans le **tableau 5**.

Anticorps :	Espèce :	Firme :	Référence :	Dilution :
Vimentine	Lapin	Cell Signaling	5741	1/100
Ki67	Lapin	Abcam	ab15580	1/100

Tableau 5 : Anticorps primaires utilisés pour les immunofluorescences réalisées après culture dans du LCR

10. Statistiques :

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 8.0.1. Pour chaque expérience, les statistiques ont été réalisées sur un minimum de 3 répétitions (N=3). La normalité des données a été préalablement vérifiée en s'assurant d'une distribution gaussienne de la variable, en comparant les moyennes et médianes de chaque groupe, en construisant des graphiques quantile-quantile (QQ-plot) et en appliquant le test de Shapiro-Wilk. Les tests t de Student ont été utilisés pour évaluer la prolifération, après vérification de la normalité dans chaque condition. La correction de Welch a été appliquée en cas d'écarts importants dans les déviations standard entre 2 groupes. Pour les expériences impliquant plus de 2 conditions, telles que les tests de résistance et de migration/invasion, un test ANOVA a été réalisée si la normalité était confirmée, suivie de comparaisons multiples à l'aide du test de Tukey. En cas de non-normalité, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été effectué, suivi de comparaisons multiples avec le test de Dunn. Une différence était considérée comme statistiquement significative lorsque la p-valeur était inférieure à 0,05.

4. RÉSULTATS

Résultats :

1. Caractérisation des cellules :

1.1. Cellules Z310 :

Les cellules épithéliales de plexus choroïde sont des cellules de forme polygonale (**Figure 12**), adhérant au plastique, permettant de créer le CM-Z310 qui constitue le milieu sur lequel reposent toutes nos expériences. Dans le but de les caractériser, des immunofluorescences ont été réalisées afin de détecter 3 protéines spécifiques à ce type cellulaire : la transthyrétine (**Figure 13A**) reconnue comme une protéine de transport de la thyroxine produite par l'épithélium choroïdien dans le système nerveux central, ainsi que la bêta-caténine, retrouvée dans les jonctions adhérentes (**Figure 13B**) et la E-cadhérine, une protéine d'adhésion cellulaire (**Figure 13C**). La présence de ces 3 protéines au sein des cellules Z310 confirme leur identité de cellule épithéliale choroïdienne et la pertinence de leur utilisation pour les expériences effectuées lors de ce mémoire.

1.2. Cellules tumorales :

Comme évoqué dans l'introduction, différents sous-types de GpHG existent. Notre étude se concentre sur 2 de ces sous-types, les plus fréquemment observés : les gliomes H3 K27M altérés et les gliomes H3 G34R/V mutés. Afin de caractériser les cellules servant de base à nos expériences, des immunofluorescences ont été effectuées sur les 4 lignées cellulaires (DIPGX7, DIPGX37, GBM2-002 et HGGX42) pour mettre en lumière les mutations d'histones spécifiques à ces types de tumeurs. La détection de ces mutations confirme la pertinence de l'utilisation de ces lignées cellulaires dans le cadre de nos recherches. Les mutations H3 K27M sont présentes dans les lignées DIPGX7 (**Figure 14A**) et DIPGX37 (**Figure 14B**) et les mutations H3 G34R/V sont retrouvées dans les cellules GBM2-002 (**Figure 14D**) et HGGX42 qui n'ont malheureusement pas pu être caractérisées. Nous pouvons observer que le signal semble apparaître dans le cytoplasme pour la mutation H3 K27 et dans la membrane cytoplasmique pour la mutation H3 G34. Cependant, ces mutations touchant les histones, elles devraient se trouver dans le noyau. Nous pouvons par contre constater que le signal H3 K27 est absent dans les cellules GBM2-002 (**Figure 14C**) et le signal H3 G34 est absent dans les cellules DIPGX37 (**Figure 14E**).

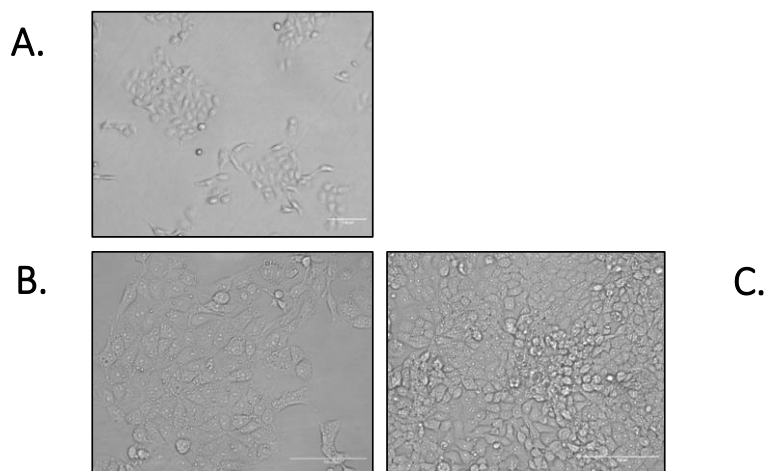


Figure 12 : Images prises au microscope optique caractérisant les cellules Z310 (A) en grossissement 10X et (B) en grossissement 20X à une confluence d'environ 60% (C) en grossissement 20X à une confluence de 100%.

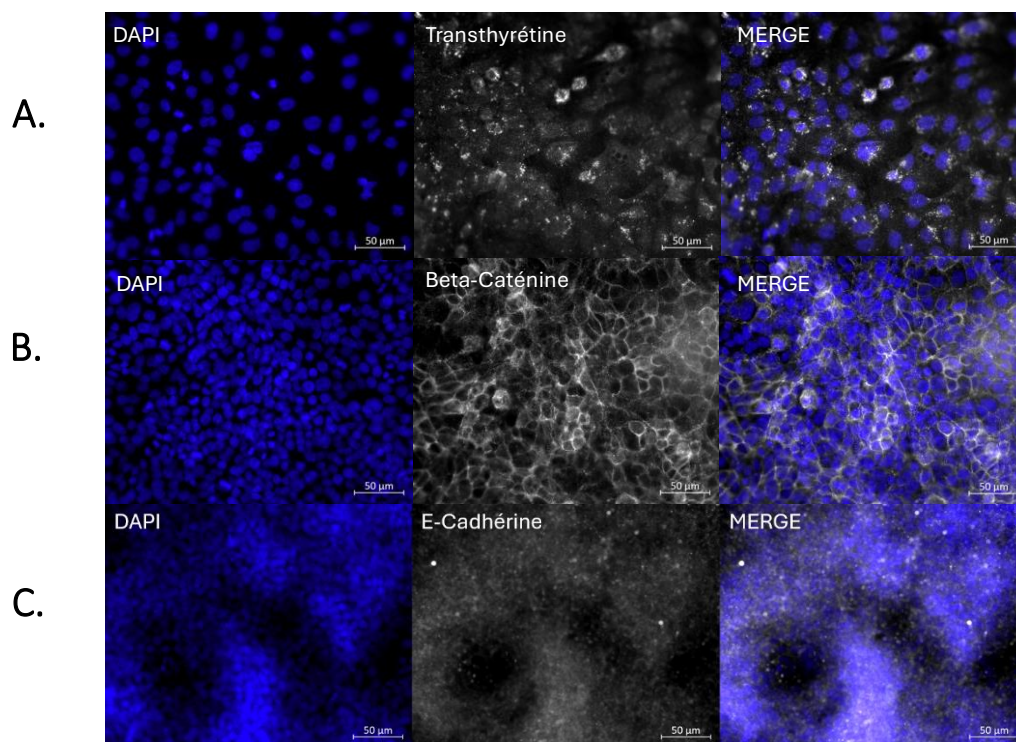


Figure 13 : Images d'immunofluorescences des cellules Z310 représentant l'expression de 3 protéines spécifiques : (A) Transthyréline, (B) Beta-caténine, (C) E-cadhérine.

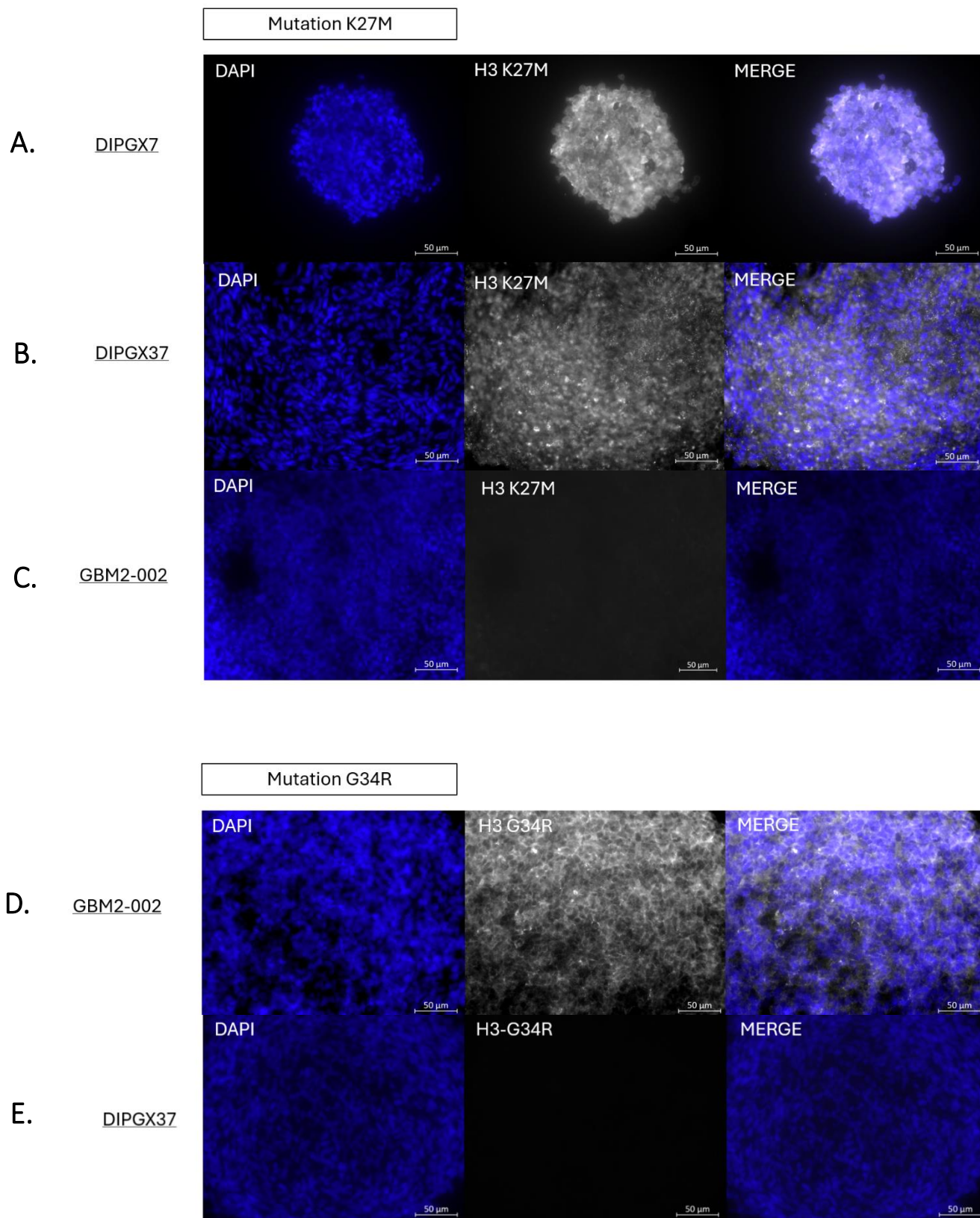


Figure 14 : Images d'immunofluorescences représentant l'expression de la mutation H3 K27M dans les cellules (A) DIPGX7 et (B) DIPGX37, qui n'est pas présente dans les cellules (C) GBM2-002. Images d'immunofluorescences représentant l'expression de la mutation H3 G34R dans les cellules (D) GBM2-002, qui n'est pas présente dans les cellules (E) DIPGX37.

2. Influence du CM-Z310 sur la morphologie des cellules tumorales :

Tout d'abord, les 4 types cellulaires ont été mis en culture dans le CM-Z310 CSG, le milieu CSG et le CM-MCF7 CSG comme contrôle. La morphologie a d'abord été analysée au microscope optique à différents intervalles de temps (3h, 6h et 24h). Après 3 heures, les cellules commençaient déjà à émettre des prolongements et à adhérer dans le CM-Z310 CSG pour les 4 lignées, en particulier dans les DIPGX37 (**Figure 15A**) et les GBM2-002 (**Figure 15C**). Cet effet était également présent dans les cellules DIPGX7 et les HGGX42 mais de manière moins prononcée (**Figure supplémentaire 1A et 1B**). L'adhérence et les prolongements augmentaient au fur et à mesure du temps, formant un réseau cellulaire où les cellules semblaient se connecter entre elles jusqu'à 24 heures où elles commençaient à reformer des sphères. Ce phénotype était absent dans le milieu CSG, milieu de culture standard, mais également dans le CM-MCF7 CSG.

Comme expliqué précédemment, le LCR est renouvelé 3 à 4 fois par jour. Pour reproduire cette dynamique au mieux et vérifier si ce phénotype adhérent pouvait être maintenu sur la durée, le CM-Z310 CSG, mais également nos 2 milieux contrôles, ont été remplacé toutes les 24 heures. Nous avons constaté que les cellules conservaient leurs prolongements jusqu'à 72 heures après renouvellement du milieu (**Figure 15B et 15D**).

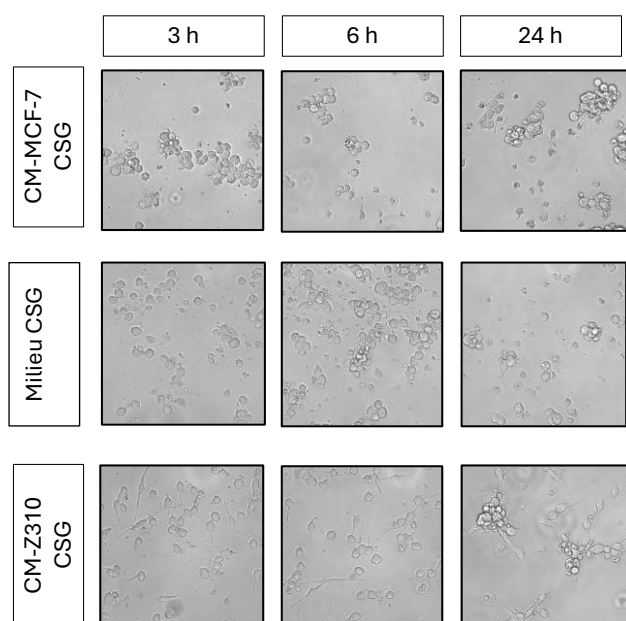
Par souci d'approvisionnement en StemPro™ Neural Supplement, un des composants du milieu CSG, certaines expériences ont été réalisées dans du NPC et du CM-Z310 NPC, l'effet de ce dernier sur les cellules tumorales ayant été vérifié au préalable (**Figure 15E**).

Le CM-Z310 a donc un effet sur la morphologie des 4 lignées cellulaires tumorales. Sur base de ces observations, la suite des expériences a été poursuivie en renouvelant chaque milieu toutes les 24 h, lorsque cela était possible, afin de rendre notre modèle aussi réaliste que possible.

DIPGX37

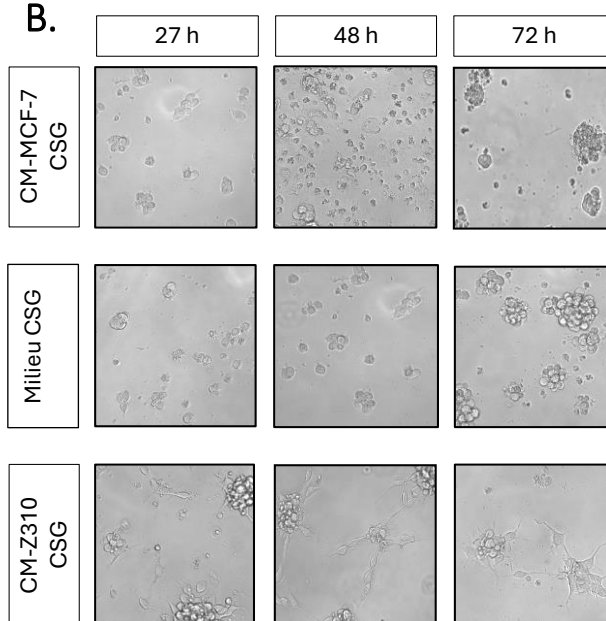
A.

Milieu ajouté à t=0h



B.

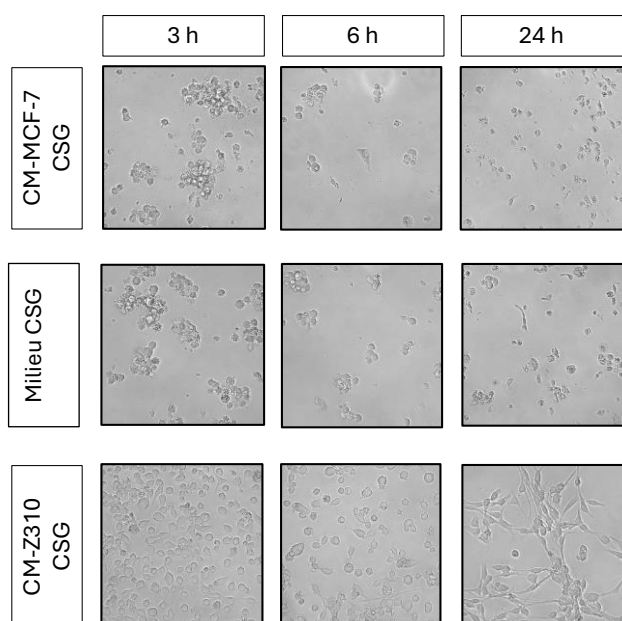
Changement de milieu toutes les 24h



GBM2-002

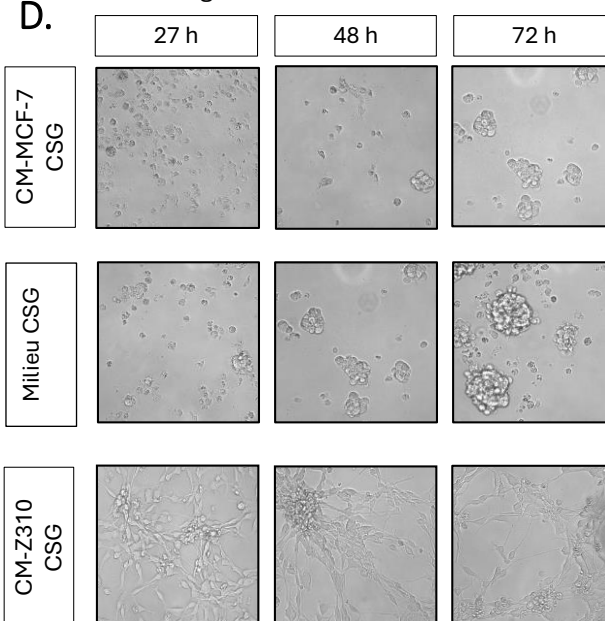
C.

Milieu ajouté à t=0h



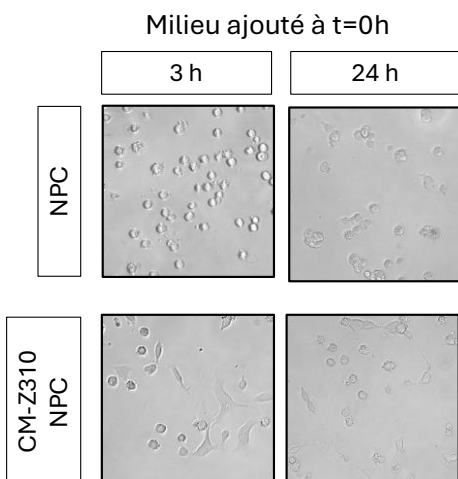
D.

Changement de milieu toutes les 24h

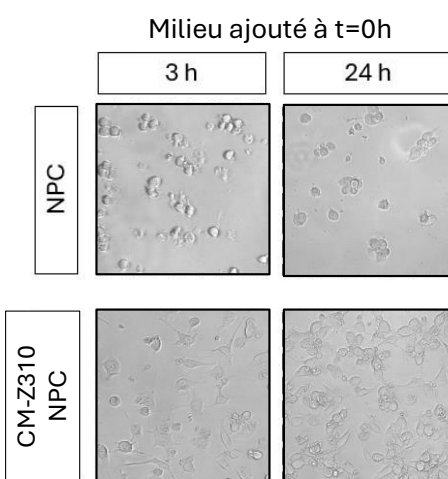


E.

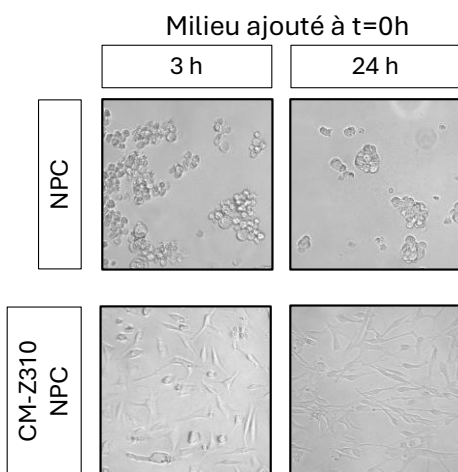
DIPGX7



DIPGX37



GBM2-002



HGGX42

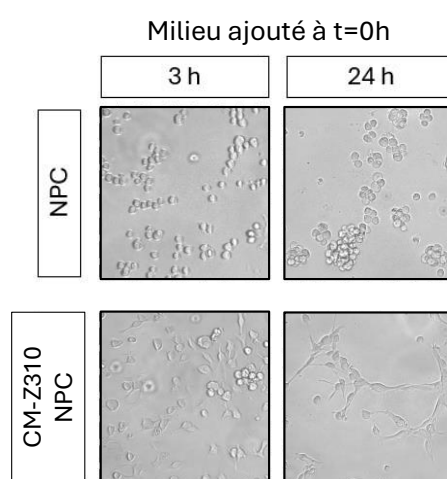


Figure 15 : images capturées par microscopie optique en grossissement 20X après mise en culture de 100 000 cellules par puits dans les différentes conditions (Milieu CSG ou NPC, CM-Z310, CM-MCF7). Images représentatives du changement de morphologie dans le CM-Z310 comparé au milieu CSG et au CM-MCF7 CSG à 3h, 6h et 24h des cellules de la lignée (A) DIPGX37 et (C) GBM2-002. Images représentatives du maintien du changement de morphologie à 27h, 48h et 72h dans le CM-Z310 en renouvelant les milieux des cellules (B) DIPGX37 et (D) GBM2-002. (E) images représentatives de la mise en culture des 4 lignées cellulaires dans du milieu NPC versus CM-Z310 NPC à 3h et 24h .

3. Influence du CM-Z310 sur la prolifération des cellules tumorales :

Ce paramètre a été étudié car une des caractéristiques des cellules cancéreuses est l'augmentation de leur faculté à proliférer. Dans un premier temps, pour connaître l'impact du CM-Z310 sur les capacités prolifératives des cellules, l'analyse de l'expression du marqueur Ki67 a été réalisée par cytométrie en flux sur les 4 lignées cellulaires. Les cellules ont été mises en culture dans du CM-Z310 CSG versus milieu CSG et l'analyse de l'expression du marqueur Ki67 a été réalisée à 2 temps différents : 24h et 48h. Nous n'avons pas observé de différence significative (p -valeur $> 0,05$) au niveau de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF), qui reflète l'expression de Ki67, dans le CM-Z310 CSG comparé au milieu CSG sans facteur de croissance, que ce soit à 24h (DIPGX37 : p -valeur = 0,4311) ou 48h (DIPGX37 : p -valeur = 0,3937 ; GBM2-002 : p -valeur = 0,9846) (**Figure 16A et 16B**). Cette observation était également valable pour le pourcentage de cellules Ki67 positives (% de cellules Ki67+) à 24h (DIPGX37 : p -valeur = 0,9285 ; GBM2-002 : p -valeur = 0,8394) et à 48h (DIPGX37 : p -valeur = 0,5296 ; GBM2-002 : p -valeur = 0,5454) (**Figure 16C et 16D**). Le pourcentage de cellules Ki67 positives (Ki67+) est représenté sur la **figure 16 E-H**. La même expérience a été réalisée avec l'ajout de facteurs de croissance dans les 2 milieux et les résultats obtenus étaient similaires (**Figure supplémentaire 2A et 2B**).

La cytométrie en flux nous fournissant un indicateur du pourcentage de cellules exprimant la protéine Ki67 (% de cellules Ki67+) ainsi que de la quantité de protéine Ki67 exprimée (IMF), mais ne fournissant pas d'information sur le nombre total de cellules dans un échantillon, des comptages cellulaires au bleu de trypan ont été réalisés pour compléter nos analyses de prolifération. Nous avons pu observer des résultats similaires à ceux obtenus par cytométrie en flux. En effet, après 72h de culture dans chaque milieu, avec ajout de milieu toutes les 24 heures, il n'y avait pas de différence significative au niveau du nombre de cellules dans le CM-Z310 CSG comparé au milieu CSG (DIPGX37 : p -valeur = 0,7352 ; GBM2-002 : p -valeur = 0,2629 ; HGGX42 : p -valeur = 0,0738). Les résultats sont présentés sous forme de ratio du nombre de cellules au jour 3 divisé par le nombre de cellules au jour 1 (**Figure 17A**).

La viabilité de chaque lignée donnée par le compteur automatique dans les différents milieux a également été analysée après 72h de culture. Nous observons qu'il n'y a pas de différence significative (GBM2-002 : p -valeur = 0,1367 ; HGGX42 : p -valeur = 0,8851) au niveau de la viabilité entre le CM-Z310 CSG comparé au milieu CSG sauf dans la lignée cellulaire DIPGX37 (p -valeur = 0,0357) (**Figure 17B**).

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le CM-Z310 CSG n'a pas d'effet sur la prolifération des différentes lignées cellulaires comparé au milieu contrôle, le milieu CSG.

4. Influence du CM-Z310 sur la réponse au ONC201 des cellules tumorales :

Un des problèmes majeurs des gliomes pédiatriques est leur résistance au traitement. L'ONC 201 est une molécule actuellement en essai clinique, ayant déjà démontré une amélioration de la survie chez certains patients. Nous avons donc étudié l'effet de l'exposition au CM-Z310 sur l'efficacité du ONC201. Chaque lignée cellulaire ayant déjà été examinée pour leur réponse au ONC201 et leurs concentrations inhibitrices médianes respectives ayant été préalablement définies, les cellules ont été mises en culture dans le milieu CSG, le CM-Z310 CSG ou le CM-MCF7 CSG pendant une durée de 72h, temps défini au préalable nécessaire à l'action de la molécule. Par souci technique, les milieux n'ont pas pu être renouvelés dans le cadre de cette expérience. La viabilité a été analysée après 72h de culture grâce au réactif Cell Titer Glo® 2.0. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de viabilité par rapport au DMSO, c'est-à-dire le contrôle, où les cellules ont été traitées uniquement avec du DMSO dans leur milieu respectif (**Figure 18**). La viabilité était similaire dans les 3 milieux, pour les 4 lignées. En effet, aucune différence significative n'a été mise en évidence (p-valeurs > 0,05). Une tendance à l'augmentation de la viabilité des cellules HGGX42 peut être observée dans le CM-Z310 CSG par rapport au milieu CSG, bien que cet effet ne soit pas significatif.

Le CM-Z310 CSG ne semble donc pas apporter d'effet protecteur au ONC201 pour aucune des lignées cellulaires.

5. Influence du CM-Z310 sur la migration/invasion des cellules tumorales :

Un autre problème des GpHG est leur capacité à migrer et leur phénotype invasif puisqu'ils sont capables de migrer vers la ZSV.⁴⁷⁻⁵⁰ Dans le but de connaître l'impact du CM-Z310 sur les capacités invasives des cellules tumorales, une chambre de Boyden a été réalisée. Ces expériences ont été menées uniquement sur les 2 lignées les plus sensibles au CM-Z310, à savoir les cellules DIPGX37 et GBM2-002. Tout d'abord, comme expliqué dans la partie matériel et méthode, une mise au point de l'expérience a dû être réalisée afin de connaître le temps et le coating nécessaires à l'invasion des cellules. A l'issue de ces tests, nous avons conclu que le temps optimal pour la migration des cellules était de 72h, les inserts coatés avec du collagène de type I 1%.

5.1. Analyse de la migration/invasion des cellules tumorales en réponse au CM-Z310 :

Tout d'abord, nous avons analysé la capacité du CM-Z310 NPC à attirer ou non les cellules tumorales. Pour ce faire nous avons différentes conditions. La condition « NPC-NPC » sert de contrôle négatif et la condition « NPC-NPS + FBS » sert de contrôle positif. Les images capturées par microscopie optique permettent d'observer un effet attractif du CM-Z310 NPC pour les cellules tumorales des 2 lignées cellulaires testées, à savoir les cellules DIPGX37 et GBM2-002 (**Figure 19A**). Cela a pu être confirmé par la quantification en pixel au carré (px^2) de l'aire en violet qui correspond aux cellules ayant migré au travers des pores contenus dans les inserts. En effet, le CM-Z310 augmente significativement la migration/invasion des cellules DIPGX37 (p-valeur = 0,0003) (**Figure 19B**) et des cellules GBM2-002 (p-valeur = 0,0482) (**Figure 19C**) comparé au contrôle négatif.

5.2. Analyse de la migration/invasion des cellules tumorales induites par le CM-Z310 :

Nous avons ensuite étudié la capacité du CM-Z310 NPC à induire un phénotype migratoire/invasif dans les cellules tumorales (en inversant le gradient de CM-Z310 dans la chambre de Boyden). Nous pouvons remarquer que les 2 lignées cellulaires ne réagissent pas de manière identique. En effet, les cellules DIPGX37 semblent adopter un phénotype plus invasif lorsqu'elles sont plongées dans du CM-Z310 NPC (p-valeur = 0,0037), comparé au NPC. Cet effet semble diminuer de manière significative lorsqu'on ajoute du FBS dans le NPC (p-valeur = 0,0152). Les cellules GBM2-002, en revanche, ne semblent pas acquérir de capacité invasive lorsqu'elles sont en contact avec le CM-Z310 NPC (p-valeur > 0,9999), comparé au NPC. Cependant, l'ajout de FBS dans le NPC augmente significativement ces capacités (p-valeur = 0,0417) (**Figure 19B et 19C**).

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que le CM-Z310 NPC exerce un effet attractif sur les 2 lignées cellulaires. Cependant, l'induction d'un phénotype invasif par le CM-Z310 NPC apparaît uniquement dans les cellules DIPGX37.

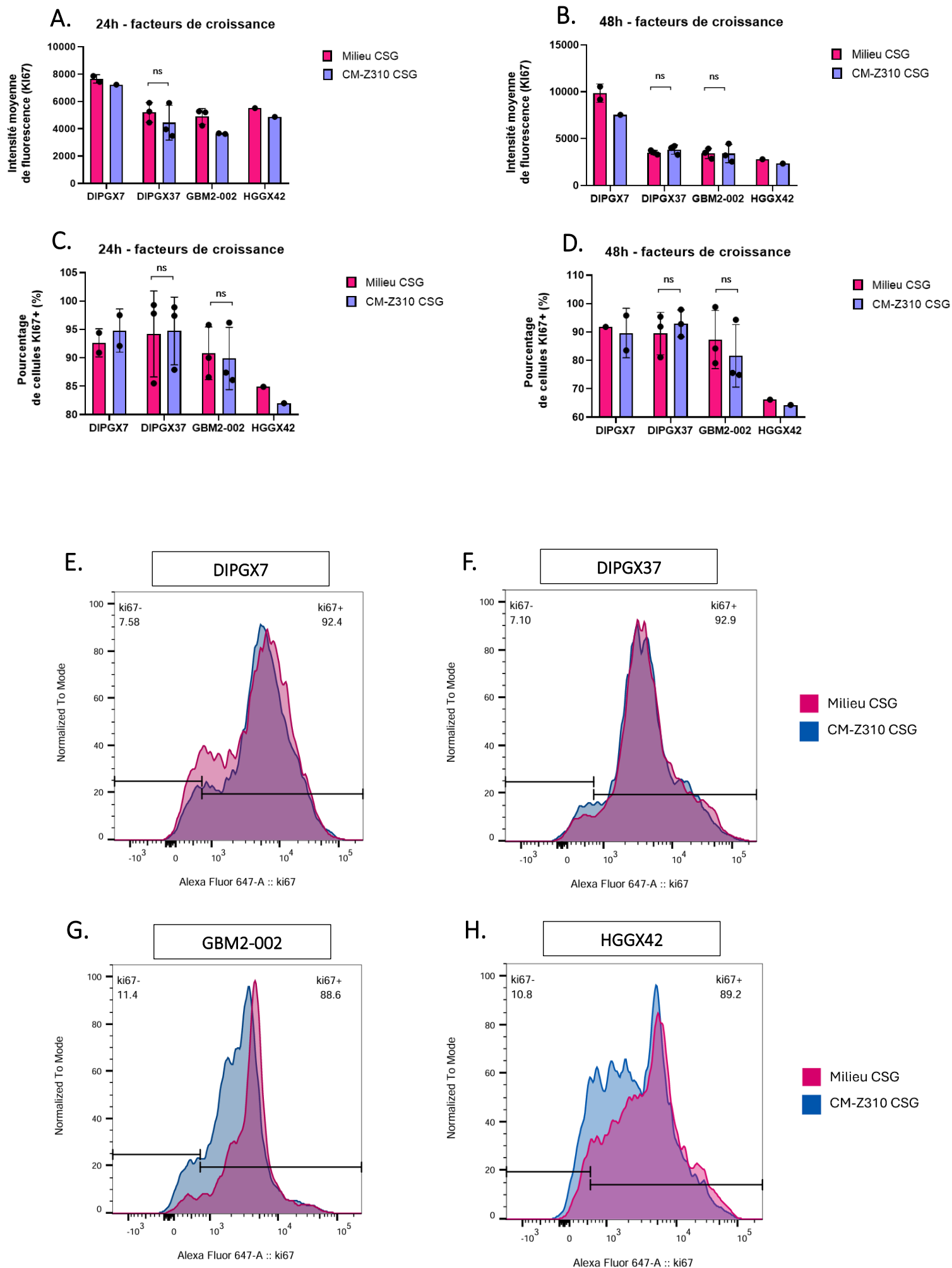
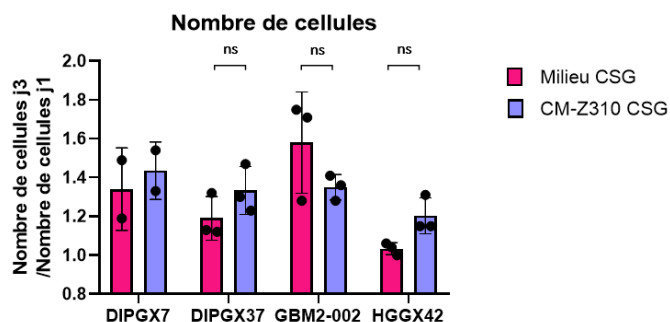


Figure 16 : Analyse de la prolifération par cytométrie en flux. Graphiques réalisés à partir de l'analyse de l'expression de Ki67 après avoir cultivé 300 000 cellules dans le CM-Z310 CSG versus milieu CSG, sans facteur de croissance. Intensité moyenne de fluorescence (IMF) (A) à 24h (DIPGX37 : p-valeur = 0,4311) et (B) à 48h (DIPGX37 : p-valeur = 0,3937 ; GBM2-002 : p-valeur = 0,9846). Pourcentage de cellules Ki67 positives (C) à 24h (DIPGX37 : p-valeur = 0,9285 ; GBM2-002 : p-valeur = 0,8394) et (D) à 48h (DIPGX37 : p-valeur = 0,5296 ; GBM2-002 : p-valeur = 0,5454) (p-valeur > 0,05 = non significatif (ns)) (E-H) Illustration du pourcentage de cellules Ki67 positives pour chaque lignée dans le milieu CSG versus CM-Z310 CSG, sans facteur de croissance à 24h (E) DIPGX7, (F) DIPGX37, (G) GBM2-002 et (H) HGGX42. Analyses statistiques réalisées à l'aide d'un test t de Welch non apparié pour l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) et pour le pourcentage de cellules Ki67+ (%Ki67+) sauf pour la lignée GBM2-002 à 48h, un test t de Student a été réalisé.

A.



B.

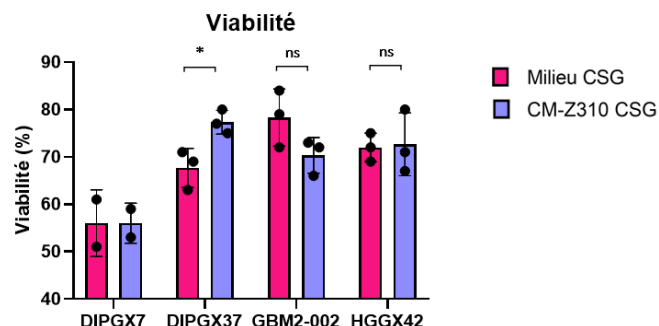


Figure 17 : Analyse de la prolifération par comptage au bleu de trypan. 100 000 cellules ont été ensemencées au jour 1 (A) Ratio du nombre de cellules au jour 3 divisé par le nombre de cellules au jour 1 (DIPGX37 : p-valeur = 0,7352 ; GBM2-002 : p-valeur = 0,2629 ; HGGX42 : p-valeur = 0,0738) (B) Viabilité analysée au bleu de trypan après 72h de culture dans chaque milieu (DIPGX37 : p-valeur = 0,0357 ; GBM2-002 : p-valeur = 0,1367 ; HGGX42 : p-valeur = 0,8851) (* p-valeur < 0,05). Analyses statistiques réalisées à l'aide d'un test t de Welch non apparié.

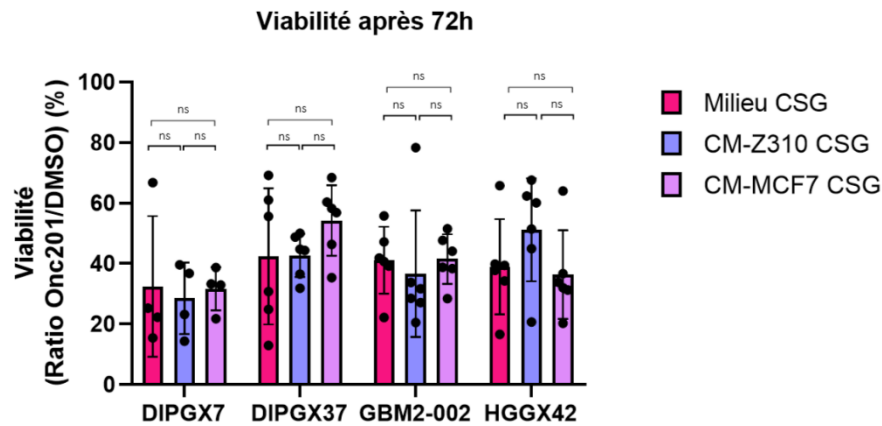


Figure 18 : Analyse de la viabilité des cellules suite au traitement au ONC201 après avoir cultivé 15 000 cellules dans les 3 milieux (Milieu CSG, CM-Z310 CSG, CM-MCF7 CSG) en présence de ONC201, pour les 4 lignées cellulaires durant 72h (p-valeurs > 0,05) comparé au DMSO qui sert de contrôle. Analyses statistiques réalisées à l'aide d'un test one-way ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey sauf pour la lignée GBM2-002, un test de Kruskal-Wallis a été réalisé suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn.

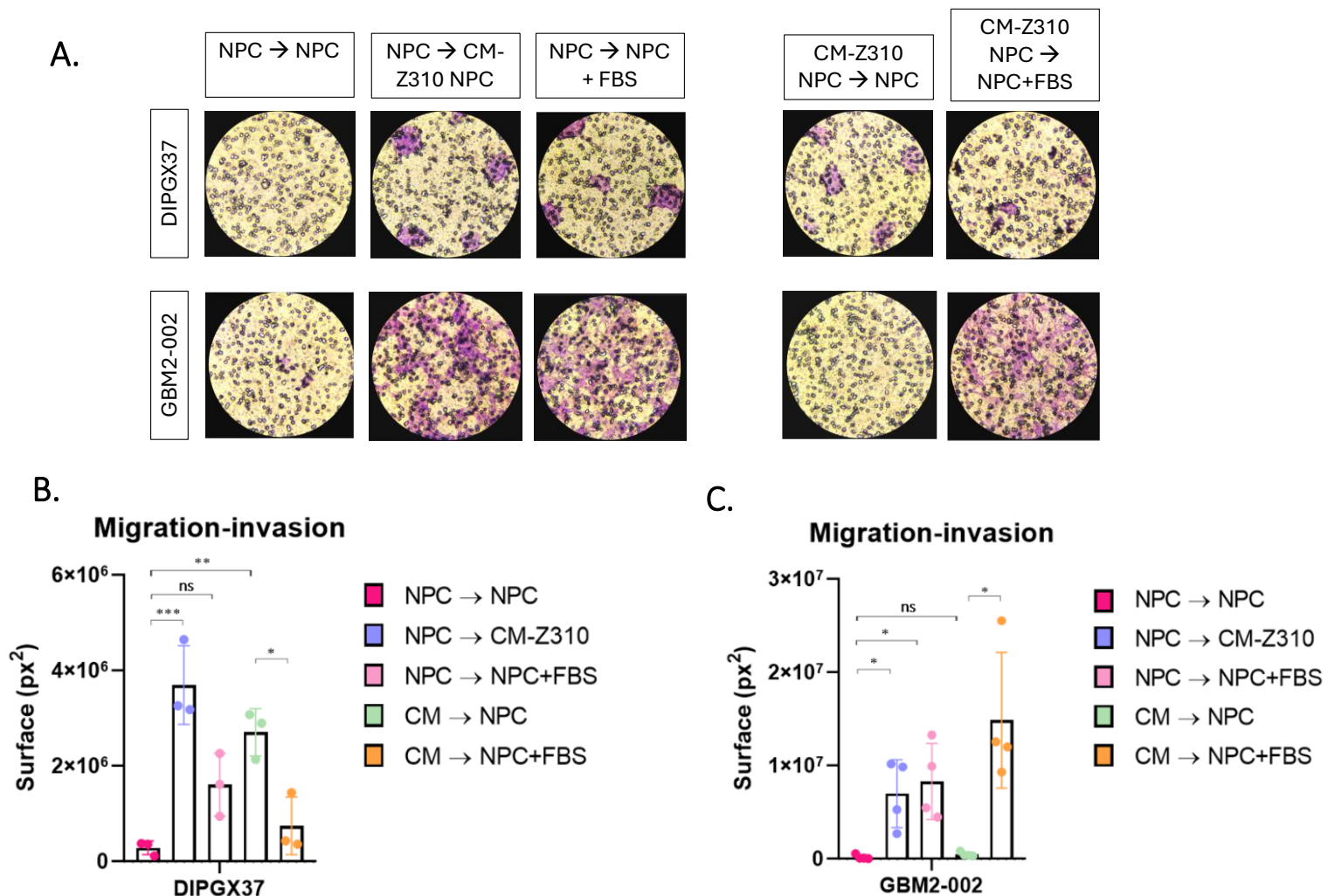


Figure 19 : Analyse des tests de migration/invasion. (A) Images représentatives des différentes conditions expérimentales. (B) Graphiques représentant l'aire (px²) correspondant aux cellules ayant migré pour la lignée DIPGX37 dans les différentes conditions. (C) Graphiques représentant l'aire (px²) correspondant aux cellules ayant migré pour la lignée GBM2-002 dans les différentes conditions (*p-valeur < 0,05, **p-valeur < 0,01, ***p-valeur < 0,001). Analyses statistiques réalisées à l'aide d'un test one-way ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey.

6. Influence du CM-Z310 sur le destin cellulaire des cellules tumorales :

La récurrence est un phénomène très fréquent dans les GpHG ainsi que dans les GBMs, notamment en raison de l'hétérogénéité et de la plasticité des cellules tumorales.³⁹⁻⁴¹ Pour évaluer si le CM-Z310 favorise cette plasticité, une analyse de l'expression de certaines protéines a été réalisée par Western Blot. Les cellules ont été cultivées pendant 24 heures dans les 3 milieux (Milieu CSG, CM-Z310 CSG, CM-MCF7 CSG) avant d'être récoltées pour étudier leur expression protéique.

Tout d'abord, pour déterminer si le CM-Z310 favorise l'état souche des cellules tumorales, l'effet du CM-Z310 CSG sur l'expression de certains marqueurs de cellules souches, Nestine et SOX2, a été étudié. Les résultats de l'analyse par Western Blot ont révélé que l'expression de ces marqueurs ne semble pas être influencée par le CM-Z310, à l'exception d'une légère diminution de l'expression de Nestine dans les cellules DIPGX7, DIPGX37 et GBM2-002, dans la condition CM-Z310 CSG. (**Figure 20A**).

Par la suite, nous avons analysé l'impact de ce milieu conditionné sur l'expression de la β -tubuline, un marqueur neuronal, pour évaluer son potentiel à promouvoir la différenciation neuronale. Les résultats ont révélé une stabilité de l'expression de cette protéine indépendamment du milieu, à l'exception d'une légère tendance à l'augmentation observée dans le CM-Z310 CSG pour les cellules DIPGX7. (**Figure 20B**)

Ayant observé un effet d'adhérence et de prolongement des cellules tumorales induit par le CM-Z310 (voir point 2.), nous avons voulu déterminer la nature exacte de cet effet. Pour ce faire, nous avons étudié l'expression d'une protéine d'adhérence cellulaire, la E-cadhérine, dans les cellules selon les différents milieux. Nous avons constaté qu'il ne semblait pas y avoir de variation de l'expression de cette protéine en fonction du milieu (**Figure 20C**). Nous avons également analysé 2 autres protéines, la connexine-43 et la F-actine, fréquemment exprimées dans les cellules tumorales au niveau des microtubules, qui sont des prolongements cellulaires permettant la communication directe entre cellules, favorisant le développement tumoral.⁸⁶ Il semble que le CM-Z310 n'augmente pas l'expression de ces 2 protéines (**Figure 20D**).

Pour valider le phénotype migratoire et invasif observé au point 5 des résultats, nous avons étudié l'expression de 2 protéines associées à la migration et à l'invasion. Tout d'abord, nous avons analysé l'expression de la vimentine, une protéine de type filaments intermédiaires faisant partie du cytosquelette, associée au phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) dans les

cancers.⁸⁷ Nos observations indiquent une tendance à l'augmentation de l'expression de cette protéine dans les 4 lignées cellulaires traitées avec le CM-Z310. Ensuite, nous avons analysé l'expression de ZEB1, un facteur de transcription associé à la migration cellulaire et jouant un rôle clé dans la régulation de la TEM. L'expression de ZEB1 semble suivre la même tendance que celle de la vimentine (**Figure 20E**).

Les résultats sont normalisés par rapport à la condition contrôle (Milieu CSG).

Ces résultats suggèrent donc que le CM-Z310 CSG n'a pas d'effet notable sur l'expression de la plupart des marqueurs étudiés, mais semble avoir un léger impact sur l'expression des marqueurs associés à la migration et à l'invasion des cellules tumorales. Ils doivent cependant être interprétés avec prudence en raison des problèmes de reproductibilité rencontrés lors de la répétition de l'expérience.

7. Influence du liquide céphalo-rachidien sur la morphologie des cellules tumorales :

Nous avons ensuite testé l'effet du LCR provenant d'une jeune fille de 19 ans sur la morphologie des cellules tumorales. En raison de la petite quantité de LCR disponible, nous avons uniquement testé la lignée cellulaire la plus réactive au CM-Z310, à savoir les cellules GBM2-002. Nous avonsensemencé 15 000 cellules dans des plaques 96 puits et les avons cultivées pendant 24 heures dans les différents milieux. Des images ont été capturées à 3 moments (3h, 6h et 24h) dans 4 conditions (NPC, CM-Z310 NPC, LCR, CM-MCF7 NPC). Nous avons observé que les cellules réagissaient de manière similaire au LCR et au CM-Z310, en adhérant, en émettant des prolongements jusqu'à s'interconnecter entre elles. Ces prolongements semblaient plus longs dans le LCR que dans le CM-Z310, dès les 3 premières heures de culture, et cet effet augmentait avec le temps. Aucun effet similaire n'a été observé dans les conditions de contrôle NPC et CM-MCF7 NPC. (**Figure 21**)

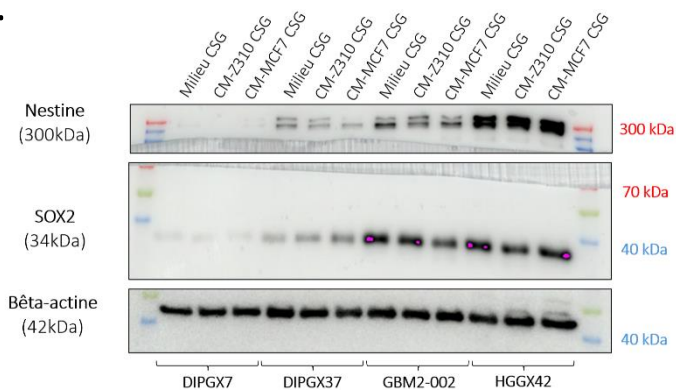
8. Influence du liquide céphalo-rachidien sur l'expression de Ki67 et de vimentine dans les cellules tumorales :

Finalement, pour analyser plus précisément l'effet du LCR sur la morphologie des cellules tumorales et évaluer son impact potentiel sur leur capacité de prolifération, l'expression de la vimentine et de la protéine Ki67 a été examinée par immunofluorescence. Pour ce faire, 10 000 cellules ont étéensemencées dans 2 conditions (NPC versus LCR) et cultivées pendant 24 heures, avant d'être fixées pour les immunofluorescences. Les résultats montrent que les cellules immergées dans le LCR présentent une morphologie modifiée, avec un cytosquelette allongé, comparé à la condition

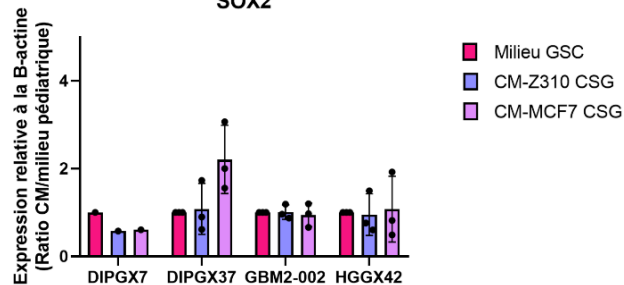
contrôle (NPC), pour les 4 lignées cellulaires (**Figure 22A-D**). Cet effet est particulièrement marqué dans les lignées cellulaires DIPGX37 (**Figure 22B**) et GBM2-002 (**Figure 22C**). Ceci confirme les observations décrites au point 7. Concernant l'expression du marqueur de prolifération Ki67, il paraît moins exprimé dans le LCR, comparé à la condition NPC, suggérant que les cellules sont moins proliférantes dans le LCR.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus aux points 7 et 8 suggèrent que le LCR modifie la morphologie des cellules, entraînant des prolongements plus longs que dans le CM-Z310 et un cytosquelette plus allongé. Il semble également favoriser l'état de quiescence des cellules, comme l'indique la diminution de l'expression de la protéine Ki67 dans le LCR comparé au NPC.

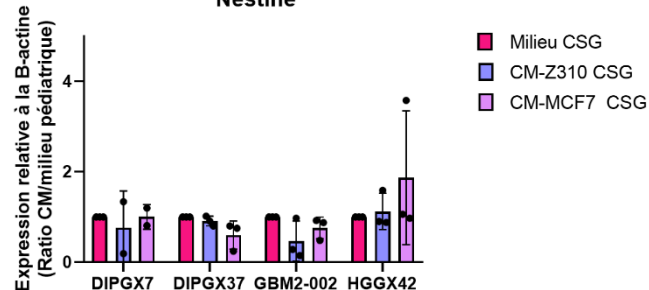
A.



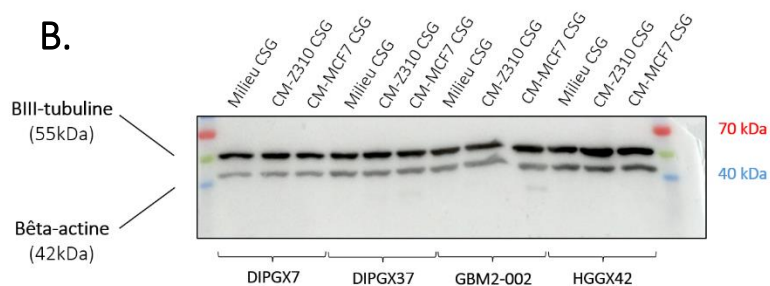
SOX2



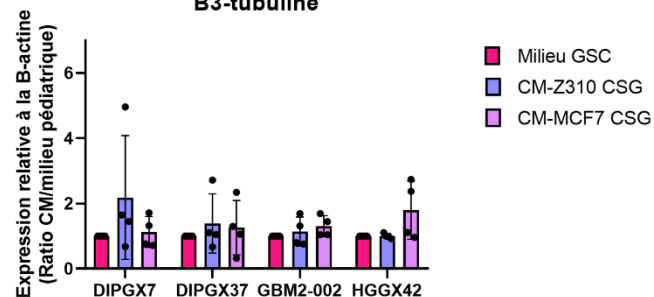
Nestine



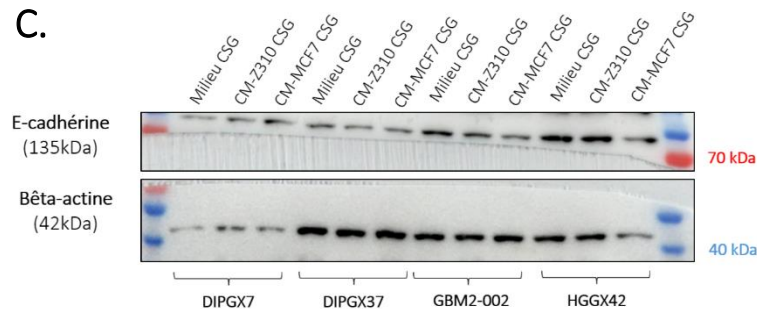
B.



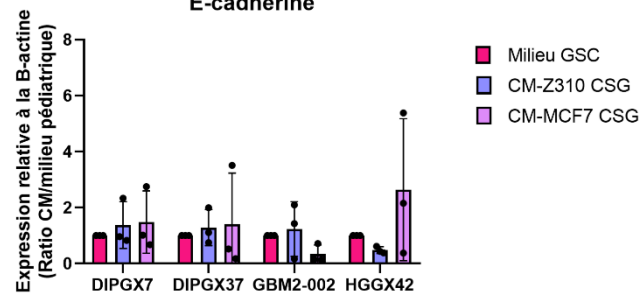
B3-tubuline



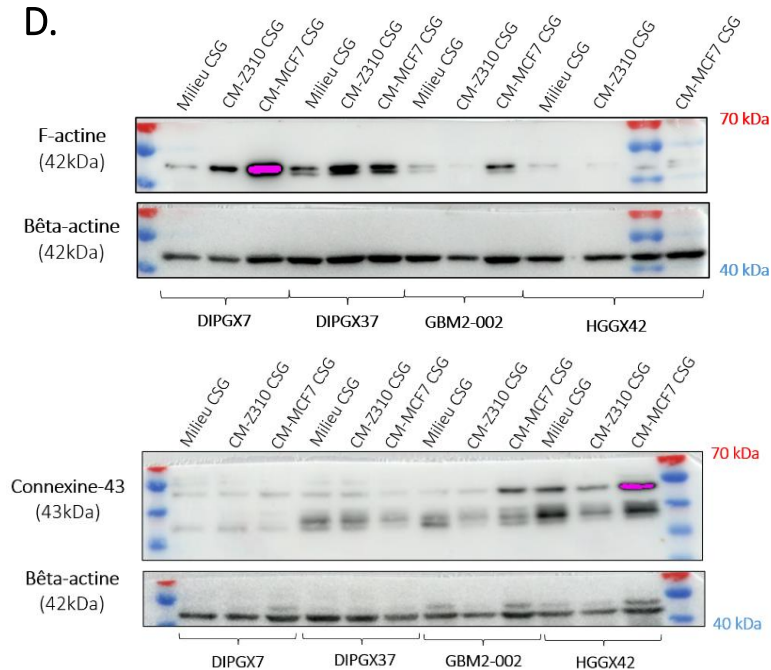
C.



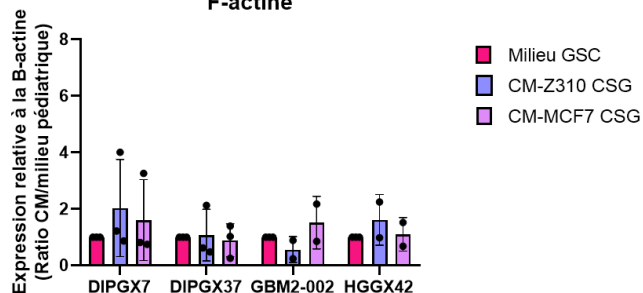
E-cadherine



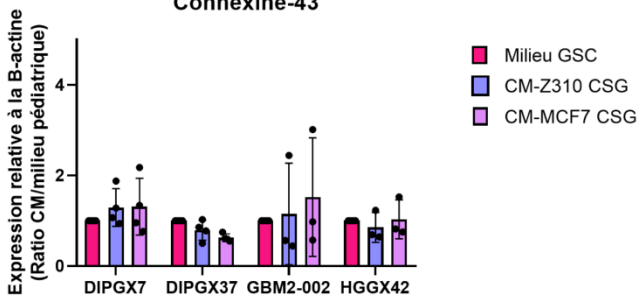
D.



F-actine



Connexine-43



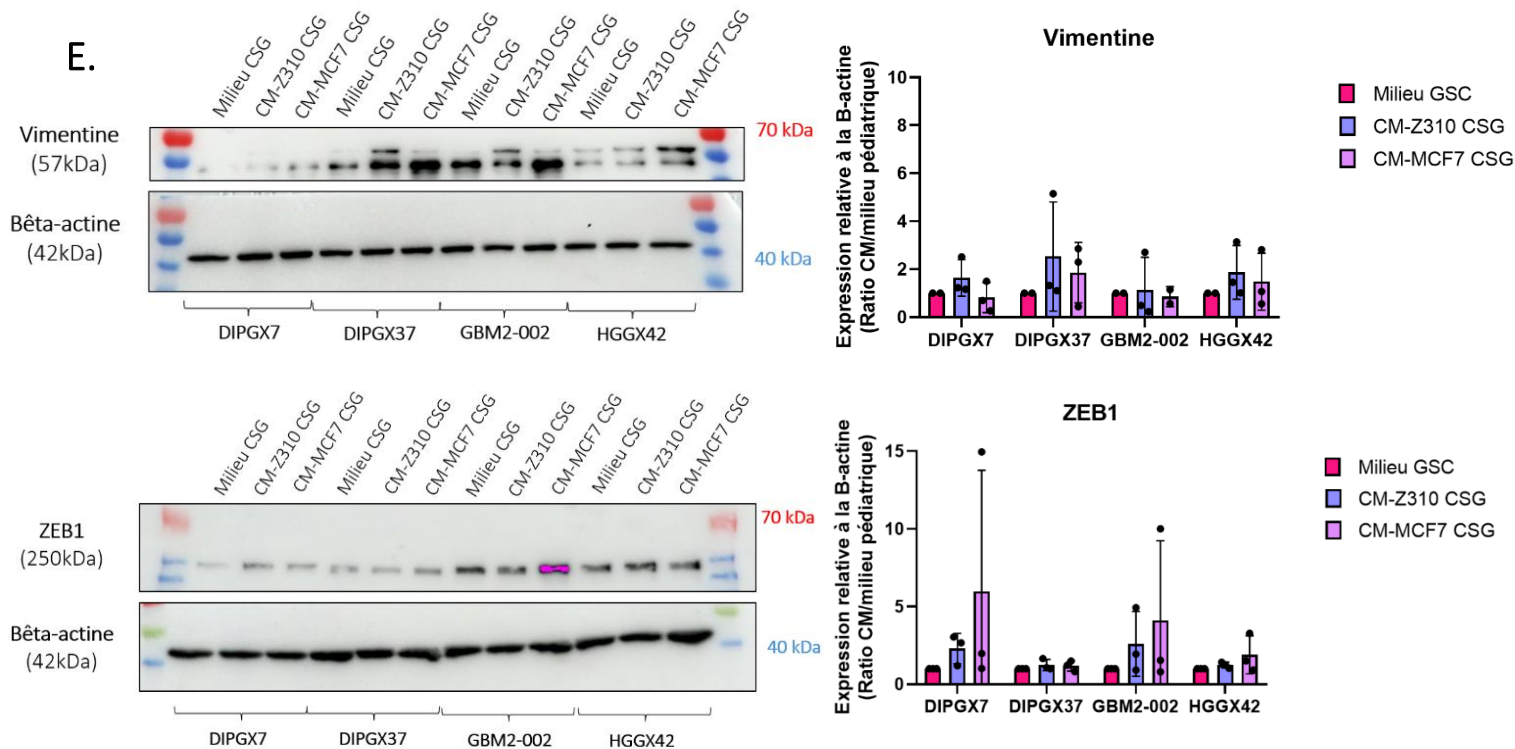


Figure 20 : Western Blots effectués sur les 4 lignées cellulaires après culture durant 24h dans les 3 conditions (Milieu CSG, CM-Z310 CSG, CM-MCF7 CSG). (A) Marqueurs liés à l'état souche. (B) Marqueur lié à l'état différencié neuronal. (C) Marqueur lié à l'adhérence cellulaire. (D) Marqueurs associés aux microtubes. (E) Marqueurs associés à la migration/invasion. Les résultats sont normalisés par rapport à la condition contrôle (milieu CSG).

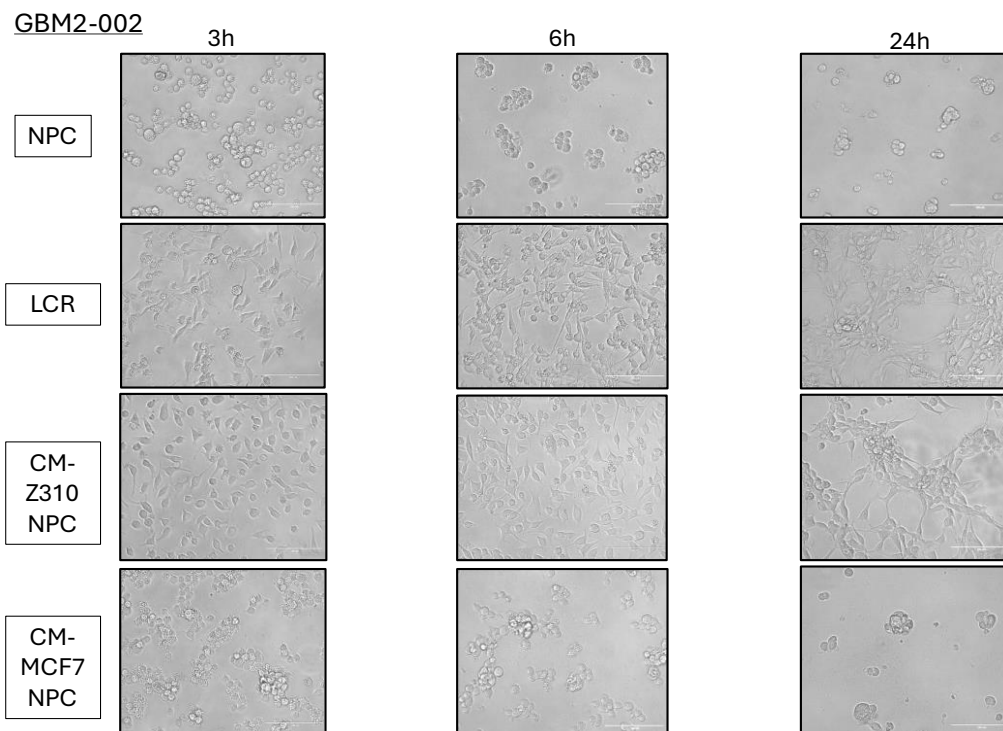
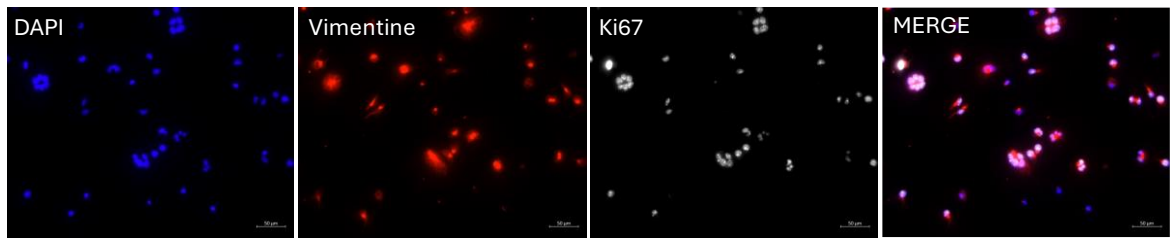


Figure 21 : images capturées par microscopie optique en grossissement 20X après mise en culture de 15 000 cellules par puits dans les différentes conditions (NPC, LCR, CM-Z310 NPC, CM-MCF7 NPC). Images représentatives du changement de la morphologie dans le LCR comparé au NPC, au CM-Z310 et au CM-MCF7 à 3h, 6h et 24h des cellules de la lignée GBM2-002.

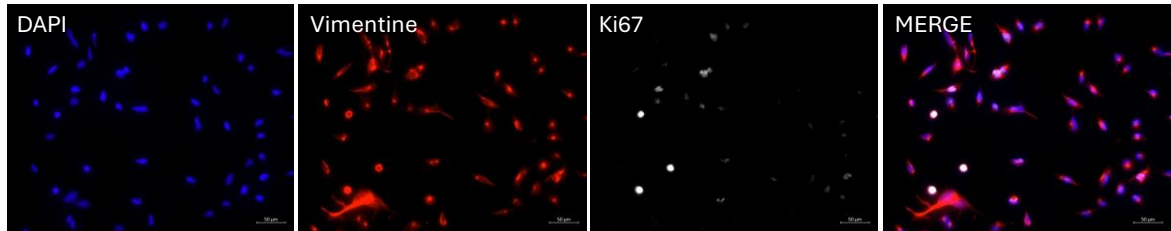
A. DIPGX7

24h

NPC



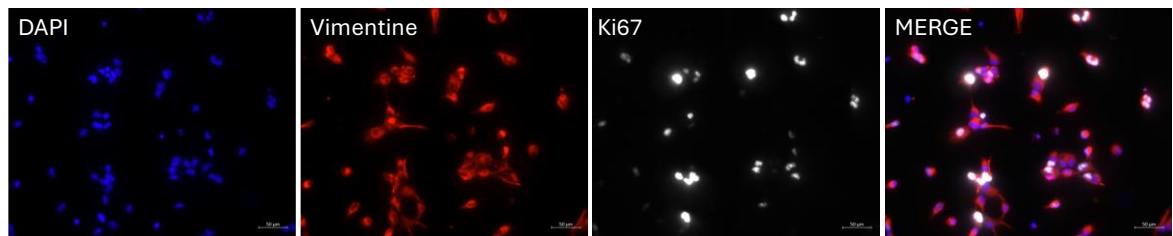
LCR



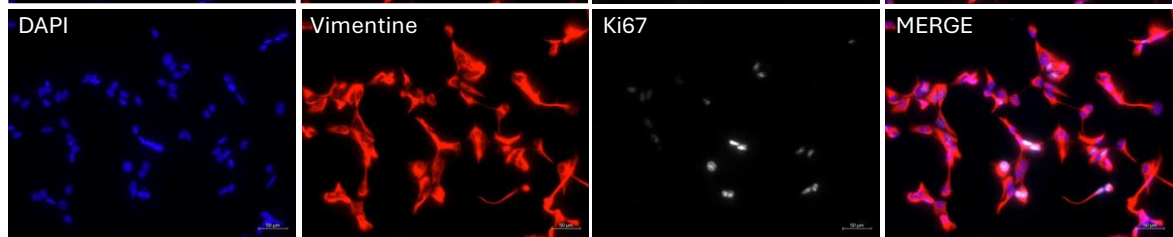
B. DIPGX37

24h

NPC



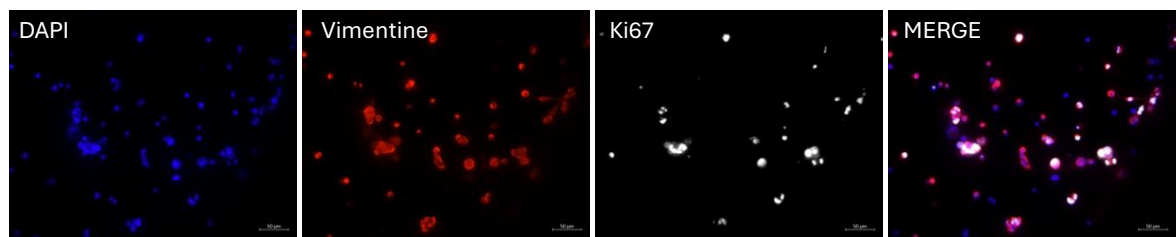
LCR



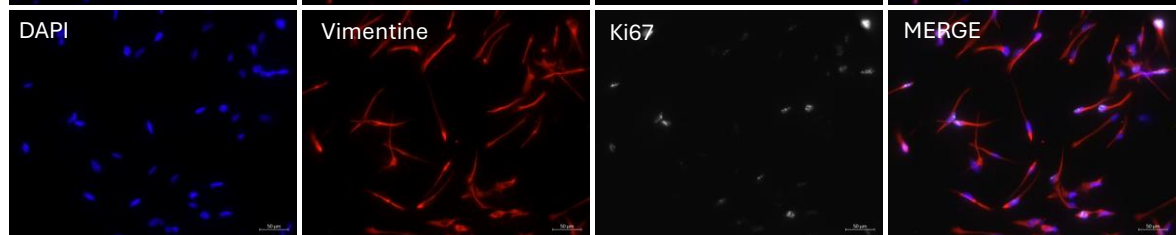
C. GBM2-002

24h

NPC



LCR



D. HGGX42

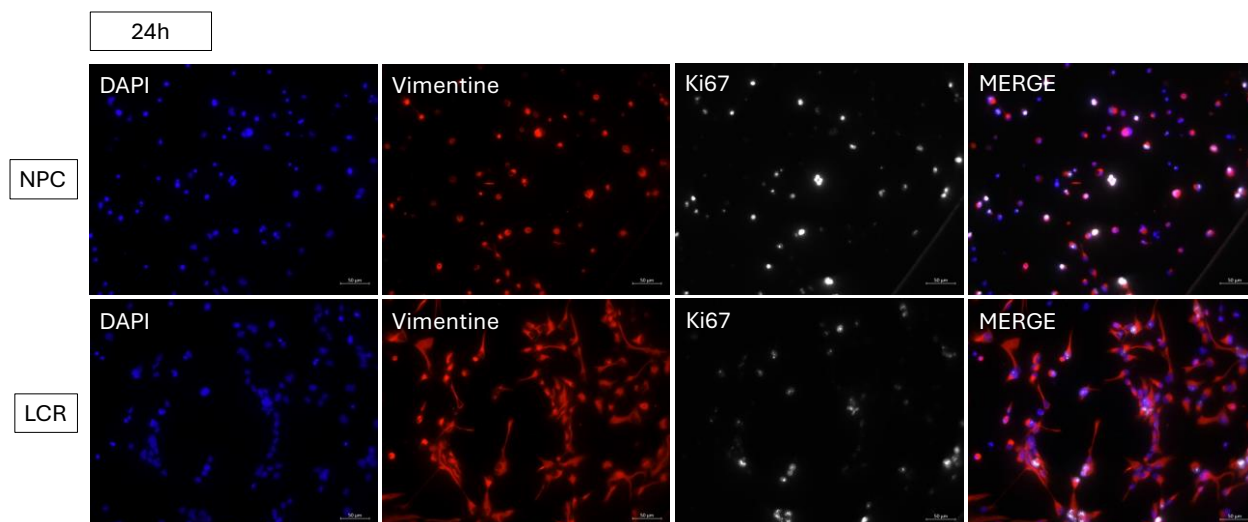


Figure 22 : Images d'immunofluorescences représentant l'expression de la vimentine, protéine du cytosquelette et du marqueur de prolifération Ki67 dans les cellules (A) DIPGX7, (B) DIPGX37, (C) GBM2-002, (D) HGGX42, après mise en culture de 10 000 cellules durant 24h dans le LCR versus NPC. Barre d'échelle 50µm.

5. DISCUSSION

Discussion :

L'objectif principal de ce mémoire était d'étudier l'impact que peut exercer le liquide céphalo-rachdien (LCR) sur le phénotype des cellules de gliome pédiatrique de haut grade (GpHG), ceci dans la perspective générale de mieux comprendre l'influence de l'environnement périventriculaire sur les cellules de GpHG qui se logent dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) et semblent contribuer à l'agressivité tumorale. Pour ce faire, nous avons utilisé un milieu conditionné à partir de cellules épithéliales de plexus choroïdes, les cellules Z310 (CM-Z310).

Tout d'abord, l'effet du CM-Z310 sur la **morphologie** des cellules tumorales a été étudié. Nous avons pu constater que les cellules étaient plus allongées et émettaient des prolongements dans le CM-Z310, comparé au milieu contrôle. Cela pourrait signifier un impact sur la plasticité des cellules, passant d'un état cellulaire à un autre. En effet, comme mentionné précédemment, les cellules de GpHG possèdent des capacités plastiques, ce qui contribue à leur résistance au traitement et aux phénomènes de récidives.³⁹⁻⁴¹ C'est pourquoi nous avons ensuite réalisé des Western Blots, afin de comprendre ce changement de morphologie. Ces résultats sont en accord avec l'article de Ditte et al sur base duquel reposait notre protocole de préparation de milieu conditionné, qui a étudié l'influence de ce CM-Z310 sur la différenciation des cellules souches neurales (CSNs).⁸⁰ En effet, dans cette étude, ils ont constaté qu'en 24h, les CSNs formaient des réseaux cellulaires où les cellules se connectaient entre elles par de longs prolongements. Ils ont même été encore plus loin dans l'analyse puisqu'ils ont isolé les vésicules extracellulaires (VEs) contenues dans le CM-Z310 et ont démontré que l'effet du changement de morphologie provenait de l'effet de ces VEs. Il serait donc intéressant, dans le cadre de notre étude, d'étudier quels composants exacts du CM-Z310 a un impact sur nos cellules. Des résultats semblables ont été observés dans l'étude de Stringer et al analysant l'effet du LCR sur les cellules de GBMs adultes.⁷⁸ En effet, ils ont observé que du LCR provenant de patients sains modifiait la morphologie des cellules de manière similaire à ce que nous avons observé dans les cellules de GpHG. Ils ont remarqué que chez les adultes, cet effet apparaissait après 3 jours de culture dans le LCR. Ils ont également analysé la morphologie dans du LCR provenant d'un patient atteint de GBM et ont observé le même phénotype. Dans ce mémoire, le changement de morphologie des cellules tumorales a été confirmé avec du LCR provenant d'une patiente de 19 ans et nous avons pu observer que les prolongements émis par les cellules étaient plus longs dans le LCR comparé au CM-Z310 et que leur cytosquelette était plus allongé. Cependant, contrairement à l'étude de Stringer et al⁷⁸ qui décrit ce phénotype après 3 et 7 jours de traitement, cette modification de morphologie a été

observée dans les heures qui suivent la mise en culture dans le LCR. Nos analyses morphologiques étaient uniquement visuelles, il serait donc intéressant de faire des analyses plus précises de la morphologie des cellules de GpHG dans du LCR, en mesurant la taille des prolongements ou la surface occupée par les cellules, afin de pouvoir quantifier ces modifications.

Ensuite, la **prolifération** des cellules a été analysée. Nous avons pu conclure après les analyses par cytométrie en flux (marquage Ki67) et par comptage au bleu de trypan, que le CM-Z310 ne semble pas avoir d'effet sur la prolifération des cellules de GpHG. Ceci n'est pas en accord avec les expériences menées dans le cadre du GBM adulte. En effet, dans l'étude de Stringer et al, il a été démontré que les cellules de GBM se trouvent dans un état de quiescence quand elles sont immergées dans du LCR adulte.⁷⁸ Toutefois, ces résultats concordent avec l'étude de Ditte et ses collègues qui ont montré que le CM-Z310 n'a pas d'influence sur la prolifération des CSNs.⁸⁰

Cependant, les analyses par cytométrie en flux ne donnent pas d'information concernant le nombre de cellules mais sur la quantité de protéine Ki67 exprimée (intensité moyenne de fluorescence) et sur le pourcentage de cellules exprimant cette protéine. De plus, lors des comptages cellulaires, seulement 100 000 cellules par puits ont étéensemencées, dans des plaques 24 puits. Les cellules se situant dans le CM-Z310 étant adhérentes, une quantité non négligeable de cellules a probablement été perdue lors des étapes de récolte de cellules et de centrifugation. Il aurait été intéressant de réaliser les mêmes expériences avec un plus grand nombre de cellules dans un plus grand volume.

Nous avons également analysé l'expression de Ki67 des cellules de GpHG par immunofluorescence dans du LCR comparé au NPC. Bien que ces expériences n'aient pas été quantifiées, il semble que le LCR diminue l'expression de Ki67 dans les cellules de GpHG. Ceci est également cohérent avec les résultats obtenus chez l'adulte⁷⁸. Cependant, l'effet du LCR est âge-dépendant⁶⁴ et augmente la prolifération, l'auto-renouvellement et la migration des CSNs^{62,63}, et la neurogenèse est plus active chez les enfants, et diminue avec l'âge⁸¹. En effet, le développement du cerveau se déroule en période prénatale mais se poursuit jusqu'à environ 20 ans⁸¹, il est donc tout à fait normal d'avoir une activité cellulaire différente chez les enfants comparé aux adultes. Il aurait donc pu être cohérent d'observer une augmentation de l'expression de la protéine Ki67 par les cellules de GpHG dans du LCR provenant d'enfant.

Nous avons par la suite analysé l'effet du CM-Z310 sur la **réponse à l'ONC201**, un agent anti-cancéreux en cours d'essai clinique dans différents cancers. Nous avons pu observer que le CM-Z310 n'influait pas la réponse au traitement des cellules de GpHG. Cependant, les résultats sont à interpréter de manière prudente au vu des problèmes de reproductibilité rencontrés lors de l'expérience. Si on considère que le CM-Z310 n'influence pas la réponse au traitement au ONC201, cela semble cohérent par rapport aux résultats obtenus sur la prolifération. En effet, aucun effet du CM-Z310 sur la prolifération des cellules de GpHG n'a été observé, les cellules les plus sensibles à la chimiothérapie étant celles qui prolifèrent activement, tandis que celles qui sont les plus résistantes étant celles qui prolifèrent moins et se trouvent dans un état de quiescence.⁸² Ces résultats ne concordent pas avec ceux obtenus dans le GBM adulte, ceux-ci ayant montré une augmentation de la résistance à la chimiothérapie par le TMZ dans du LCR.⁷⁸ Cela peut s'expliquer par le fait que le CM-Z310, un modèle conçu pour imiter le LCR est dérivé de cellules épithéliales de rats.⁸⁹ Par conséquent, ce milieu ne reproduit pas parfaitement le LCR. De plus, comme mentionné précédemment, les GpHG sont moléculairement distincts par rapport au GBM adulte³, il est donc logique qu'ils diffèrent au niveau de leur comportement, notamment en terme de résistance au traitement.

La **migration et l'invasion** sont deux caractéristiques importantes des GpHG puisque ceux-ci sont capables de migrer vers la ZSV et de l'envahir.⁴⁷⁻⁵⁰ Les résultats obtenus ont démontré que le CM-Z310 exerçait un effet attractif sur les cellules de GpHG. Dans le même ordre d'idée, l'étude de Stringer et ses collègues a mis en évidence par séquençage unicellulaire de l'ARN que le LCR modifiait le phénotype des cellules de GBM adultes vers un profil mésenchymateux.⁷⁸ Or, nous savons que plusieurs états cellulaires existent dans les GpHG et que l'état mésenchymateux confère aux cellules tumorales des capacités d'invasion et de résistance au traitement accrues.³⁹⁻⁴⁰ Cet état mésenchymateux n'a pas été vérifié dans le cadre de ce travail puisqu'uniquement les phénotypes migratoire et invasif ont été étudiés. Il serait donc intéressant d'étudier si le CM-Z310 favorise cet état mésenchymateux. Un point intéressant à relever est que les cellules DIPGX37 et GBM2-002 sont toutes les 2 attirées par le CM-Z310. Cependant, lorsque les cellules sont immergées dans du CM-Z310, celui-ci ne semble induire un phénotype invasif que dans les cellules DIPGX37, suggérant que des lignées possédant des mutations différentes (H3 K27 pour les DIPGX37 et H3 G34 pour les GBM2-002) réagissent différemment à ce milieu. Cela pourrait en partie expliquer le pronostic moins favorable des cellules mutées H3 K27. Des analyses supplémentaires sur d'autres lignées cellulaires portant les mêmes mutations seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Ces résultats confirment une fois de plus l'hétérogénéité des GpHG.

L'effet du CM-Z310 sur le **destin cellulaire** a été analysé par Western Blot via l'étude de l'expression de différentes protéines. Pour toutes les protéines étudiées, des problèmes de reproductibilité ont malheureusement été rencontrés. Ces résultats sont donc difficilement interprétables. Tout d'abord, après avoir observé lors de l'étude de la morphologie au microscope optique, une adhérence et des prolongements de cellules formant un réseau dans le CM-Z310, nous avons analysé l'expression de la E-cadhérine dans les différentes conditions. Aucun effet du CM-Z310 sur l'expression de cette protéine n'a été mis en évidence. Cette protéine épithéliale permettant l'adhésion intercellulaire⁸³, nous nous attendions à une augmentation de l'expression de celle-ci dans la condition CM-Z310 au vu du phénotype observé. Cependant, une étude a montré que la protéine BMP4 inhibait l'invasion de cellules de GBM en activant l'expression d'E-cadhérine et de claudine.⁸⁴ Cette protéine ne serait donc pas impliquée dans le phénotype migratoire et invasif. Or, dans notre étude, le CM-Z310 induisait des propriétés invasives dans les cellules de GpHG. Il est difficile de déterminer via quelle(s) protéine(s) les cellules interagissent entre elles. Néanmoins, il aurait été intéressant d'étudier l'expression d'intégrines, ces protéines permettant l'adhésion avec la matrice extracellulaire et étant fortement impliquées dans la progression cancéreuse.⁸⁵

Nous avons observé que les cellules créaient des connexions entre elles, c'est pourquoi les marqueurs associés aux microtubes ont été analysés. Les microtubes sont des prolongements cellulaires permettant la communication directe entre cellules et favorisant le développement tumoral.⁸⁶ Nous n'avons pas pu détecter de différence au niveau de l'expression de la F-actine et de la connexine 43 se situant respectivement au niveau du cytosquelette et des jonctions communicantes. Le phénotype d'adhérence et de prolongements cellulaires est donc difficilement analysable par Western Blot. D'autres techniques seraient plus appropriées, par exemple l'immunofluorescence permettrait de localiser et quantifier certaines protéines spécifiques à l'adhérence cellulaire.

Le phénotype « migration et invasion » ayant été observé via la chambre de Boyden, nous nous attendions à une augmentation de ZEB 1, un facteur de transcription associé à la migration, et de la vimentine dans la condition CM-Z310. ZEB 1 est un facteur de transcription impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cadre des cancers qui est capable de diminuer l'expression d'E-cadhérine et d'augmenter l'expression de vimentine durant la TEM.⁸⁷ Il est à nouveau difficile de tirer des conclusions claires de ces résultats, cependant, une tendance à l'augmentation de ces 2 protéines peut être observée. Une technique alternative et plus précise serait d'utiliser le séquençage unicellulaire de l'ARN, comme l'ont fait Stringer et ses collègues⁷⁸, afin d'établir un score mésenchymateux des cellules suite au traitement des cellules par le CM-Z310.

Il est essentiel de noter que le CM-Z310, un milieu conditionné par des cellules épithéliales de plexus choroïdes de rat, demeure un modèle et ne reflète pas entièrement la réalité. L'objectif est de reproduire l'effet du LCR de la manière la plus réaliste possible, étant donné la rareté des échantillons de LCR disponibles. **Premièrement**, lors de la préparation du CM-Z310, les cellules Z310 sont baignées dans du milieu CSG ou NPC durant 48h, laissant le temps aux cellules pour sécréter divers facteurs et molécules. Cependant, la concentration de ceux-ci n'a pas été ajustée dans le cadre de ce mémoire, comme l'ont fait Ditte et ses collègues⁸⁰, ce qui signifie que deux CM-Z310 préparés à des moments différents n'ont peut-être pas exactement la même composition. Cela pourrait expliquer les problèmes de reproductibilité de certaines expériences. Une étude a en effet prouvé que du LCR dilué 100 fois dans un milieu sans sérum adapté à la culture de CSGs augmentait la prolifération cellulaire dans 2 lignées cellulaires de GBM⁸⁸, alors que l'inverse a été démontré par Stringer et al en cultivant des cellules de GBM dans du LCR humain non dilué.⁷⁸ Ceci prouve bien que la concentration en molécules, ions, protéines et autres facteurs joue un rôle important dans la biochimie du LCR. **Deuxièmement**, contrairement au LCR dont la composition résulte de 2 facteurs : la filtration passive du plasma par les capillaires fenestrés (1) et le transport actif au travers de l'épithélium choroïdien (2)⁵⁸, le CM-Z310 résulte uniquement du sécrétome des cellules épithéliales choroïdiennes. Certains ions/molécules provenant du plasma pourraient exercer un effet sur les cellules tumorales, qui ne sera donc pas présent dans le CM-Z310. **Finalement**, les cellules Z310 sont des cellules animales provenant de rats sains⁸⁹, la physiologie n'étant pas la même que les humains atteints de GpHG. La composition du CM-Z310 est donc probablement semblable mais pas identique à celle du LCR.

Nos expériences utilisant du LCR ont été réalisées avec du LCR provenant d'une jeune fille de 19 ans. Il aurait été également pertinent de comparer l'effet du LCR provenant d'individus de différents âges sur les cellules de GpHG. En effet, il a été démontré que l'effet du sécrétome des plexus choroïdes sur les CSNs varie avec l'âge. Silva-Vargas et al ont étudié chez la souris que le sécrétome de plexus choroïdes de jeunes souris augmente l'activation des CSNs et la prolifération des astrocytes dans la ZSV, comparé à celui provenant de souris âgées⁶⁴. De plus, une étude a démontré que le nombre de CSNs diminue avec l'âge dans la ZSV de souris. Cependant, les CSNs provenant de souris âgées conservent leur capacité de prolifération et de différenciation lorsqu'elles sont retirées de leur environnement et qu'elles sont remises en culture.⁹⁰ Cela suggère un effet important de l'environnement sur les cellules se situant dans la ZSV. Un des éléments principaux constituant l'environnement du SNC et en particulier de la ZSV étant le LCR, il serait donc pertinent, dans le cadre des études sur les GpHG, de comparer du LCR d'enfants et d'adultes afin de déterminer si les effets observés dépendent

de l'âge du « donneur » de LCR. De plus, le LCR utilisé dans le cadre de nos expériences provenait d'une patiente saine n'étant pas atteinte de GpHG. Hors, la composition du LCR varie en fonction de l'état physiologique du patient. En effet, le LCR de patients atteints de gliome de haut grade contient plus de VEGF que les patients non atteints.⁷⁵ Une autre étude a révélé que le LCR de patients atteints de gliomes contient des microARNs sécrétés par les cellules tumorales qui activent les macrophages M2, c'est-à-dire pro-tumoraux.⁷⁶ Le LCR de patients atteints de GpHG a donc très probablement une composition différente, comparé aux patients sains. Il serait donc pertinent de tester l'effet du LCR provenant de patients atteints sur les cellules de GpHG.

Pour conclure, ce travail a permis de mettre en évidence l'impact du sécrétome des plexus choroïdes sur les cellules de GpHG, au vu des effets évidents observés particulièrement sur la morphologie et la migration/invasion des cellules. Ces résultats suscitent l'encouragement à poursuivre les analyses de l'effet du LCR sur les cellules de GpHG, dans la mesure où les échantillons de LCR sont accessibles. Il convient également de remarquer que le CM-Z310 pourrait être un potentiel modèle pouvant substituer le LCR dans le cadre de l'étude des GpHG, moyennant quelques ajustements au niveau de sa concentration. Il serait donc nécessaire de réoptimiser le protocole d'utilisation de ce milieu conditionné avant de continuer à l'employer dans le cadre des expériences. Cependant, bien qu'il soit éthiquement et techniquement compliqué de l'obtenir, le modèle le plus réaliste serait d'utiliser du LCR provenant d'enfants atteints de GpHG.

D'un point de vue clinique, identifier un potentiel effet pro-tumoral du LCR dans le cadre des GpHG pourrait ouvrir la voie à des thérapies visant à empêcher la plasticité des cellules tumorales induite par le LCR, dans l'espoir d'améliorer la réponse au traitement. Si des recherches futures parviennent à identifier les protéines présentes dans le LCR et/ou les cascades de signalisation activées au sein des cellules tumorales responsables de cet effet pro-tumoral, il pourrait être pertinent de développer des inhibiteurs ciblant ces protéines. Celles-ci pourraient également servir de biomarqueurs pour prédire le pronostic et dépister les patients susceptibles de moins bien répondre au traitement à qui on administrerait ces inhibiteurs.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie :

1. Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro-Oncology*. 5 oct 2021;23(Supplement_3):iii1-105.
2. Patil N, Kelly ME, Yeboa DN, Buerki RA, Cioffi G, Balaji S, et al. Epidemiology of brainstem high-grade gliomas in children and adolescents in the United States, 2000-2017. *Neuro-Oncology*. 1 juin 2021;23(6):990-8.
3. Torp SH, Solheim O, Skjulsvik AJ. The WHO 2021 Classification of Central Nervous System tumours: a practical update on what neurosurgeons need to know—a minireview. *Acta Neurochir*. 26 juill 2022;164(9):2453-64.
4. Chatwin, H. V., Cruz, J. C., & Green, A. L. (2021). Pediatric high-grade glioma: moving toward subtype-specific multimodal therapy. *The FEBS Journal*, 288(21), 6127–6141.
5. Da-Veiga MA, Rogister B, Lombard A, Neirinckx V, Piette C. Glioma Stem Cells in Pediatric High-Grade Gliomas: From Current Knowledge to Future Perspectives. *Cancers*. 4 mai 2022;14(9):2296.
6. Castel D, Philippe C, Calmon R, Le Dret L, Truffaux N, Boddaert N, et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol*. déc 2015;130(6):815-27.
7. Lewis PW, Müller MM, Koletsky MS, Cordero F, Lin S, Banaszynski LA, et al. Inhibition of PRC2 Activity by a Gain-of-Function H3 Mutation Found in Pediatric Glioblastoma. *Science*. 17 mai 2013;340(6134):857-61.
8. Bjerke L, Mackay A, Nandhabalan M, Burford A, Jury A, Popov S, et al. Histone H3.3 Mutations Drive Pediatric Glioblastoma through Upregulation of MYCN. *Cancer Discovery*. 1 mai 2013;3(5):512-9.
9. Korshunov A, Schrimpf D, Ryzhova M, Sturm D, Chavez L, Hovestadt V, et al. H3-/IDH-wild type pediatric glioblastoma is comprised of molecularly and prognostically distinct subtypes with associated oncogenic drivers. *Acta Neuropathol*. sept 2017;134(3):507-16.
10. Clarke M, Mackay A, Ismer B, Pickles JC, Tatevossian RG, Newman S, et al. Infant High-Grade Gliomas Comprise Multiple Subgroups Characterized by Novel Targetable Gene Fusions and Favorable Outcomes. *Cancer Discovery*. 1 juill 2020;10(7):942-63.

11. Mackay A, Burford A, Carvalho D, Izquierdo E, Fazal-Salom J, Taylor KR, et al. Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell*. oct 2017;32(4):520-537.e5.
12. Funakoshi Y, Hata N, Kuga D, Hatae R, Sangatsuda Y, Fujioka Y, et al. Pediatric Glioma: An Update of Diagnosis, Biology, and Treatment. *Cancers*. 12 févr 2021;13(4):758.
13. McNamara C, Mankad K, Thust S, Dixon L, Limback-Stanic C, D'Arco F, et al. 2021 WHO classification of tumours of the central nervous system: a review for the neuroradiologist. *Neuroradiology*. oct 2022;64(10):1919-50.
14. Weller M, Van Den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol*. mars 2021;18(3):170-86.
15. Stupp R, Weller M, Belanger K, Bogdahn U, Ludwin SK, Lacombe D, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*. 2005.
16. Roos WP, Batista LFZ, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CFM, et al. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene*. 11 janv 2007;26(2):186-97.
17. Warren KE. Diffuse intrinsic pontine glioma: poised for progress. *Front Oncol* [Internet]. 2012 [cité 16 juin 2024];2.
18. Braunstein S, Raleigh D, Bindra R, Mueller S, Haas-Kogan D. Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches. *J Neurooncol*. sept 2017;134(3):541-9.
19. Das A, Nobre L. Genomics in pediatric high-grade gliomas: Hope or hype: Practical implications for resource-limited settings. *Pediatric Hematology Oncology Journal*. juin 2023;8(2):90-6.
20. Guerra-Garcia P, Marshall LV, Cockle JV et al. Challenging the indiscriminate use of temozolomide in pediatric high-grade gliomas: a review of past, current, and emerging therapies. *Pediatric Blood Cancer*, 67 (2020), Article e28011
21. Abe H, Natsumeda M, Okada M et al. MGMT expression contributes to temozolomide resistance in H3K27m-mutant diffuse midline gliomas. *Front Oncol*, 9 (2019), p. 1568
22. Duchatel RJ, Mannan A, Wolde AS, Hawtrey T, Hindley PA, Douglas AM, et al. Preclinical and clinical evaluation of German-sourced ONC201 for the treatment of H3K27M-mutant diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro-Oncology Advances*. 1 janv 2021;3(1):vdab169.

23. Arrillaga-Romany I, Gardner SL, Odia Y, Aguilera D, Allen JE, Batchelor T, et al. ONC201 (Dordaviprone) in Recurrent H3 K27M-Mutant Diffuse Midline Glioma. *JCO*. 1 mai 2024;42(13):1542-52.
24. Venneti S, Kawakibi AR, Ji S, Waszak SM, Sweha SR, Mota M, et al. Clinical Efficacy of ONC201 in H3K27M-Mutant Diffuse Midline Gliomas Is Driven by Disruption of Integrated Metabolic and Epigenetic Pathways. *Cancer Discovery*. 1 nov 2023;13(11):2370-93.
25. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. déc 2019;10(1):68.
26. Temple S. The development of neural stem cells. *Nature*. nov 2001;414(6859):112-7.
27. Lapidot T, Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri M.A., Dick J.E. A Cell Initiating Human Acute Myeloid Leukaemia after Transplantation into SCID Mice. *Nature*. 1994;367:645–648.
28. Bonnet D., Dick J.E. Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as a Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell. *Nat. Med*. 1997;3:730–737.
29. O'Brien C.A., Pollett A., Gallinger S., Dick J.E. A Human Colon Cancer Cell Capable of Initiating Tumour Growth in Immunodeficient Mice. *Nature*. 2007;445:106–110.
30. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F. Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100:3983–3988.
31. Collins A.T., Berry P.A., Hyde C., Stower M.J., Maitland N.J. Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. *Cancer Res*. 2005;65:10946–10951.
32. Li C., Heidt D.G., Dalerba P., Burant C.F., Zhang L., Adsay V., Wicha M., Clarke M.F., Simeone D.M. Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Res*. 2007;67:1030–1037.
33. Ignatova T.N., Kukekov V.G., Laywell E.D., Suslov O.N., Vrionis F.D., Steindler D.A. Human Cortical Glial Tumors Contain Neural Stem-like Cells Expressing Astroglial and Neuronal Markers in vitro. *Glia*. 2002;39:193–206.
34. Osuka S, Van Meir EG. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *Journal of Clinical Investigation*. 1 févr 2017;127(2):415-26.
35. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. Déc 2006;444(7120):756-60.
36. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 9 déc 2003;100(25):15178-83.

37. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CLL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & Development*. 2015;29, 1203–1217.
38. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 20 juin 2014;344(6190):1396-401.
39. Liu I, Jiang L, Samuelsson ER, Marco Salas S, Beck A, Hack OA, et al. The landscape of tumor cell states and spatial organization in H3-K27M mutant diffuse midline glioma across age and location. *Nat Genet*. déc 2022;54(12):1881-94.
40. Ren Y, Huang Z, Zhou L, Xiao P, Song J, He P, et al. Spatial transcriptomics reveals niche-specific enrichment and vulnerabilities of radial glial stem-like cells in malignant gliomas. *Nat Commun*. 23 févr 2023;14(1):1028.
41. Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ, et al. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*. août 2019;178(4):835-849.e21.
42. Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, et al. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: A niche of neural stem cells. *J Comp Neurol*. 20 janv 2006;494(3):415-34.
43. Lombard A, Digregorio M, Delcamp C, Rogister B, Piette C, Coppieters N. The Subventricular Zone, a Hideout for Adult and Pediatric High-Grade Glioma Stem Cells. *Front Oncol*. 26 janv 2021;10:614930.
44. Kroonen, J., Nassen, J., Boulanger, Y. G., Provenzano, F., Capraro, V., Bours, V., Martin, D., Deprez, M., Robe, P., & Rogister, B. Human glioblastoma-initiating cells invade specifically the subventricular zones and olfactory bulbs of mice after striatal injection. *International Journal of Cancer*. 2011
45. Goffart, N. et al. Adult mouse subventricular zones stimulate glioblastoma stem cells specific invasion through CXCL12/CXCR4 signaling. *Neuro-Oncol*. 17, 81–94 (2015)
46. Goffart N, Lombard A, Lallemand F, Kroonen J, Nassen J, Di Valentin E, et al. CXCL12 mediates glioblastoma resistance to radiotherapy in the subventricular zone. *Neuro-Oncology*. 1 janv 2017;19(1):66-77.
47. Caretti V, Bugiani M, Freret M, Schellen P, Jansen M, Van Vuurden D, et al. Subventricular spread of diffuse intrinsic pontine glioma. *Acta Neuropathol*. oct 2014;128(4):605-7.
48. Jiao Y, Wang M, Liu X, Wang J, Shou Y, Sun H. Clinical features and prognostic significance of tumor involved with subventricular zone in pediatric glioblastoma: a 10-year experience in a single hospital. *Childs Nerv Syst*. août 2022;38(8):1469-77.

49. Mistry AM, Mummareddy N, CreveCoeur TS, Lillard JC, Vaughn BN, Gallant JN, et al. Association between supratentorial pediatric high-grade gliomas involved with the subventricular zone and decreased survival: a multi-institutional retrospective study. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*. sept 2020;26(3):288-94.
50. Qin EY, Cooper DD, Abbott KL, Lennon J, Nagaraja S, Mackay A, et al. Neural Precursor-Derived Pleiotrophin Mediates Subventricular Zone Invasion by Glioma. *Cell*. août 2017;170(5):845-859.e19.
51. Beiriger J, Habib A, Jovanovich N, Kodavali CV, Edwards L, Amankulor N, et al. The Subventricular Zone in Glioblastoma: Genesis, Maintenance, and Modeling. *Front Oncol*. 10 mars 2022;12:790976.
52. Lun, M. P., Monuki, E. S., & Lehtinen, M. K. (2015). Development and functions of the choroid plexus–cerebrospinal fluid system. *Nature Reviews Neuroscience* 2015 16:8, 16(8), 445–457.
53. Damkier HH, Brown PD, Praetorius J. Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. *Physiol Rev*. 2013;93:x1847–92
54. Sakka L, Coll G, Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*. déc 2011;128(6):309-16.
55. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease*. janv 2010;37(1):13-25.
56. Bitanhirwe BKY, Lizano P, Woo TUW. Deconstructing the functional neuroanatomy of the choroid plexus: an ontogenetic perspective for studying neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry*. sept 2022;27(9):3573-82.
57. Praetorius J, Damkier HH. Transport across the choroid plexus epithelium. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1 juin 2017;312(6):C673-86.
58. Orešković D, Klarica M. The formation of cerebrospinal fluid: Nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. *Brain Research Reviews*. sept 2010;64(2):241-62.
59. Hutton D, Fadelalla MG, Kanodia AK, Hossain-Ibrahim K. Choroid plexus and CSF: an updated review. *British Journal of Neurosurgery*. 4 mai 2022;36(3):307-15.
60. Tumani H, Huss A, Bachhuber F. The cerebrospinal fluid and barriers – anatomic and physiologic considerations. In: *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. Elsevier; 2018 [cité 15 avr 2024]. p. 21-32.
61. Hayaishi O. Molecular mechanisms of sleep–wake regulation: a role of prostaglandin D₂. *Phil Trans R Soc Lond B*. 29 févr 2000;355(1394):275-80.

62. Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, et al. New Neurons Follow the Flow of Cerebrospinal Fluid in the Adult Brain. *Science*. 3 févr 2006;311(5761):629-32.
63. Petrik D, Myoga MH, Grade S, Gerkau NJ, Pusch M, Rose CR, et al. Epithelial Sodium Channel Regulates Adult Neural Stem Cell Proliferation in a Flow-Dependent Manner. *Cell Stem Cell*. juin 2018;22(6):865-878.e8.
64. Silva-Vargas V, Maldonado-Soto AR, Mizrak D, Codega P, Doetsch F. Age-Dependent Niche Signals from the Choroid Plexus Regulate Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*. nov 2016;19(5):643-52.
65. Ziegler AN, Levison SW, Wood TL. Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis. *Nat Rev Endocrinol*. mars 2015;11(3):161-70.
66. Delgado AC, Ferrón SR, Vicente D, Porlan E, Perez-Villalba A, Trujillo CM, et al. Endothelial NT-3 Delivered by Vasculature and CSF Promotes Quiescence of Subependymal Neural Stem Cells through Nitric Oxide Induction. *Neuron*. août 2014;83(3):572-85.
67. Nguyen-Ba-Charvet KT, Picard-Riera N, Tessier-Lavigne M, Baron-Van Evercooren A, Sotelo C, Chédotal A. Multiple Roles for Slits in the Control of Cell Migration in the Rostral Migratory Stream. *J Neurosci*. 11 févr 2004;24(6):1497-506.
68. Planques A, Oliveira Moreira V, Dubreuil C, Prochiantz A, Di Nardo AA. OTX2 Signals from the Choroid Plexus to Regulate Adult Neurogenesis. *eNeuro*. mars 2019;6(2):ENEURO.0262-18.2019.
69. Arnaud K, Di Nardo AA. Choroid plexus trophic factors in the developing and adult brain. *Front Biol*. juin 2016;11(3):214-21
70. Chau KF, Springel MW, Broadbelt KG, Park H yeon, Topal S, Lun MP, et al. Progressive Differentiation and Instructive Capacities of Amniotic Fluid and Cerebrospinal Fluid Proteomes following Neural Tube Closure. *Developmental Cell*. déc 2015;35(6):789-802.
71. Balusu S, Van Wonterghem E, De Rycke R, Raemdonck K, Stremersch S, Gevaert K, et al. Identification of a novel mechanism of blood–brain communication during peripheral inflammation via choroid plexus-derived extracellular vesicles. *EMBO Mol Med*. oct 2016;8(10):1162-83.
72. Norton ES, Whaley LA, Ulloa-Navas MJ, García-Tárraga P, Meneses KM, Lara-Velazquez M, et al. Glioblastoma disrupts the ependymal wall and extracellular matrix structures of the subventricular zone. *Fluids Barriers CNS*. déc 2022;19(1):58.

73. Chaichana KL, McGirt MJ, Frazier J, Attenello F, Guerrero-Cazares H, Quinones-Hinojosa A. Relationship of glioblastoma multiforme to the lateral ventricles predicts survival following tumor resection. *J Neurooncol.* sept 2008;89(2):219-24.
74. Sanai N, Berger MS. Surgical oncology for gliomas: the state of the art. *Nat Rev Clin Oncol.* févr 2018;15(2):112-25.
75. Vera S, Sinning M, Vergara M, Lemus D, Rosas C. Cerebrospinal fluid VEGF levels and angiogenic capacity as potential prognostic markers in patients with gliomas: a pilot study. *J Neurooncol.* nov 2019;145(2):233-9.
76. Li M, Xu H, Qi Y, Pan Z, Li B, Gao Z, et al. Tumor-derived exosomes deliver the tumor suppressor miR-3591-3p to induce M2 macrophage polarization and promote glioma progression. *Onco-gene.* 7 oct 2022;41(41):4618-32.
77. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol.* 10 févr 2017;79(1):541-66.
78. Stringer BW, De Silva MI, Greenberg Z, Noreña Puerta A, Adams R, Milky B, et al. Human cerebrospinal fluid affects chemoradiotherapy sensitivities in tumor cells from patients with glioblastoma. *Sci Adv.* 27 oct 2023;9(43):eadf1332.
79. Ocasio JK, Budd KM, Roach JT, Andrews JM, Baker SJ. Oncohistones and disrupted development in pediatric-type diffuse high-grade glioma. *Cancer Metastasis Rev.* juin 2023;42(2):367-88.
80. Ditte Z, Silbern I, Ditte P, Urlaub H, Eichele G. Extracellular vesicles derived from the choroid plexus trigger the differentiation of neural stem cells. *J of Extracellular Vesicle.* nov 2022;11(11):12276.
81. Silbereis JC, Pochareddy S, Zhu Y, Li M, Sestan N. The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron.* janv 2016;89(2):248-68.
82. Zhao J. Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. *Pharmacology & Therapeutics.* avr 2016;160:145-58.
83. Dong HM, Liu G, Hou YF, Wu J, Lu JS, Luo JM, et al. Dominant-negative E-cadherin inhibits the invasiveness of inflammatory breast cancer cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol.* 7 déc 2006;133(2):83-92.
84. Chen Q. BMP4 inhibits glioblastoma invasion by promoting E-cadherin and claudin expression. *Front Biosci.* 2019;24(6):1060-70.
85. Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* sept 2018;18(9):533-48.
86. Roehlecke C, Schmidt MHH. Tunneling Nanotubes and Tumor Microtubes in Cancer. *Cancers.* 1 avr 2020;12(4):857.

87. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2014;15(3):178-96.
88. Carrano A, Zarco N, Phillipps J, Lara-Velazquez M, Suarez-Meade P, Norton ES, et al. Human Cerebrospinal Fluid Modulates Pathways Promoting Glioblastoma Malignancy. *Front Oncol.* 4 mars 2021;11:624145.
89. Zheng W, Zhao Q. Establishment and characterization of an immortalized Z310 choroidal epithelial cell line from murine choroid plexus. *Brain Research.* déc 2002;958(2):371-80.
90. Ahlenius H, Visan V, Kokaia M, Lindvall O, Kokaia Z. Neural Stem and Progenitor Cells Retain Their Potential for Proliferation and Differentiation into Functional Neurons Despite Lower Number in Aged Brain. *J Neurosci.* 8 avr 2009;29(14):4408-19.

