

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE ED 524

EA3842 HOMEOSTASIE CELLULAIRE ET PATHOLOGIES

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie Santé

Option : Cancérologie

Présentée et soutenue publiquement par

SOHA JAWHARI

Le 1^{er} Avril 2015

Etude des signalisations autophagique et neurotrophique dans des lignées de glioblastome humain activées lors de l'hypoxie

Thèse co-encadrée par : **Pr Marie-Hélène RATINAUD** et **Dr Mireille VERDIER**

Soutenue devant le jury composé de :

Rapporteurs

Pascale VARLET : PU-PH, Paris.

Mojgan DJAVAHARI-MERGNY : CR-HDR, Bordeaux.

Examineurs

Hélène BŒUF : DR, Bordeaux.

Marie-Hélène RATINAUD : Pr émérite, Limoges.

Faraj TERRO : MCU-PH HDR, Limoges.

Mireille VERDIER : MCU-HDR, Limoges.

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE ED 524

EA3842 HOMEOSTASIE CELLULAIRE ET PATHOLOGIES

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie Santé

Option : Cancérologie

Présentée et soutenue publiquement par

SOHA JAWHARI

Le 1^{er} Avril 2015

**Etude des signalisations autophagique et neurotrophique
dans des lignées de glioblastome humain activées lors de
l'hypoxie**

Thèse co-encadrée par : **Pr Marie-Hélène RATINAUD** et **Dr Mireille VERDIER**

Soutenue devant le jury composé de :

Rapporteurs

Pascale VARLET : PU-PH, Paris.

Mojgan DJAVAHARI-MERGNY : CR-HDR, Bordeaux.

Examineurs

Hélène BŒUF : DR, Bordeaux.

Marie-Hélène RATINAUD : Pr émérite, Limoges.

Faraj TERRO : MCU-PH HDR, Limoges.

Mireille VERDIER : MCU-HDR, Limoges.

Je dédie cette thèse à mes chers parents

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

A Madame Pascale VARLET, Professeur à l'hôpital Ste Anne (Paris) et Madame Mojgan DJAVAHERI-MERGNY, chargée de recherche à Bordeaux (Inserm U916), merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de m'avoir consacré de votre temps pour évaluer ce travail. Merci pour votre disponibilité.

A Madame Hélène BŒUF, Directeur de recherche à Bordeaux (UMR CNRS 5164) et à Monsieur Faraj TERRO, MCU à Limoges (EA 3808), merci de faire partie de ce jury en tant qu'examineurs et d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je tiens très particulièrement à remercier Marie-Hélène RATINAUD (PU) et Mireille VERDIER (MCU-HDR) de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse. Merci de m'avoir encadrée durant ces années de recherche et d'avoir corrigé mon manuscrit de thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez témoignée, pour vos qualités scientifiques et humaines et votre soutien dans les moments difficiles.

Au laboratoire où j'ai effectué cette thèse

A Marie-Odile JAUBERTEAU, PU, Directrice de l'équipe EA 3842. Merci de m'avoir accueillie dans votre équipe. J'ai passé de très bons moments au sein de votre laboratoire tant au niveau professionnel que relationnel.

A Fabrice, un grand merci pour nos longues discussions scientifiques. A Thomas, merci pour tes nombreux conseils pendant ma première année de thèse. A Sofiane, je te remercie de m'avoir consacré du temps pour m'expliquer comment designer des oligonucléotides et des sondes qPCR. Mes remerciements s'adressent également à Aurélie P. qui m'a initié à l'immunohistochimie, à Carole, qui m'a appris le principe du test de clonogénicité. A Romain, merci pour le bloc de souris que tu m'as passée, ne t'inquiètes pas, je ne l'ai pas encore fini ! Au nouveau Hussein, merci pour ton soutien moral. A Cornélia, merci d'avoir corrigé l'anglais de mon article...

A Faraj, merci pour le temps que tu m'as consacré afin d'utiliser tes différents microscopes !

A Fatima (ma mère en France), Hafidha et Hazar, merci pour les bons moments que nous avons passés ensemble et pour votre soutien moral dans les moments difficiles.

Je tiens particulièrement à remercier Hussein Akil, qui même après son départ du laboratoire, continue à me soutenir pendant de longues conversations téléphoniques !

A Rafik, merci pour ton soutien pendant les moments les plus durs que j'ai vécus cette dernière année...

A tous ceux que je n'ai pas cités mais qui ont fait partie de cette aventure et que j'ai pu connaître tout au long de ces années.

Au service d'anatomo-pathologie

Merci à l'ensemble des techniciens de ce service, qui ont réalisé les différentes lames d'IHC avec un grand sourire. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité. Je tiens particulièrement à remercier Alain CHAUNAVEL, sans qui les expériences *ex-vivo* n'auraient pas pu être réalisées, et au Professeur François LABROUSSE, pour le temps qu'il m'a consacré afin de trier les tumeurs.

Un grand merci à Karine DURANT et Sandrine ROBERT pour l'explication et la réalisation de la manipulation HRC Holland MLPA. Merci Sandrine pour les coupes que tu as réalisées.

A ma chère famille

Tout d'abord à mes parents, Inaam et Ali. Merci de m'avoir toujours supportée, encouragée et de m'avoir permis d'atteindre ce niveau. Je vous dois énormément. Je vous aime.

الحمد لله رب العالمين

أبي الحنون... أمي الرؤوم... إلى أغلى وردتين في بستان قلبي، الى من بذلا نفسيهما من أجل إيصالني إلى هذا المستوى، إلى من يضحيان بيعددي عنهما من أجل مستقبلي... يا أنقى من عرفتهما... أحبكما أمي إنعام... أبي علي...

إلى جدتي 1، يا من كنت أمًا لي في صغري... إلى من تبكي الليالي لبعدي عنها

إلى جدتي 2 وجددي، يا من كل رغبته تفوقنا وتقدمنا في مجالات العلم الواسعة

إلى كل أقاربي وتحديدا أخوايي وخالتي هنادي... أحبكم جميعا... أدامكم الله في صحة وعافية وأمدكم بطول العمر وحفظكم من كل سوء...

A mes chers frères, Mustafa et Mohammad-Hussein, c'est bon de savoir que vous serez toujours à mes côtés. Merci Mouss pour ton aide précieuse et Moh pour ton soutien moral...

A ma belle sœur Nour, le nouveau membre de notre chère famille. You are truly a wonderful sister.

A toute ma famille, tantes, oncles, cousins et cousines, je pense bien à vous.

Table de matière

Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	10
Liste des abréviations.....	11
Avant propos.....	16
1ère partie : Les Gliomes.....	20
I. Généralités sur les gliomes.....	20
I.1. Les cellules gliales :.....	20
I.2. Les astrocytes.....	21
I.3. Caractéristiques générales des gliomes.....	22
I.4. Classification des gliomes.....	22
I.5. Altérations génétiques, chromosomiques et épigénétiques dans les gliomes.....	25
II. Le glioblastome.....	26
II.1. Epidémiologie et pathogenèse.....	26
II.2. Glioblastomes primaires et secondaires.....	27
II.3. Altérations moléculaires caractéristiques des GBM.....	28
II.4. Caractéristiques histologiques des glioblastomes.....	30
II.5. Traitements :.....	31
2ème partie : L'hypoxie.....	32
I. Le facteur inductible par l'hypoxie, Hypoxia Inducible Factor 1 : HIF-1.....	33
I.1. Structure de HIF-1.....	34
I.2. Régulation de l'activité de HIF-1.....	35
1) L'hydroxylation.....	35
2) L'acétylation.....	36
3) La phosphorylation.....	36
I.3. Les gènes cibles de HIF-1.....	37
I.4. Rôle de HIF-1.....	40
1) HIF-1 et cancer.....	40
2) HIF-1 et thérapies anti-cancéreuses.....	41
3ème partie : L'autophagie.....	43
I. Les différents types de l'autophagie.....	43
I.1. La microautophagie.....	43
I.2. La macroautophagie.....	44
I.3. Autophagie dépendante des chaperonnes.....	45

III. La machinerie moléculaire de l'autophagie	46
III.1. Les étapes du processus autophagique	46
III.1.a. Origine des membranes de l'autophagosome	47
III.1.b. Initiation de l'autophagosome.....	47
1) Le complexe Atg1/ULK1	47
2) Le complexe Atg6 (Beclin1)/Phosphatidylinositol3Kinase de classe 3 (PI3K III).....	47
3) Le complexe impliquant l'Atg9	48
III.1.c. Elongation de l'autophagosome	48
1) Le système de conjugaison Atg12-Atg5-Atg16L.....	48
2) Système de conjugaison Atg8 phosphatidyléthanolamine (PE).....	49
III.1.d. Maturation de l'autophagosome	49
1) Fusion avec le lysosome.....	49
2) Dégradation protéolytique	50
IV. Contrôle de l'autophagie	51
IV.1. mTOR (mammalian Target Of Rapamycin)	52
IV.2. AMPK (Adenosin MonoPhosphate-dependent Protein Kinase)	53
IV.3. PI3K (Phospholinositide 3 Kinase) et Akt.....	53
IV.4. MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases).....	54
IV.4.a. ERK.....	55
IV.4.b. p38 MAPK ou p38.....	55
IV.4.c. JNK.....	56
IV.5. PKC (Protéine Kinase C).....	57
V. Fonctions de l'autophagie:	57
V.1. Autophagie et survie cellulaire.....	57
V.2. Autophagie et mort cellulaire	58
V.3 Interrelation entre autophagie et apoptose	59
V.4. Autophagie et cancer	60
V.4.a. Autophagie et tumorigénèse	60
V.4.b. Autophagie et cellules initiatrices de tumeurs	61
V.4.c. Autophagie et traitement des tumeurs.....	62
4ème partie: les neurotrophines (NTs).....	64
I. Définition et historique.....	64
II. Les gènes des neurotrophines	64
III. Les protéines de type neurotrophines	65
IV. Les récepteurs aux neurotrophines.....	66
IV.1. Les récepteurs à haute affinité : les Trk.....	66

IV.1.a. TrkA ou NTRK1	67
IV.1.b. TrkB ou NTRK2	68
IV.1.c. TrkC ou NTRK3	69
IV.2. Le récepteur à basse affinité : le p75 ^{NTR}	70
V. Signalisation des récepteurs aux NTs.....	71
V.1. Signalisation des récepteurs Trk FL	71
V.2. Signalisation du récepteur p75 ^{NTR}	74
V.3. Cas particulier de la signalisation du récepteur TrkC-T1	74
VI. Implication des NTs dans le processus autophagique	75
VII. Implication des NTs dans le processus cancéreux.....	76
• Cas particulier des gliomes	78
Matériels et Méthodes.....	82
I. Culture cellulaire	83
I.1. Modèles cellulaires	83
I.2. Conditions de culture	83
I.3. Congélation-Décongélation des cellules	84
I.4. Traitements	84
II. Transfections	85
II. 1. Obtention des lignées exprimant la protéine de fusion GFP-LC3.....	85
II.1. a. Transformation de bactéries compétentes par un vecteur	85
II.1.b. Mise en culture des bactéries transformées	85
II.1.c. Purification des vecteurs amplifiés	85
II.1.d. Transfection des cellules HEK192 et concentration des particules virales.....	86
II.1.e. Infection des cellules d'intérêt avec les particules virales et tri cellulaire	86
II. 2. Inhibition précoce de l'autophagie par des siRNA.....	86
III. Etude transcriptomique	87
III.1. Extraction des ARN totaux.....	87
III.2. Transcription inverse des ARN	87
III.3. PCR quantitative (qPCR)	88
III.4. Analyses des résultats de la qPCR : Calcul des RQ (Relative Quantities)	90
III.5. Extraction des ARN totaux à partir des tumeurs de patients atteints de GBM.....	90
IV. Etude protéomique	90
IV.1. Western Blotting (WB).....	90
IV.1.a. Extraction des protéines totales en condition dénaturants	90
IV.1.b. Electrophorèse en gel de polyacrylamide.....	90
IV.1.c. Saturation de la membrane et incubation avec les anticorps.....	91

IV.1.d. Révélation par chimioluminescence.....	93
IV.2. ImmunoFluorescence Indirecte (IFI).....	93
IV.3. ImmunoHistoChimie (IHC) (tumeurs incluses en paraffine).....	94
1) Prétraitement des lames.....	94
2) Inhibition des peroxydases endogènes et saturation des sites aspécifiques.....	94
3) Incubation avec les anticorps primaires et secondaires.....	94
4) Réaction enzymatique.....	95
5) Contre-coloration à l'hématoxyline.....	95
6) Déshydratation et montage.....	95
1 ^{ère} partie : Etudes in-vitro : Effet de l'hypoxie sur des lignées de GBM humain.....	97
I. Recherche de mutations et/ou altérations géniques dans les lignées étudiées.....	97
II. Expression de BNIP3.....	97
III. Effet de l'hypoxie sur la viabilité cellulaire et l'activité déshydrogénase mitochondriale des lignées U87MG, M059K et M059J.....	98
IV. Effet de l'hypoxie sur les signalisations cellulaires.....	100
IV.1. Effet de l'hypoxie sur l'apoptose.....	100
IV.2. Effet de l'hypoxie sur l'induction de l'autophagie.....	100
IV.2.a. Etude de l'expression de protéines clés du processus autophagique.....	100
IV.2.b. Visualisation des autophagosomes lors de la réponse à l'hypoxie.....	103
V. Conséquences de l'inhibition de l'autophagie.....	109
V.1. Inhibition pharmacologique : blocage du flux autophagique par la Chloroquine.....	109
V.2. Inhibition de l'autophagie: siRNA spécifiques des transcrits de Beclin1 et d'Atg5... ..	116
V.2.a. Validation des siRNA.....	116
V.2.b. Effets de l'inhibition de l'autophagie par siRNA.....	117
2 ^{ème} partie : Analyse de l'expression et de la signalisation des Neurotrophines en réponse à un stress hypoxique dans des cellules de glioblastome.....	121
I. Etude transcriptomique des neurotrophines et de leurs récepteurs en condition hypoxique.....	121
II. Effet de l'hypoxie sur la production du TrkC et de la NT-3 dans les cellules U87MG.....	123
III. Effet de l'hypoxie sur la transcription du TrkC tronqué dans les U87MG.....	125
IV. Visualisation du TrkC par microscopie à fluorescence.....	125
V. Effet de l'hypoxie sur la phosphorylation du TrkC.....	126
VI. Etude de la signalisation du TrkC FL.....	127
VI.1. Voie PI3K/Akt.....	127
VI.2. Voie des MAPK.....	129
VII. Etude d'un partenaire du TrkC-T1 (tronqué) : Arf6.....	130

3 ^{ème} partie : Effet des inhibitions respectives de l'autophagie et/ou des signalisations de TrkC	132
I. Inhibition de l'autophagie.....	132
I.1. Effet de la CQ sur l'expression des TrkC FL et T1	132
I.2. Effet des siRNA de Beclin1 et d'Atg5 sur l'expression des TrkC FL et T1	133
I.3. Le TrkC serait-il dégradé par autophagie ?.....	137
I.4. Effet de l'inhibition de l'autophagie sur la phosphorylation du TrkC FL	138
I.5. Effet de l'inhibition de l'autophagie par la CQ sur l'expression et l'activation de la p38 MAPK.....	139
I.6. Effet de l'inhibition de l'autophagie par la CQ sur l'expression d'Arf6.....	139
II. Inhibition des signalisations de TrkC	140
II.1. Inhibition de la p38 MAPK	140
II.1.a. Validation du siRNA des transcrits de la p38 MAPK.....	140
II.1.b. Effet du siRNA des transcrits de la p38 MAPK sur l'autophagie	141
II.1.c. Effet du siRNA des transcrits de la p38 MAPK et/ou de l'inhibition de l'autophagie sur le devenir des cellules U87MG.....	142
II.2. Effet de l'inhibition d'Arf6	144
II.2.a. Validation du siRNA des transcrits d'Arf6 et effet sur l'autophagie basale	144
II.2.b. Effet du siRNA des transcrits d'Arf6 sur l'autophagie induite par l'hypoxie	145
II.2.c. Effet de l'inhibition d'Arf6 sur le devenir des cellules U87MG	148
4 ^{ème} partie : Etudes ex-vivo : Recherche de marqueurs d'hypoxie, d'autophagie et du couple TrkC/NT-3 au niveau de prélèvements de patients atteints de GBM	150
I. Mise en évidence de zones d'hypoxie dans le cavernome et le GBM	150
II. Mise en évidence de l'autophagie dans le cavernome et le GBM.....	152
III. Etude de l'expression du couple TrkC/NT-3 dans le GBM.....	154
III.1. Détection et quantification des transcrits de TrkC FL, TrkC-T1 et NT-3 par RT-qPCR	154
III.2. Détection du TrkC et NT-3 par immunohistochimie.....	154
Discussion	158
Conclusion et perspectives générales.....	169
Bibliographie.....	172
Annexes.....	202

Liste des figures

Figure 1 : Glioblastome multiforme observé par IRM au niveau du lobe temporal.....	27
Figure 2 : Modèle hypothétique montrant les différents types d'altérations génétiques aboutissant à l'apparition du glioblastome primaire et à l'évolution de tumeurs gliales de bas grade vers un glioblastome secondaire.	28
Figure 3 : Aspects histologiques du GBM.....	31
Figure 4 : Origine de l'hypoxie au sein des tumeurs.....	33
Figure 5 : Régulation de l'activité de HIF-1 α	37
Figure 6 : Modèle de mort cellulaire contrôlée par BNIP3.	40
Figure 7 : Les différentes formes d'autophagie.	45
Figure 8 : Représentation schématique de la macroautophagie.	46
Figure 9 : Molécules et complexes impliqués dans le déroulement et la régulation de l'autophagie. ...	51
Figure 10 : Régulation de l'autophagie par la voie PI3K/Akt/mTOR.....	54
Figure 11 : Structure des récepteurs de type Trk.	67
Figure 12 : Représentation simplifiée des principales voies de signalisation des Trks.	73
Figure 13 : Représentation de la réaction Taqman™.....	88
Figure 14 : Effet de l'hypoxie sur l'activité transcriptionnelle d'HIF-1.	98
Figure 15 : Effet de l'hypoxie sur les cellules U87MG, M059K et M059J.....	99
Figure 16 : Effet de l'hypoxie sur la mort apoptotique dépendante des caspases.	100
Figure 17 : Expression de Beclin1, d'Atg5-12, de p62 et de la LC3 dans les cellules U87MG, M059K et M059J.....	103
Figure 18 : Détection par microscopie confocale des vacuoles autophagiques dans les cellules U87MG.	105
Figure 19 : Détection par microscopie confocale des vacuoles autophagiques dans les cellules M059K.....	107
Figure 20 : Détection par microscopie confocale des vacuoles autophagiques dans les cellules M059J.....	109
Figure 21 : Effet de l'inhibition du flux autophagique sur l'autophagie induite par l'hypoxie.	111
Figure 22 : Effet de la Chloroquine sur la formation d'autophagosomes dans les cellules U87MG et M059K transfectées de manière stable avec le plasmide pGFP-autophago-LC3.....	114
Figure 23 : Effet de l'inhibition de l'autophagie par la CQ sur le devenir cellulaire des lignées U87MG, M059K et M059J.	115
Figure 24 : Conséquences de l'inhibition du flux autophagique sur la mort apoptotique dépendante des caspases.	116
Figure 25 : Extinction des transcrits de Beclin1 et Atg5 par siRNA.....	117
Figure 26 : Effet de l'inhibition de l'autophagie par siRNA sur l'activité déshydrogénase mitochondriale.....	118
Figure 27 : Effet de l'inhibition de l'autophagie par siRNA sur la prolifération cellulaire.....	118
Figure 28 : Effet de l'inhibition de l'autophagie par siRNA sur la mort apoptotique.....	119
Figure 29 : Quantification par qPCR des transcrits des neurotrophines et de leurs récepteurs dans les lignées U87MG, M059K et M059J.	122
Figure 30 : Effet de l'hypoxie sur la production du TrkC et de la NT-3 intracellulaire.....	124
Figure 31 : Effet de l'hypoxie sur la production du variant 3 de <i>NTRK3</i> (permettant d'obtenir le TrkC tronqué).	125
Figure 32 : Détection du TrkC par microscopie à fluorescence.....	126
Figure 33 : Effet de l'hypoxie sur la phosphorylation du TrkC.	127
Figure 34 : Effet de l'hypoxie sur des membres de la voie PI3K/Akt.....	128
Figure 35 : Effet de l'hypoxie sur des acteurs de la voie des MAPK.	130
Figure 36 : Effet de l'hypoxie sur l'expression d'Arf6.....	131
Figure 37 : Effet de la CQ sur les TrkC FL et T1 dans la lignée U87MG.	132
Figure 38 : Effet de la CQ sur l'expression du TrkC.	133

Figure 39 : Effet de l'inhibition de l'autophagie par siRNA des transcrits de Beclin1 et d'Atg5 sur l'expression des TrkC FL et T1.	134
Figure 40 : Effet des siRNA de l'autophagie sur l'expression du TrkC.	136
Figure 41 : Effet de la CQ sur l'expression du TrkC.	137
Figure 42 : Effet de l'inhibition de l'autophagie par la CQ sur la phosphorylation du TrkC FL.	138
Figure 43 : Effet de l'inhibition de l'autophagie par la CQ sur la l'expression et la phosphorylation de la p38 MAPK.	139
Figure 44 : Effet de la CQ sur l'expression d'Arf6 dans la lignée U87MG.	140
Figure 45 : Extinction des transcrits de la p38 MAPK par siRNA.	141
Figure 46 : Effet de l'inhibition de la p38 MAPK par siRNA sur le processus autophagique dans les cellules U87MG.	141
Figure 47 : Effet de l'inhibition de la p38 MAPK par siRNA sur l'activité déshydrogénase mitochondriale et la prolifération cellulaire.	143
Figure 48 : Effet de l'inhibition de la p38 MAPK par siRNA sur la mort apoptotique dépendante des caspases.	144
Figure 49 : Extinction des transcrits d'Arf6 par siRNA et effet sur l'autophagie basale.....	145
Figure 50 : Effet de l'inhibition d'Arf6 par siRNA sur le processus autophagique dans les cellules U87MG.	146
Figure 51 : Effet de l'extinction d'Arf6 sur l'autophagie dans la lignée U87MG.	147
Figure 52 : Effet de l'inhibition d'Arf6 par siRNA sur l'activité déshydrogénase mitochondriale et la prolifération cellulaire.	148
Figure 53 : Effet de l'inhibition d'Arf6 par siRNA sur la mort apoptotique dépendante des caspases.	149
Figure 54 : Mise en évidence de zones d'hypoxie dans des tumeurs issues de patients atteints de cavernome et de GBM.	151
Figure 55 : Mise en évidence de l'autophagie dans des tumeurs issues de patients atteints de cavernome et de GBM.	153
Figure 56 : Détection du TrkC et de la NT-3 dans des tumeurs issues de patients atteints de cavernome et de GBM.	156

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des gliomes selon l'OMS 2007. D'après (Louis et al., 2007).	24
Tableau 2 : Structure des sous unités humaines d'HIF-1.....	34
Tableau 3 : Principaux gènes cibles du facteur de transcription HIF-1. Tableau adapté d'après Ke and Costa, 2006.....	39
Tableau 4 : Liste des agents thérapeutiques capables de bloquer HIF-1. Adapté d'après Ke and Costa, 2006.....	42
Tableau 5 : Les différentes dénominations de la macroautophagie, en fonction de la nature des éléments dégradés.....	44
Tableau 6 : Caractéristiques génétiques des NTs. Les localisations chromosomiques ainsi que le nombre de variants transcriptomiques de chaque NT sont obtenus à partir de la banque génomique NCBI.....	65
Tableau 7 : Les différentes isoformes de TrkC.....	70
Tableau 8 : Implication des neurotrophines dans le processus cancéreux.....	77
Tableau 9 : Séquences d'amorces Sens et anti-sens ainsi que les sondes utilisées pour amplifier les gènes d'intérêt.....	89
Tableau 10 : Anticorps primaires utilisés en western blot. PM : Poids Moléculaire.....	92
Tableau 11 : Anticorps secondaires utilisés en western blot. HRP : HoRse Peroxydase	92
Tableau 12 : Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence, ainsi que les conditions de dilution et d'incubation.....	94
Tableau 13 : Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunohistochimie, ainsi que les conditions de dilution et d'incubation.....	95
Tableau 14 : Recherche de mutations/altérations géniques dans les lignées de GBM étudiées.....	97
Tableau 15 : Expression du TrkC FL, TrkC-T1 et de la NT-3 dans les tumeurs de patients atteints de GBM et les lignées cellulaires.....	154

Liste des abréviations

-A-

A : ampère
aa : acides aminés
ADM : Adrenomedulin
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AIF : apoptosis-inducing factor
Akt/PKB : Akt 8 virus oncogene cellular homologue / Protein Kinase B
ALDA,C : Aldolase-A,C
AMPK : AMP-activated protein kinase
Arf : ADP ribosylation factor
AP1 : activating protein-1
Arg : arginine
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARMS : ankyrin repeat-rich membrane spanning adaptor
ARNT : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATF2 : Cyclic AMP-dependent transcription factor
Atg : autophagy related genes
ATP : adénosine triphosphate
ATRX : transcriptional regulator

-B-

Bad : Bcl-x_L/Bcl-2 associated death promoter homolog
BAFA1 : bafilomycine A1
Bak : Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax : Bcl-2 associated X protein
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
Bcl-x_L : longer alternatively splice form of Bcl-2 homolog X protein from avian lymphocyte development

BDNF : brain-derived neurotrophic factor
BECN1 : gène codant Beclin1
BH : Bcl2-homology
bHLH : basic-Helix-loop-helix
Bif1 : Bax interacting factor 1
BNIP3 : BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
BSA : bovine serum albumin

-C-

Caspase : cystéine aspartate protéase ou cysteinyl aspartate-specific proteinase
CBP : CREB binding protein
CDK : cyclin dependent kinase
CGH : comparative genomic hybridization
CIC : capicua homolog
CIG : cellules initiateuses de gliomes
CNTF : ciliary neurotrophic factor
CO₂ : dioxyde de carbone
Co²⁺ : ions cobalt
COPI : coat protein
COL1A : collagen 1 alpha
CQ : chloroquine
CREB : cAMP response element binding
CSC : cellules souches cancéreuses
CSG : cellules souches de glioblastome
Ct : cycle threshold
CTAD : C-terminal transactivation domain
Cytc : cytochrome c

-D-

D : aspartate
Da : Dalton
DAB : 3,3'-diaminobenzidine
DAG : Diacylglycérol

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
DAPK : death associated protein Kinase
DD : death domain
DFO : desferrioxamine
DMEM : dulbecco's modified eagle medium
DMSO : diméthylsulfoxyde
DNAPK : DNA dependent protein kinase
DNAPK_{cs} : DNA dependent protein kinase catalytic subunit
dNTP : désoxynucléotide triphosphate
DRAM1 : damage-regulated autophagy modulator 1
dUTP : désoxyuridine triphosphate

-E-

4E-BP1 : 4E-Binding Protein 1
E : glutamate
EG-VEGF : Endocrine-gland-derived VEGF
EGF : epithelial growth factor
EGFR : epithelial growth factor receptor
Egl : egg-laying defective
eIF4E : eukaryotic translation initiation factor 4E
EMAP-II : endothelial-monocyte activating polypeptide-II
ENO1 : Enolase-1
EPO : Erythropoietin
ERK : extracellular signal regulated protein kinase
ESCRT : endosomal sorting complex required for transport
ET1 : Endothelin 1

-F-

F : phénylalanine
FGD : 18F-deoxyglucose

Fe²⁺ : ions ferreux
FGF : fibroblast growth factor
FISH : fluorescence in situ hybridization
FoxO1, 3 : Forkhead box O1, 3
5-FU : 5-Fluorouracil
FUBP1 : Far Upstream Binding Protein 1

-G-

GABA : gamma-aminobutyric acid
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GBM : glioblastoma multiforme
GDP : guanosine diphosphate
GFP : green fluorescent protein
GLUT1,3 : Glucose transporter-1,3
Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2
GSK-3 : Glycogen synthase 3
GTP : guanosine triphosphate

-H-

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HEK192 : human embryonic kidney 192
HK1,2 : Hexokinase 1,2
HIF : hypoxia-inducible factor
HIV : human immunodeficiency virus
HMGB1 : high-mobility group box 1 protein
HPRT1 : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HRE : hypoxia response element
HRP : Horseradish peroxidase
Hsc-73 : heat shock cognate protein of 73 KDa

-I-

ID : inhibitor domain

IDH : isocitrate déshydrogénase
Ig : immunoglobuline
IGF2 : Insulin-like growth factor-2
IP3 : inositol-1,4,5-triphosphate
IRM : imagerie par résonance magnétique

-J-

JNK : c-Jun N-terminal kinase

-K-

K : lysine
Kda : kilo dalton
Kpb : kilo paire de base

-L-

Lamp2 : lysosome-associated membrane protein type 2
LB : Luria-Bertani
LC3 : light chain 3
LDHA : Lactate dehydrogenase-A
LEP : leptin
LOH : loss of heterozygosity
Lys : lysine

-M-

3-MA : 3-méthyladénine
MAPK : mitogen activated protein kinase
MAPKK : mitogen activated protein kinase kinase
MAPKKK : mitogen activated protein kinase kinase kinase
MAP-LC3 : microtubule-associated protein 1 (MAP1) light chain 3 (LC3)
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1
MDM2 : mouse double minute 2
MEK : MAPK/extracellular signal-regulated kinase

MEKK : MAPK/extracellular signal-regulated kinase kinase
min : minutes
MLPA : multiplexLigation-dependent probe amplification
mmHg : mm de mercure
MMP : matrix metalloproteinase
MMR : MisMatch Repair
MOI : multiplicity of infection
mTOR : mammalian target of rapamycin
mTORC : mammalian target of rapamycin complex

-N-

N₂ : diazote
NC : non communiqué
NFκB : nuclear factor kappa B
NGF : nerve growth factor
NGFR : nerve growth factor receptor
Ni²⁺ : ions nickel
NLS : nuclear localization signal
NOS : nitric oxide synthase
Noxa : PMA-induced protein 1
NSF : N-ethylmaleimide sensitive fusion protein
NT : neurotrophine
NT-3, 4-5, 6, 7 :
neurotrophine 3, 4-5, 6 ou 7
NTAD : N-terminal transactivation domain
NTRK1, 2 et 3 : gènes codants TrkA, B et C respectivement
NTs : neurotrophines

-O-

O₂ : dioxygène
ODD : oxygen-dependant domain
ODDD : oxygen-dependant degradation domain
OMS : organisation mondiale de la santé

ON : overnight
ORF : open reading frame

-P-

p75^{NTR} : p75 neurotrophin receptor
PA : phosphatidic acid
PAIs : Plasminogen activator receptors and inhibitors
PARP : poly(ADP-ribose) polymerase
PAS : PER-ARNT-SIM domain
Pb : paire de base
PBS : Phosphate buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
PDGF : platelet derived growth factor
PDK : phosphoinositide Dependent Kinase
PER : period circadian protein
PFA : paraformaldéhyde
PFKFB3 : 6-phosphofructo-2-kinase/gructose-2,6-bisphosphate-3
PFKL : Phosphofructokinase L
PGK1 : Phosphoglycerate kinase 1
PH : pleckstrin homology
PHD : prolyl-hydroxylases
PI3K : phosphatidylinositide 3 kinase
PI2P ou PI4,5P2 : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PI3P : phosphatidylinositol - 1,4,5-triphosphate
PI3,4P2 : phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate
PI3,4,5P3 : phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PKC, PKA : protein kinase C, A
PKM : Pyruvate kinase M

PLC γ : phospholipase C γ
PLD : phospholipase D
PMK1 : protein-mitogen-activated protein 1
PE : phosphatidyléthanolamine
PFA : paraformaldéhyde
PMN : piecemeal microautophagy of the nucleus
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride
PRAS40 : proline-rich Akt substrate of 40 kDa
pro-NTs : proneurotrophines
PTEN : phosphatase and tensine
pVHL : von hippel-lindau
PVDF : Polyvinylidène difluoride

-Q-

Q : glutamine
Q : quencher
qPCR : quantitative PCR

-R-

R : arginine
R : reporter
Ras : rat sarcoma
RAP : receptor-associated protein
RE : reticulum endoplasmique
ROS : reactive oxygen species
rpm : rotation per minute
RQ : relative quantities
RT : room temperature
RTK : récepteur à activité tyrosine kinase
RT-PCR : reverse transcription PCR

-S-

s : secondes
SAPK : stress-activated protein kinase
SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel

SH2 : Src-homology 2
Shc : Src-homology 2 domain containing
Sim : single-minded protein
Sin1 : kinase-interacting protein 1
siRNA : small interfering RNA
SNAREs : soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SNC : système nerveux central
SOS : son of sevenless
SQSTM1 : séquestrome 1
SRC-1 : steroid receptor coactivator-1
STAT3 : signal transducer and activator of transcription 3

-T-

t1/2 : temps de demi-vie
TAD : transactivation domain
TBS : tris buffer saline
TGF- α : Transforming growth factor- α
TGF- β 3 : Transforming growth factor- β 3
Tf : transferrin
Tfr : Transferrin receptor
TNF : tumor necrosis factor
TP53 : gene codant la p53
TrkA, B, C : tromomyosin receptor kinase A, B ou C
TrkC FL : TrkC full length
TrkB-T1 : TrkB tronqué ou TrkB95
TrkC-T1 : TrkC tronqué
TSC : tuberous sclerosis complex

-U-

ULK1 : unc-51 like autophagy activating kinase 1
UVRAG : UV radiation resistance-associated gene protein

-V-

V : volt

VAMP : Vesicle-associated
membrane protein

VEGF : vascular endothelial
growth factor

VEGFR : vascular endothelial
growth factor receptor

-W-

W : watt

W : tryptophane

WB : western blotting

WIPI-1, WIPI-2 : WD-repeat
protein interacting with
phosphoinositides 1 et 2

-X-

XTT : 2,3-Bis-2-Methoxy-4-
Nitro-5-Sulfophenyl

-Y-

Y : tyrosine

Avant propos

Depuis 1989, le cancer est devenu la première cause de décès en France, devant les maladies cardiovasculaires. Le mot « Cancer » est un terme général désignant une maladie où certaines cellules de l'organisme ont une croissance incontrôlée, en raison de gènes mutés, inactivés, ou supprimés, impliqués notamment dans le contrôle du cycle cellulaire. Parmi les caractéristiques des cellules cancéreuses, on peut citer : une insensibilité aux mécanismes anti-prolifératifs ou encore une forte capacité d'angiogenèse. En effet, une tumeur solide se développe par la multiplication des cellules qui progressivement s'individualisent en une masse cellulaire. De cette façon, les cellules proliférantes se retrouvent éloignées des vaisseaux sanguins, dans des zones faiblement oxygénées (hypoxiques). En parallèle, pour répondre à ce défaut d'oxygénation, une néovascularisation, le plus souvent incomplète se met en place dans la tumeur et maintient les cellules en hypoxie. Alors que ce stress peut entraîner la mort des cellules cancéreuses par manque de dioxygène et/ou de nutriments, celui-ci est responsable, au moins en partie, de leur résistance aux traitements induisant une mort apoptotique (Amberger-Murphy, 2009). Il constitue également un moyen de résister à la chimiothérapie (Wilson et al., 2007) et à la radiothérapie (Semenza, 2004).

Ce déficit, normalement létal, est surmonté par les cellules cancéreuses notamment par l'activation de l'autophagie. Il s'agit d'un mécanisme d'adaptation cellulaire en réponse à un stress. Il entraîne la dégradation et le recyclage d'organites altérés et de protéines à longue durée de vie (Levine, 2005), afin d'assurer l'homéostasie et la survie (Codogno and Meijer, 2005). Cependant, des réparations insuffisantes ou un stress important peuvent conduire à la mort cellulaire, on parle de la mort autophagique.

L'autophagie a été caractérisée lors de carence nutritive, mais elle peut être également induite par d'autres types de stress. En effet, plusieurs études antérieures ont montré sa mise en place en réponse à l'hypoxie dans différents types de tumeurs. Un cas particulier d'autophagie est la mitophagie : elle peut être consécutive à un stress métabolique, oxydant (hypoxie ou radiothérapie...). Au cours de celui-ci, des Espèces Oxygénées Réactives (ROS) sont surproduites essentiellement par les mitochondries ; elles sont alors éliminées par mitophagie (Lemasters, 2005). De même, ce processus est activé lorsque ces organites présentent un collapse modéré du potentiel membranaire mitochondrial.

Lorsque je suis arrivée dans l'EA 3842, lors de mon M2R, j'ai participé à l'étude de la réponse de cellules de neuroblastome à des conditions hypoxiques.

Le neuroblastome est une tumeur maligne du système nerveux périphérique, d'origine embryonnaire. Bien qu'étant la tumeur solide la plus fréquente, c'est un cancer rare, avec moins de 150 nouveaux cas par an diagnostiqués en France. De manière générale, c'est la seule tumeur solide capable de régresser spontanément chez les très jeunes enfants, mais elle reste de sombre pronostic chez ceux de plus d'un an. Les principales caractéristiques génétiques du neuroblastome sont la perte d'expression de la caspase-8, invalidant la mort induite par le recrutement des récepteurs de mort, et l'amplification de *n-myc*, *ras* et *mTOR*, responsables d'une prolifération importante. Le locus *TP53* est rarement muté dans ce type de tumeur et n'est pas souvent associé à la progression tumorale (Hosoi et al., 1994). Cependant, à la suite de traitements répétés par chimiothérapie et radiothérapie, certaines métastases multi-résistantes émergent, avec pour caractéristiques majeures la perte d'hétérozygotie et/ou des mutations sur le gène *TP53*, invalidant ses fonctions suppresseurs de tumeurs.

Nous avons étudié la réponse des cellules de neuroblastome ayant un gène *TP53* sauvage (SHSY5Y) ou muté (SK-N-BE2(c)), à une molécule mimétique de l'hypoxie, le CoCl_2 . Dans la lignée ayant une p53 sauvage, le mimétique a induit une signalisation apoptotique impliquant la p53, caractérisée par une chute du potentiel membranaire mitochondrial et une activation des caspases-9 et -3. Dans la lignée SK-N-BE2(c), où le gène *TP53* est muté et dans les SHSY5Y où nous avons invalidé son expression par shRNA, le CoCl_2 induit une signalisation autophagique. Celle-ci précède une mort cellulaire, intervenant tardivement, sans activation des caspases, mais avec libération de l'AIF mitochondrial, privilégiant une mort autophagique (Naves et al., 2013).

Par la suite, les travaux de l'équipe ont été recentrés sur le glioblastome, tumeur touchant une autre catégorie de cellules du système nerveux : les astrocytes. Il s'agit de la tumeur primitive du cerveau la plus fréquente et la plus agressive, également connue sous le nom d'astrocytome de grade IV. Cette tumeur est fortement hypoxique et particulièrement résistante à l'apoptose (Krakstad and Chekenya, 2010). Dans le travail de thèse qui m'a été confié et qui est exposé dans ce manuscrit, nous nous sommes tout d'abord intéressés à la place de l'autophagie dans la réponse à l'hypoxie dans des cellules de glioblastome. Pour cela, nous avons privilégié un modèle d'hypoxie physique, plus proche des conditions « *in vivo* » que celui du mimétique de l'hypoxie, le CoCl_2 , précédemment employé.

Au cours de la signalisation autophagique, des complexes protéiques spécifiques vont intervenir séquentiellement. Leur intervention est fortement régulée en amont par différents acteurs intracellulaires. Par exemple, la voie AKT/PKB inhibe l'autophagie en activant le complexe mTORC1 (Díaz-Troya et al., 2008), alors que PTEN, ou encore les inhibiteurs TSC1 et TSC2 de mTORC1 induisent ce mécanisme. Ces molécules se trouvent en aval de

la signalisation activée par les facteurs de croissance. Parmi ceux-ci, se trouvent les neurotrophines (facteurs de croissance découverts dans le système nerveux central), dont les signalisations sont éventuellement activées au cours de l'oncogenèse.

Notre équipe, l'EA 3842, a comme thématique principale l'étude des conditions de survie et de renouvellement des cellules tumorales. Elle s'intéresse particulièrement à la caractérisation de nouveaux rôles de facteurs de croissance neuropeptidiques (neurotrophines, neurotensine), produits par ces cellules, en condition de stress cellulaire mais aussi aux liens possibles avec les signalisations de vie et de mort. Ainsi, nous avons également recherché au cours de cette étude, l'implication de la signalisation des neurotrophines dans la réponse des cellules de glioblastome au stress hypoxique. Cette double approche, autophagie et neurotrophines, nous a conduit à rechercher les interconnexions entre ces deux voies dans le contexte de l'hypoxie, et le « bénéfique » que les cellules tumorales pouvaient en retirer. L'objectif à terme est de pouvoir suggérer de nouveaux leviers moléculaires dans le traitement du glioblastome.

Introduction bibliographique

1ère partie : Les Gliomes

I. Généralités sur les gliomes

Le système nerveux central (SNC) est constitué de deux grands types cellulaires : les neurones, qui sont les cellules « dites nobles » et qui représentent 10% du capital cellulaire, et les cellules gliales, considérées comme « des cellules de soutien » et qui en représentent 90% (Koob, 2009). Les neurones transmettent des informations sous forme de signaux électriques ou chimiques vers des cellules cibles telles que d'autres neurones, des cellules endocrines, neuroendocrines ou musculaires. Elles nécessitent pour leur fonctionnement un contact étroit avec les cellules gliales. Ce sont ces dernières qui sont affectées par un gliome.

I.1. Les cellules gliales :

Les cellules gliales sont d'origine ectodermique ; elles entourent les neurones et participent au contrôle de l'environnement chimique et électrique, en leur fournissant des nutriments et en éliminant leurs déchets. Elles sont classées en deux grandes familles histologiques :

- ✓ La macroglie comprenant les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules épendymaires et les cellules NG2 positives,
- ✓ La microglie composée de macrophages spécialisés.

La description des astrocytes est détaillée dans le chapitre ci-dessous. Les oligodendrocytes entourent les axones, formant ainsi la gaine de myéline protectrice et nutritive pour les neurones. De par sa richesse en lipides, la gaine de myéline isole les axones améliorant ainsi la vitesse de l'influx nerveux. Les cellules épendymaires, encore appelées épendymocytes, sont ciliées et constitutives de la paroi délimitant les ventricules cérébraux. Grâce à leurs battements ciliaires, elles facilitent la circulation du liquide céphalo-rachidien (LCR) sécrété par le plexus choroïde. Les cellules NG2 positives présentent le protéoglycane NG2 à leur surface. Elles se différencient *in-vitro* en oligodendrocytes, et elles seraient impliquées dans la plasticité neuronale car des analyses électrophysiologiques ont montré qu'elles reçoivent des signaux synaptiques en provenance des neurones (Nishiyama et al., 2009).

La microglie est composée de macrophages spécialisés capables de phagocytose. Elles sont impliquées dans l'immunité locale notamment au cours de l'inflammation (Gehrmann et al., 1995), assurant ainsi la protection des neurones du SNC.

Chacun de ces types cellulaires est susceptible de subir des dysfonctionnements conduisant à l'apparition d'un gliome particulier.

I.2. Les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules de forme étoilée. Ils sont les plus abondants parmi toutes les cellules gliales et dotés de différentes fonctions dans le SNC. D'une part, les astrocytes dits de type I remplissent une fonction nutritive : ce sont de véritables passerelles entre les vaisseaux sanguins et les neurones. Ils participent à la formation de la barrière hémato-encéphalique et lient les neurones à la circulation sanguine. Ces cellules réguleraient également les mécanismes de vasoconstriction et vasodilatation en produisant de l'acide arachidonique à l'origine des métabolites vasoactifs. D'autre part, les astrocytes dits de type II ont un rôle structural, en entourant les neurones et les fentes synaptiques empêchant ainsi la dispersion des neurotransmetteurs. Ils régulent l'environnement chimique externe de ces derniers en éliminant l'excès d'ions, notamment le potassium, et en recyclant les neurotransmetteurs comme le glutamate et le GABA (Gamma-AminoButyric Acid) libérés lors de la transmission synaptique (Baudrimont, 1991).

A cette classification fonctionnelle se superpose une dichotomie structurale entre deux types d'astrocytes, les protoplasmiques et les fibreux. Ils exercent des fonctions similaires, mais différent en termes de morphologie et localisation. En effet, les astrocytes protoplasmiques présents dans la substance grise, sont dotés de nombreuses ramifications courtes et épaisses, alors que les astrocytes fibreux, retrouvés dans la substance blanche, ont moins de ramifications, qui sont longues et lisses (Ramón y Cajal, 1909).

Les astrocytes sont caractérisées par l'expression du filament intermédiaire GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), qui est devenu le marqueur de caractérisation de cette population cellulaire par immunohistochimie (Sofroniew and Vinters, 2010). Cependant, la GFAP a initialement été isolée en grandes concentrations au niveau des patients atteints de sclérose en plaque, et a ensuite été associée aux astrocytes réactifs (Eng et al., 1970; Eng et al., 2000). Ceux-ci peuvent provoquer une astroglie, caractérisée par l'augmentation du nombre d'astrocytes suite à une maladie ou une lésion cérébrale ; cette pathologie change l'expression moléculaire, la morphologie et le fonctionnement des astrocytes (Sofroniew, 2009). Les astrocytes et les astrocytes réactifs influencent le fonctionnement des neurones, notamment par la régulation du flux sanguin, la fourniture d'énergie, les fonctions synaptiques et la plasticité (Sofroniew and Vinters, 2010). La perte de leur fonction durant le processus d'astroglie peut contribuer à des maladies graves du SNC, telles que le traumatisme cérébral, l'accident vasculaire cérébral, la sclérose en plaques, la maladie d'Alzheimer...etc (Sofroniew and Vinters, 2010).

Par ailleurs, les astrocytes jouent un rôle important dans la progression des gliomes, y compris le glioblastome. En considérant la théorie des cellules souches cancéreuses, seules de petites populations cellulaires seraient capables de former une tumeur (Furnari et al., 2007; Singh et al., 2004). La présence au niveau de cerveaux adultes, de cellules souches cancéreuses exprimant le marqueur astrocytaire, la GFAP, augmente la possibilité de la contribution de ces cellules à l'initiation des tumeurs astrocytaires, telles que le glioblastome. De plus, certaines propriétés des gliomes astrocytaires semblent en relation avec les fonctions des astrocytes. Il s'agit par exemple de la production du glutamate qui augmente l'invasion tumorale (Sontheimer, 2008), ou encore l'amplification de la signalisation STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) dans le glioblastome. Celle-ci est associée de façon classique à la fonction des astrocytes (Nguyen et al., 2008) et aurait pour rôle de diminuer l'inflammation et la surveillance immunitaire dans les GBM (Brantley et al., 2008).

I.3. Caractéristiques générales des gliomes

Au sens restreint du terme, les gliomes regroupent essentiellement les tumeurs primitives du SNC dérivées des astrocytes et des oligodendrocytes et se caractérisent par des proliférations anarchiques de cellules gliales. En raison du volume non extensible de la boîte crânienne, ils peuvent infiltrer des zones fonctionnelles du cerveau et engendrer des troubles importants (Hablützel and Schweiz, 2009). Ils peuvent se développer dans tout le système nerveux central bien que, en fonction du type histologique, certains territoires soient préférentiellement impliqués (Figarella-Branger and Bouvier, 2005). Leur pronostic demeure sombre et plusieurs sous-types existent en fonction du caractère infiltrant ou non, du grade et du type histologique, ainsi que de la localisation dans le SNC. De manière générale, deux types de gliomes sont opposés, les gliomes infiltrants et les gliomes circonscrits. Les gliomes infiltrants peuvent être de bas ou de haut grade, ils envahissent le parenchyme adjacent sain et peuvent soit avoir une structure mixte (solide et infiltrante) soit être composés uniquement de cellules tumorales isolées pouvant évoluer lentement ou être d'emblée de haut grade. Les gliomes circonscrits ne sont constitués que de tissu tumoral, ils sont généralement de bas grade (grade I) et représentés par les astrocytomes pilocytiques (Figarella-Branger and Bouvier, 2005).

I.4. Classification des gliomes

Plusieurs auteurs ont successivement tenté d'établir une classification des gliomes (Figarella-Branger et al., 2008). Dès 1926, Bailey et Cushing (MacKenzie, 1926) proposèrent que le développement des tumeurs cérébrales s'effectuerait à partir de cellules embryonnaires arrêtées à différents stades de développement et susceptibles de se

différencier. Puis Kernohan (Kernohan and Mabon, 1949) proposa que les gliomes se développaient à partir de cellules adultes susceptibles de se dédifférencier, et il introduisit la notion de « grade » histologique de malignité. A la suite de ses travaux, la classification des gliomes fut basée sur des critères histologiques définissant des degrés de malignité (grade I à IV) et a servi de base à celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) établi en 1979. Elle a subi plusieurs révisions depuis (1993, 2000, 2007), mais n'a sensiblement pas évolué. Le type histologique tumoral est défini en fonction du type cytologique prédominant. Le grade varie en fonction des critères suivants : l'augmentation de la densité cellulaire, les atypies nucléaires, les mitoses, l'hyperplasie vasculaire et la nécrose (Figarella-Branger et al., 2008). La classification des gliomes reconnue par la communauté scientifique est celle de l'OMS (Louis et al., 2007) (Tableau 1).

Tumeurs astrocytaires	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaires	*			
Astrocytome pilocytiques	*			
Astrocytome pilomyxoides		*		
Astrocytome diffus		*		
Xanthoastrocytome pleiomorphiques		*		
Astrocytome anaplasiques			*	
Glioblastome				*
Glioblastome à cellules géantes				*
Gliosarcome				*
Tumeurs oligodendrogiales	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
Oligodendrogliome		*		
Oligodendrogliome anaplasique			*	
Tumeurs oligoastrocytaires ou mixtes	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
Oligoastrocytome		*		
Oligoastrocytome anaplasique			*	

Tableau 1 : Classification des gliomes selon l’OMS 2007. D’après (Louis et al., 2007).

Cependant, la classification de l’OMS, reposant sur des critères subjectifs exclusivement morphologiques, manque de reproductibilité (Coons et al., 1997; Figarella-Branger and Bouvier, 2005; Mittler et al., 1996). De plus, elle ne tient pas compte des données cliniques et de l’imagerie. Bien que la classification proposée par l’hôpital Sainte-Anne depuis 1987 (Daumas-Duport et al., 1987) résulte de biopsies corrélées à l’imagerie (IRM ou scanner), elle n’a pas été reconnue par la communauté scientifique. La découverte d’altérations génétiques et chromosomiques distinctes selon le type de gliomes, a nécessité la considération des données moléculaires dans la classification, afin d’optimiser la prise en

charge thérapeutique (Figarella-Branger et al., 2008). De nombreuses recherches géniques ont été menées et une classification moléculaire des gliomes a été proposée en 2001 (Louis et al., 2001).

I.5. Altérations génétiques, chromosomiques et épigénétiques dans les gliomes

Les altérations génétiques correspondent le plus souvent à des mutations « gain de fonction » des récepteurs à activité tyrosine-kinase (oncogènes), des mutations « perte de fonction » de gènes suppresseurs de tumeurs, ainsi que plusieurs types de délétions chromosomiques.

Brièvement, les altérations génétiques aboutissent à :

- des activations de voies de transduction du signal. L'expression de facteurs de croissance (FGF, CNTF, EGF, PDGF) et de leurs récepteurs est souvent augmentée dans les gliomes (Ekstrand et al., 1991; Fleming et al., 1992; Morrison et al., 1994; Weis et al., 1999; Wong et al., 1992; Yamaguchi et al., 1994). Les voies PI3k/Akt et RAS/MAP kinases sont activées. La protéine PTEN, qui normalement régule négativement Akt, est souvent anormale ou absente dans les glioblastomes (Baeza et al., 2003; Li et al., 1997). Cela aboutit d'une part à l'augmentation du métabolisme et de la prolifération cellulaire et d'autre part à l'inhibition de la mort apoptotique.

- des dérégulations du cycle cellulaire. Les deux voies principales régulant le cycle cellulaire (p16INK4A-CDK4-RB et p14ARF-MDM2-p53) sont touchées par des délétions du locus CDKN2A dans près de 60% des glioblastomes (Ueki et al., 1996), conduisant à une forte activation du cycle cellulaire.

Il est à signaler que d'autres catégories de gènes peuvent être touchées dans le glioblastome. On peut citer des gènes de la matrice extracellulaire comme le COL1A1, favorisant ainsi l'invasion des cellules cancéreuses (Balbous et al., 2014). Les anomalies peuvent également modifier un chromosome entier ou une grande partie de ce dernier, on parle d'altérations chromosomiques. Elles ont été essentiellement mises en évidence par des techniques classiques de cytogénétique, de FISH, de LOH ou encore de CGH-array (Figarella-Branger et al., 2008). Les altérations les plus fréquentes portent sur la perte du chromosome 10 dans sa totalité ou de certaines de ses régions (Ohgaki and Kleihues, 2007), du bras court du chromosome 1 (1p) et du 19q et celle du bras long du chromosome 22 (22q). On peut observer également une duplication du chromosome 7 qui est responsable d'une polysomie 7 à différencier d'une amplification d'EGFR (Griffin et al., 2006; Jenkins et

al., 2006). Toutefois toutes les anomalies chromosomiques n'ont pas encore été identifiées ; parmi elles se trouvent certainement des gènes suppresseurs de tumeurs.

II. Le glioblastome

II.1. Epidémiologie et pathogenèse

Selon la classification de l'OMS, le glioblastome (GBM) est une tumeur astrocytaire maligne de grade IV. Il s'agit de la tumeur primitive du cerveau la plus fréquente et la plus agressive (Louis et al., 2007). Elle représente 60 à 70% des tumeurs gliales, 52% des tumeurs cérébrales primitives et 20% de l'ensemble des tumeurs intra-crâniennes (Wen and Kesari, 2008). Cette pathologie représente 2 à 3 cas pour 100 000 habitants (Polivka et al., 2014). La survie médiane est de 6 à 9 mois avec traitement palliatif, de 12 mois avec radiothérapie et de 16 mois avec radio- et chimiothérapie. La survie post-opératoire varie de 12 mois (50 %) à 24 mois (20 %) et n'atteint 36 mois que dans 2 % des cas. Le GBM survient à tout âge (Sturm et al., 2014), mais 70% des cas apparaissent entre 45 et 70 ans (Hablützel and Schweiz, 2009). Entre 45 et 50 ans, ce sont souvent des glioblastomes secondaires, qui se développent à partir de gliomes de bas grade (astrocytome) et entre 50 et 70 ans des glioblastomes primaires (de novo). Le GBM est la deuxième cause de mortalité par cancer chez l'enfant après la leucémie et la troisième chez l'adulte. Le décès est habituellement dû à un œdème cérébral qui entraîne une augmentation de la pression intra-crânienne, puis une altération de la vigilance (Hablützel and Schweiz, 2009)

Ces tumeurs sont caractérisées par la présence de petites zones de tissu nécrosé entourées de cellules hautement anaplasiques. Elles peuvent se former dans la matière grise ou la matière blanche du cerveau, mais la plupart d'entre elles se forment au plus profond de la matière blanche, au niveau des hémisphères cérébraux (Figure 1) et infiltrent rapidement le cerveau. Ce sont des lésions volumineuses, profondes, par conséquent souvent inopérables (<http://gfme.free.fr/maladie/glioblastome.html>).



Figure 1 : Glioblastome multiforme observé par IRM au niveau du lobe temporal.

Le glioblastome infiltre la matière blanche au niveau des hémisphères cérébraux. D'après <http://emedicine.medscape.com/article/283252-overview>.

Ces pathologies sont également appelées GBM multiformes en raison de la présence, au sein d'une même masse tumorale, de différentes sous-populations cellulaires. Les morphologies variées (Louis et al., 2007) et les différentes altérations génétiques (Jung et al., 1999) favorisent la croissance tumorale, la progression et la résistance aux traitements (Marusyk and Polyak, 2010).

Les causes de cette maladie sont encore largement méconnues avec des suspicions de prédispositions génétiques et/ou une origine virale périnatale. Cette dernière est suspectée du fait qu'un nombre important de patients atteints de glioblastome (40%) sont nés en hiver (Glioblastoma Association, Michèle Esnault). Quant aux prédispositions génétiques, il a été montré que des mutations des gènes MMR (MisMatch Repair) confèrent un risque accru de tumeurs du système nerveux central (Leung et al., 1998).

II.2. Glioblastomes primaires et secondaires

Ces tumeurs peuvent apparaître « de novo » et évoluer rapidement sans aucune lésion préalable, on parle de GBM primaires. Elles peuvent aussi se développer lentement (5 à 10 ans) à partir d'un astrocytome de bas grade (Grade II ou III), on parle de GBM secondaires (Scherer, 1940). Les GBM primaires représentent plus de 90% de ces tumeurs. Ils se développent le plus souvent chez des sujets âgés de plus de 60 ans et se caractérisent par une histoire clinique courte (environ 1 an après diagnostic) (Ohgaki and Kleihues, 2007). Les GBM secondaires sont rares (10% d'entre eux), ils surviennent chez des sujets plus jeunes (en moyenne 45 ans). Ils se caractérisent par une histoire clinique plus longue et ont un meilleur pronostic que les GBM primaires (Ohgaki and Kleihues, 2007).

Ces 2 types de GBM sont morphologiquement similaires. Cependant, des études moléculaires (dont la première était celle de Watanabe et al., 1996) ont prouvé que les

anomalies génétiques ne sont pas identiques entre GBM primaire et secondaire. Cela a permis leur classification moléculaire par le programme « The Cancer Genome Atlas » (Cancer Genome Atlas Network, 2008 ; Parsons et al., 2008). Elle oppose les GBM primaires aux GBM secondaires, soulignant ainsi l'existence de deux voies génétiquement différentes de développement et de progression (von Deimling et al., 1993; Lang et al., 1994) (Figure 2).

II.3. Altérations moléculaires caractéristiques des GBM

C'est la survenue de différentes altérations moléculaires qui marque l'évolution des gliomes de bas grade en GBM secondaires, ainsi que l'apparition des GBM primaires (Figure 2).

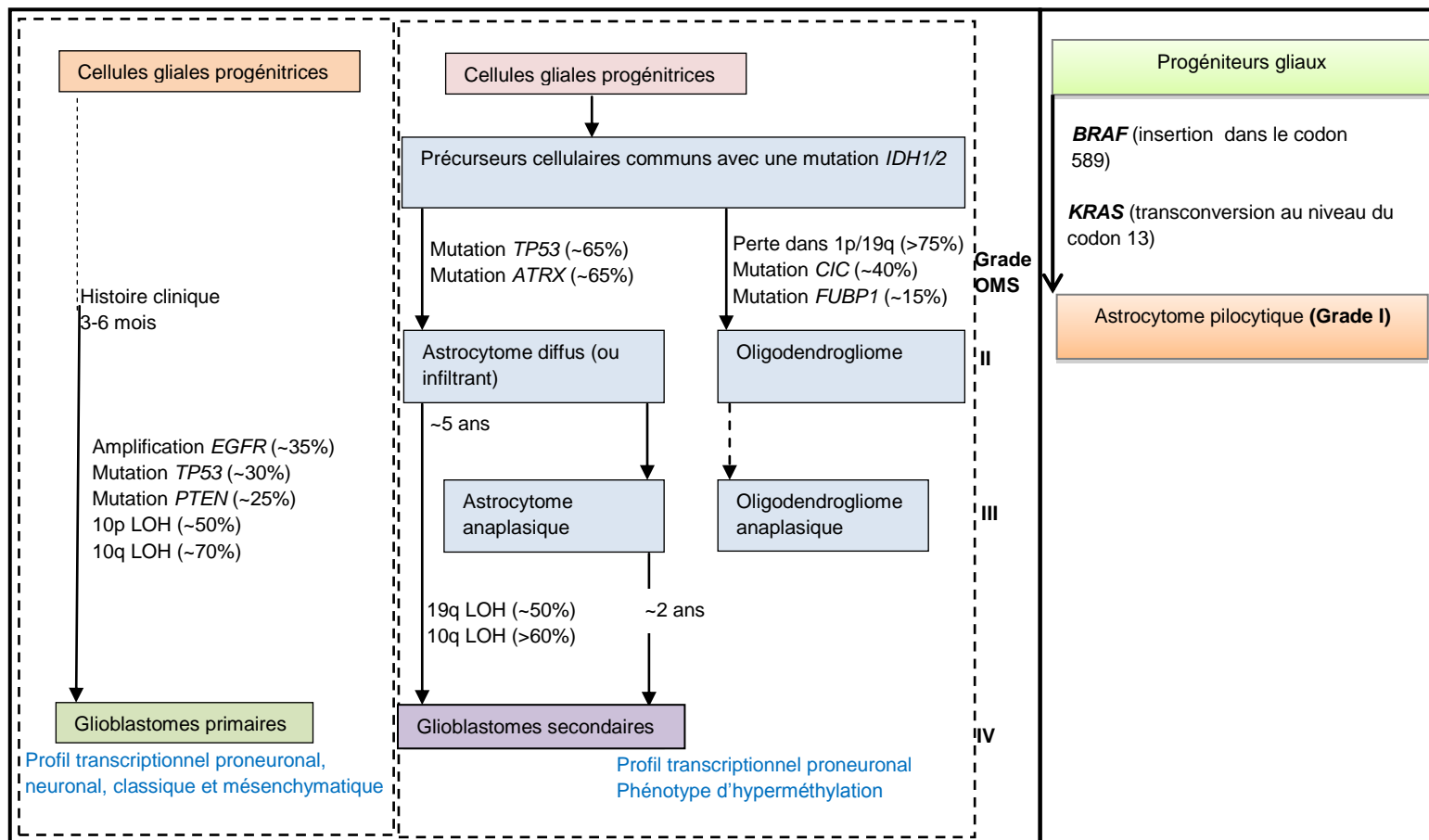


Figure 2 : Modèle hypothétique montrant les différents types d'altérations génétiques aboutissant à l'apparition du glioblastome primaire et à l'évolution de tumeurs gliales de bas grade vers un glioblastome secondaire.

Les astrocytomes pilocytiques de grade I résulteraient d'une insertion au niveau de *BRAF* ou d'une substitution au niveau de *KRAS*. Adapté d'après Ohgaki and Kleihues, 2012 (partie gauche du schéma) et Riemenschneider et al., 2013 ; Lewandowska et al., 2014 (partie droite). *TP53* : gène codant la p53, *ATRX* : gène codant le régulateur transcriptionnel ATRX, *CIC* : gène codant le répresseur transcriptionnel CIC (CapICua homolog), *FUBP1* : gène codant FUBP1 (Far Upstream Binding Protein 1) qui stimule l'expression de c-myc, LOH : perte d'hétérozygotie.

Les GBM primaires se caractérisent essentiellement par une amplification de l'*EGFR* (36%), une délétion de *p16INK4A* (31 %), une mutation de *PTEN* (25%). En revanche, les mutations de *TP53* sont plus rares (30 %) (Ohgaki et al., 2004; Watanabe et al., 1996). Au contraire, les GBM secondaires se caractérisent avant tout par des mutations de *TP53* (65 % des cas), l'amplification de l'*EGFR* étant plus rare (8%) de même que la délétion de *p16INK4* (19 %) et la mutation de *PTEN* (4 %). La monosomie 10 est observée dans près de 70 % des glioblastomes, qu'ils soient primaires ou secondaires (Ohgaki and Kleihues, 2007). Cette monosomie peut toucher le chromosome 10 entier ou uniquement le bras long (Loss Of Heterozygosity LOH 10q) surtout au niveau des GBM primaires (Fujisawa et al., 2000). D'autres études ont spécifié des régions (loci) particulièrement délétées des bras long et court du chromosome 10. Il existe au moins trois pertes communes aux GBM : LOH 10p14-p15, LOH 10q23-24 (*PTEN*), et LOH 10q25-pter, suggérant ainsi l'existence de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs autres que *PTEN* localisés en 10q (Fults et al., 1998; Ichimura et al., 1998; Rasheed et al., 1995).

Récemment, il a été découvert des modifications génétiques des gènes *IDH*. Ils codent une enzyme du métabolisme cellulaire, l'isocitrate déshydrogénase dont il existe deux isoformes *IDH1* et *IDH2* (codées par les gènes *IDH1* et *IDH2*) respectivement cytosolique et mitochondriale. Elles utilisent le NADP⁺ comme accepteur d'électrons pour produire le NADPH, lui-même utilisé pour la régénération du glutathion réduit, qui protège les cellules contre un stress oxydant (Sanson et al., 2009). Par conséquent, les enzymes *IDH1* et *IDH2* sauvages joueraient un rôle antioxydant.

Les altérations du gène *IDH1* dans les GBM secondaires, mais rarement dans les primaires, a permis de faire la distinction entre ces 2 types de tumeurs (Parsons et al., 2008; Yan et al., 2009). Les mutations *IDH1/IDH2* ont une vraie valeur diagnostique car elles permettent en plus la confirmation d'une tumeur gliale, et la distinction entre ceux de grade II et les astrocytomes pilocytiques (Yan et al., 2009). En effet, ces mutations n'ont été détectées dans aucun astrocytome pilocytique de grade I, suggérant ainsi la formation de ces tumeurs par un autre mécanisme. De plus, comme les néoplasies de grade II, les oligodendrogliomes (grade III) ont souvent une de ces mutations qui précède les mutations de *TP53* ou la codélétion 1p19q (Watanabe et al., 2009). Yan et ses collaborateurs ont suggéré la survenue de cette mutation très précocement au niveau d'une cellule souche. Elle pourrait également apparaître à partir d'un précurseur glial (Figarella-Branger et al., 2008), à partir duquel ont émergé les astrocytomes et les oligodendrocytomes. Plus de 70% de gliomes de bas grade possèdent des mutations dans *IDH1* ou *IDH2* (Yan et al., 2009). Par contre, seulement 5% des GBM primaires en sont affectés (Sanson et al., 2009), et 80% de GBM secondaires ont l'*IDH1* muté (Nobusawa et al., 2009).

Bien que les enzymes IDH1 et IDH2 sauvages aient un rôle antioxydant, des mutations dans leurs gènes sont considérées comme de bon pronostic. En effet, une surexpression d'IDH1 sauvage induit une résistance au Témzolomide (TMZ, molécule souvent utilisée en chimiothérapie). En revanche, une mutation dans IDH1 provoque un arrêt du cycle cellulaire et une sensibilisation au TMZ (Wang et al., 2014). De plus, les mutations *IDH1* et *IDH2* favorisent l'efficacité de la radiothérapie tout en diminuant la croissance et l'invasion cellulaires (Li et al., 2013). Tous ces résultats confirment l'importance des mutations *IDH1/IDH2* dans le diagnostic, le pronostic et le traitement des GBM.

II.4. Caractéristiques histologiques des glioblastomes

Lors de la classification des gliomes, les données histologiques ont été les premières à être prises en compte. En effet, chaque type présente des caractéristiques histologiques qui lui sont propres. Par exemple, ceux de bas grade, les astrocytomes pilocytiques, ne sont constitués que de tissu tumoral, tandis que les GBM évolués sont constitués de deux zones tumorales distinctes :

- Celle présentant une très forte densité cellulaire associée à des atypies nucléaires et un index mitotique élevé. Le tissu n'est constitué que de cellules tumorales avec la présence de vaisseaux sanguins néoformés (micro angiogenèse).
- Celle où les cellules isolées envahissent le parenchyme qui reste morphologiquement et fonctionnellement intact. Il n'est pas observé de micro-angiogenèse (Figarella-Branger et Bouvier, 2005). Les cellules isolées reflètent le caractère infiltrant des GBM et sont caractérisées par des noyaux atypiques et allongés (Figarella-Branger et al., 2008).

Les GBM se distinguent des astrocytomes de grade III par la présence de zones de nécrose entourées par des cellules hautement anaplasiques (Figarella-Branger et al., 2008). Ces plages de nécrose, ainsi que les « palissades périnécrotiques » (« mur cellulaire » entourant la zone de nécrose tissulaire) correspondent à des régions hypoxiques (Figure 3).

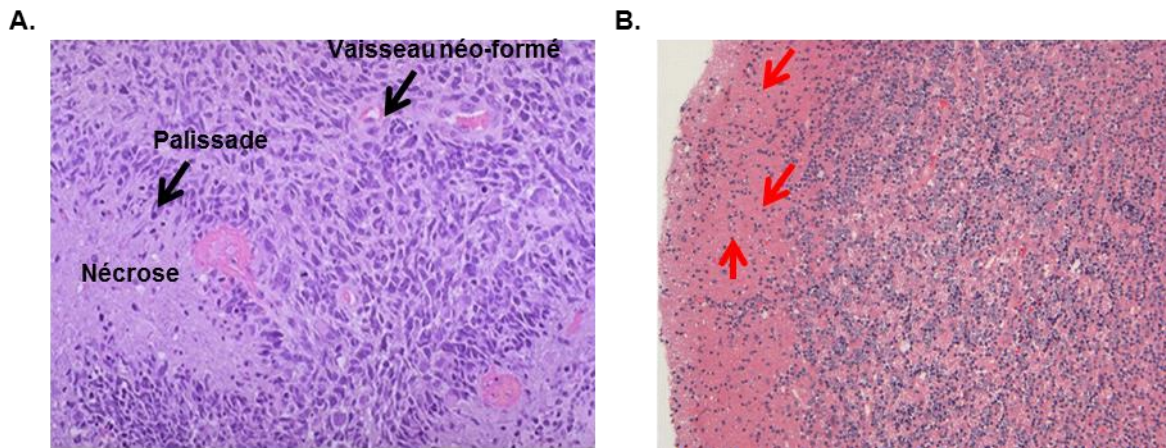


Figure 3 : Aspects histologiques du GBM.

A. Plage de nécrose entourée par des cellules en palissades et présence de petits vaisseaux néo-formés. B. Des cellules de GBM isolées (flèches rouges) infiltrent le parenchyme cérébral. D'après Pathology Outlines.com (A).

II.5. Traitements :

Dans une première approche, si la tumeur n'est pas localisée dans des zones fonctionnelles, le traitement des GBM est chirurgical. Il s'agit d'une exérèse la plus complète possible, ou partielle, car cette tumeur est infiltrante et difficile à prélever en totalité. C'est ce qui explique qu'une radiothérapie post-opératoire est réalisée sur le site de la tumeur, ainsi que sur une marge de 2cm dans tous les plans de l'espace. Si sa localisation ne permet pas de l'extraire, une biopsie stéréotaxique est alors réalisée. La stratégie thérapeutique repose sur une radiochimiothérapie concomitante suivie d'une chimiothérapie au Témzolomide (TMZ, Temodal®), selon le protocole de Stupp (Stupp et al., 2005). L'ajout de cette molécule pendant toute la durée de la radiothérapie des patients nouvellement diagnostiqués, suivi d'une administration adjuvante, a significativement augmenté leur survie moyenne, avec une toxicité minimale (Stupp et al., 2005). Le TMZ est un agent alkylant capable de traverser facilement la barrière hémato-méningée ; en France il est prescrit depuis l'an 2000 (Glioblastoma Association, Michèle Esnault).

Il existe actuellement d'autres traitements en phase d'essais cliniques ciblant les altérations génétiques de ces tumeurs, tels que l'inhibition de l'EGFR amplifié ou anormal (issu d'un gène *EGFR* muté), par l'administration du Gefitinib® ou Erlotinib® (Gallego et al., 2014). Des traitements anti-angiogéniques sont également en cours d'essais cliniques, tels que le Bevacizumab ou Avastin®, qui correspond à un anticorps monoclonal de type IgG1 inhibant l'action du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Noda et al., 2009b).

2ème partie : L'hypoxie

Le terme « hypoxie » désigne une faible pression partielle en dioxygène ($1 < pO_2 < 10$ mmHg). Elle correspond donc à une limitation de la disponibilité en dioxygène. Elle est présente dans de nombreuses pathologies (Hockel and Vaupel, 2001), telles que les ischémies cérébrales et cardiovasculaires, le diabète, l'athérosclérose. L'hypoxie est également présente dans les cancers solides en particulier dans les tumeurs cérébrales comme les glioblastomes. Au sein de ces tumeurs, le pourcentage de dioxygène est situé à 1 % (Adam et al., 1999).

Dans ce type de tumeurs, les zones d'hypoxie peuvent s'expliquer de différentes manières. Tout d'abord, la prolifération anarchique des cellules cancéreuses aboutit à la production de cellules éloignées des vaisseaux sanguins, source de dioxygène. Au fur et à mesure de leur éloignement, la concentration de dioxygène diminue progressivement, favorisant ainsi la formation de zones hypoxiques. Les cellules cancéreuses vont pallier cette faible pression partielle de dioxygène dans leur environnement, en stimulant la néovascularisation (à partir de vaisseaux sanguins pré-existants). En effet, les cellules hypoxiques sécrètent le VEGF. Après fixation sur son récepteur à la surface des cellules endothéliales, il induit la prolifération du foyer tumoral (Ferrara, 2002). Cela favorise la survie des cellules tumorales par rétablissement de l'apport nécessaire en dioxygène et en nutriments. Ceci induit également leur dissémination dans l'organisme via les vaisseaux sanguins néo-formés rendus perméables par l'action du VEGF (Box et al., 2010). Néanmoins, ce réseau vasculaire tumoral peut en retour contribuer à la formation de zones hypoxiques. En effet, la néovascularisation donne naissance à des vaisseaux ou capillaires anormaux, trop petits, des occlusions ou encore des bifurcations artérioveineux (vascularisation imparfaite, Figure 4) (Shchors and Evan, 2007). La conséquence est un apport en dioxygène insuffisant qui entretient les zones hypoxiques, entraînant une pression de sélection qui favorise les cellules hautement agressives. En effet, les cellules résistantes à l'hypoxie déclenchent des voies de signalisation très conservées pour résister au stress. Celles-ci permettent non seulement de s'adapter à la faible oxygénation (Papandreou et al., 2005), mais également de résister aux thérapeutiques anti-cancéreuses (Wouters and Brown, 1997 ; Kaur et al., 2005). Ces éléments expliquent l'intérêt d'étudier les phénomènes d'hypoxie pour espérer améliorer l'effet des traitements anti-cancéreux.

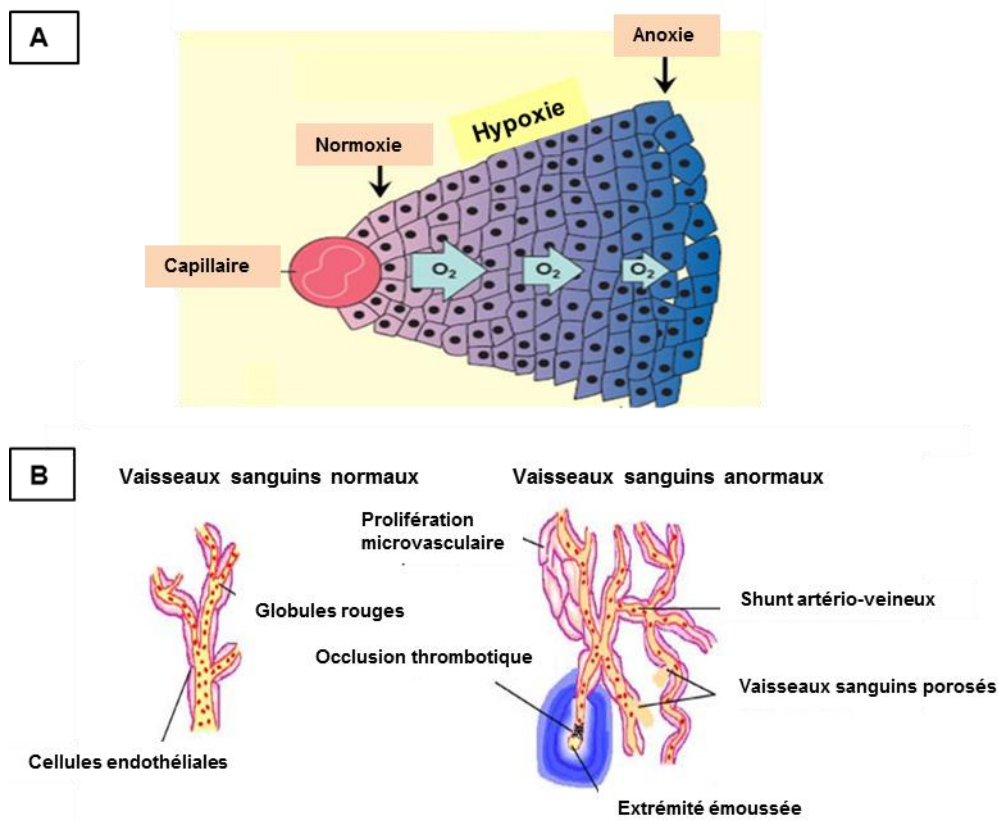


Figure 4 : Origine de l'hypoxie au sein des tumeurs.

A) En proliférant, les cellules s'éloignent des vaisseaux sanguins, ceci est corrélé à une diminution en pression partielle de l'O₂. Les cellules les proches des vaisseaux ont accès à l'O₂ tandis que les cellules les plus éloignées en sont dépourvues et subissent l'hypoxie ($1 < pO_2 < 5$) voire même l'anoxie ($pO_2 < 0,1\%$). B) La prolifération accrue des cellules cancéreuses déclenche la vascularisation qui, dans la plupart des cas, est imparfaite, et aboutit à une insuffisance en apport en O₂. Cela entretient la formation de zones d'hypoxie. Adapté d'après Kaur et al., 2005.

I. Le facteur inductible par l'hypoxie, Hypoxia Inducible Factor 1 : HIF-1

La réponse et l'adaptation des cellules à l'hypoxie sont contrôlées par des facteurs de transcription activés par une faible pression partielle en O₂. Le facteur de transcription le plus important dans le contrôle de cette homéostasie est le facteur inductible par l'hypoxie ou HIF-1, encore appelé « facteur de l'hypoxie ». Il a été identifié pour la première fois en 1988 par Goldberg et ses collaborateurs comme étant un régulateur de l'hypoxie. Sa caractérisation historique concerne la régulation du gène de l'érythropoïétine en réponse à une faible concentration en O₂, afin de déclencher la prolifération érythrocytaire (Goldberg et al., 1988).

I.1. Structure de HIF-1

HIF-1 est une protéine hétérodimérique composée des sous-unités α (826 acides aminés) et β (789 acides aminés), elle est aussi appelée ARNT ou récepteur aryl-hydrocarbure translocation nucléaire. Les deux sous-unités α et β de HIF-1 présentent des homologies de séquences et de domaines structuraux. Cependant, certains de ces derniers sont absents dans la sous-unité β . La régulation de ces deux sous-unités est différente ce qui explique l'absence ou la présence de domaines structuraux distincts (Déry et al., 2005; Zagórska and Dulak, 2004) (Tableau 2).

Motif		Sous-unité de HIF	Fonction	Domaine
bHLH : basic-Helix-loop-helix		HIF-1 α HIF-1 β	b : fixation à l'ADN HLH : dimérisation	N-terminal
PAS: PER-ARNT-SIM motif		HIF-1 α HIF-1 β	Fixation à l'ADN et dimérisation	N-terminal
TAD: transactivation domain	TAD	HIF-1 α HIF-1 β	Dimérisation	C-terminal
	NTAD	HIF-1 α	Dimérisation	N-terminal
	CTAD	HIF-1 α	Dimérisation	C-terminal
ID:		HIF-1 α	Inhibiteur de la transcription	C-terminal entre NTAD et CTAD
ODDD: Oxygen-Dependent Degradation Domain		HIF-1 α	Stabilité de la protéine	C-terminal
NLS-N		HIF-1 α HIF-1 β	Rétention cytoplasmique	N-terminal
NLS-C		HIF-1 α	Import nucléaire	C-terminal

Tableau 2 : Structure des sous unités humaines d'HIF-1.

Les deux sous-unités α et β d'HIF-1 partagent des domaines fonctionnels communs. Cependant, la sous-unité HIF-1 α en présente plusieurs qui lui sont propres, tels qu'ODDD (Oxygen-Dependent Degradation Domain) qui est nécessaire à sa régulation. Tableau adapté d'après Gothié (Gothié 2002).

I.2. Régulation de l'activité de HIF-1

HIF-1 β est constitutivement exprimé indépendamment de la disponibilité en O₂ (Kallio et al., 1997). En revanche, HIF-1 α a un court temps de demi-vie ($t_{1/2} \sim 5$ min) et est hautement régulée par l'O₂ (Salceda and Caro, 1997). Si la production de HIF-1 α est constitutive (Wang et al., 1995; Kallio et al., 1997; Wiesener et al., 1998), elle est rapidement dégradée en normoxie (Wang et al., 1995). A l'inverse, en hypoxie, elle est stabilisée et transférée du cytosol au noyau, où elle se dimérise avec HIF-1 β . C'est le complexe HIF-1 α/β qui devient transcriptionnellement actif (Huang et al., 1996; Kallio et al., 1997). Afin d'induire l'expression génique, il se lie d'une part aux régions régulatrices des gènes cibles au niveau des éléments de réponse à l'hypoxie ou HRE, et d'autre part à des protéines co-activatrices comme le complexe CBP (CREB-binding protein)/p300 (Lando et al., 2002a). Cette stabilisation et activation de HIF-1 α sont étroitement liées aux modifications post-traductionnelles qu'elle subit ainsi qu'à ses interactions avec d'autres protéines (Figure 5). En ce qui concerne les modifications post-traductionnelles, l'hydroxylation de HIF-1 α est la plus importante, mais la protéine peut subir d'autres modifications comme l'acétylation, la phosphorylation et bien d'autres modifications.

1) L'hydroxylation

En condition de normoxie, HIF-1 α cytosolique est rapidement hydroxylée sur deux résidus prolines (402 et 564) située dans le domaine ODD (Srinivas et al., 1999). Cette hydroxylation est réalisée par des prolyl-hydroxylases (PHD : Prolyl Hydroxylase Domain). Cette modification favorise l'interaction de cette sous-unité avec le complexe Ubiquitine E3 ligase pVHL (Von Hippel-Lindau). Ce dernier associe des ubiquitines à HIF-1 α pour être dégradée par le protéasome (Masson et al., 2001; Srinivas et al., 1999). Les prolyl-hydroxylases ont besoin d'O₂ pour remplir leur fonction. Elles requièrent également du 2-oxoglutarate (2-OG) comme substrat et d'ions ferreux (Fe²⁺) et d'ascorbate comme co-facteurs (Schofield and Zhang, 1999). Les PHD sont donc également appelées les dioxygénases dépendantes du 2-oxoglutarate.

Cependant, en hypoxie, le faible taux d'O₂ fait que les prolyl-hydroxylases ne sont plus activées. Les résidus proline de HIF-1 α n'étant plus hydroxylés, cette sous-unité ne sera plus reconnue par pVHL. Ainsi, elle se stabilise, s'accumule et va dans le noyau exercer son rôle de facteur de transcription. Il est à noter que des chélateurs de Fe²⁺ tels que le cobalt (Co²⁺), le nickel (Ni²⁺) et la desferrioxamine (DFO) induisent également la stabilité de HIF-1 α par inhibition des PDH (Masson and Ratcliffe, 2003; Yuan et al., 2003).

L'hydroxylation impacte non seulement la stabilisation de HIF-1 α mais également son activation. En effet, en normoxie, le résidu asparagine 803 du domaine C-TAD de HIF-1 α

peut subir une hydroxylation par un facteur inhibiteur de HIF-1 α ou FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1). Cette hydroxylation empêche l'interaction de HIF-1 α avec le complexe CBP/p300, co-activateur de la transcription (Hewitson et al., 2002; Lando et al., 2002b; Sang et al., 2002). L'hypoxie empêche cette hydroxylation ce qui entraîne l'activation de HIF-1 α (Lando et al., 2002a).

2) L'acétylation

Le résidu Lysine 532 du domaine ODD de HIF-1 α peut être acétylé par une acétyl-transférase appelée ARD1 (arrest-defective-1), ce qui favorise son interaction avec pVHL et donc sa dégradation (Jeong et al., 2002). L'activité acétyl-transférase n'a pas besoin d'O₂, mais les taux d'ARNm et de protéines d'ARD1 chutent en hypoxie, ce qui favorise la stabilisation de HIF-1 α (Jeong et al., 2002).

3) La phosphorylation

HIF-1 α pourrait être phosphorylée par des membres de la famille des MAPK (mitogen-activated protein kinase), tels que p42/44 MAPK (encore appelée ERK) et la p38 MAPK (Richard et al., 1999; Sodhi et al., 2000). Cette phosphorylation n'affecterait à priori pas la stabilité de HIF-1 α , mais uniquement son activité transcriptionnelle (Richard et al., 1999). Ceci pourrait être expliqué par le fait que HIF-1 β se lie préférentiellement à une forme phosphorylée de HIF-1 α (Suzuki et al., 2001). De plus, il a été démontré qu'en hypoxie, l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α /HIF-2 α (HIF-2 est un variant de HIF issu d'un épissage alternatif) nécessite la phosphorylation par ERK ou par p42/p44 MAPK (Conrad et al., 1999; Minet et al., 2000 ; Hofer et al., 2001; Hur et al., 2001).

En revanche, la glycogène synthase kinase 3 β (GSK-3 β) peut phosphoryler le domaine ODD de HIF-1 α , entraînant ainsi une augmentation de sa dégradation protéasome-dépendante (Sodhi et al., 2001).

D'autres modifications post-traductionnelles de HIF-1 α ont également été identifiées. On peut citer la SUMOylation qui régule négativement l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Brahimi-Horn et al., 2005). La S-nitrosation du résidu cystéine 800 de la sous-unité α qui au contraire favorise l'activité transcriptionnelle de HIF-1 via son interaction avec CBP/p300 (Yasinska and Sumbayev, 2003).

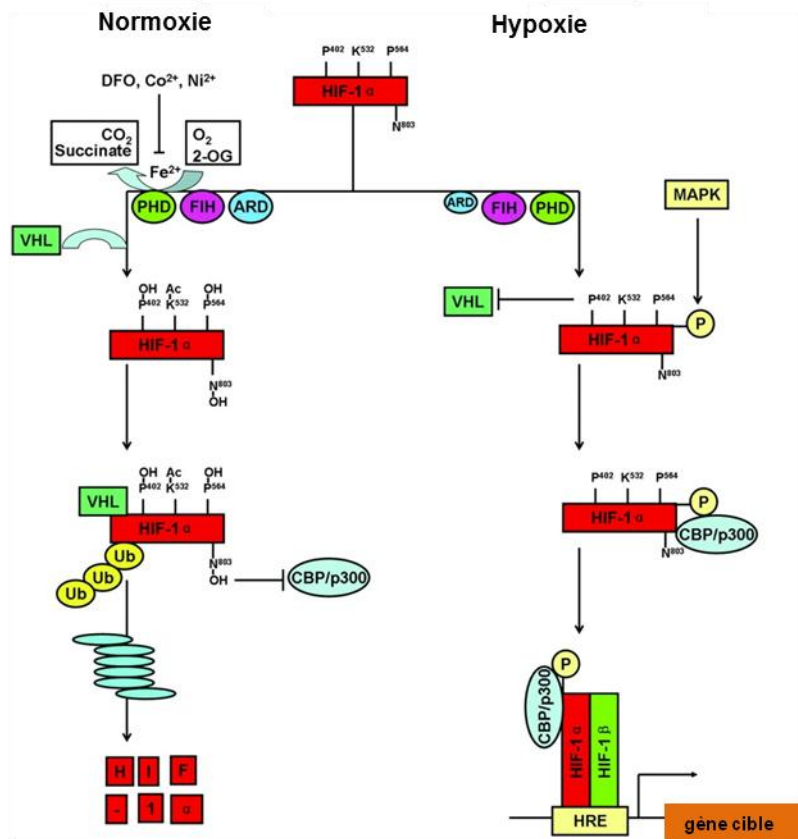


Figure 5 : Régulation de l'activité de HIF-1α.

En normoxie, l'hydroxylation par PHD et l'acétylation par ARD1 du domaine ODD de HIF-1α favorise sa dégradation par le protéasome après reconnaissance par l'ubiquitine E3 ligase pVHL. L'hydroxylation de HIF-1α par FIH-1 empêche son interaction avec son co-activateur, le CBP/p300. En hypoxie, en raison du manque d'O₂, l'activité des PHD et FIH-1 est inhibée et HIF-1α est stabilisée. Elle est ensuite transférée dans le noyau et complexée avec HIF-1β. Cette dernière se lie préférentiellement à une forme phosphorylée de HIF-1α par les MAPK telles que la p42/p44 MAPK ou ERK. HIF-1α non hydroxylée interagit avec CBP/p300 et induit l'expression des gènes cibles. De plus, en hypoxie, ARD1 est moins exprimée, ce qui diminue l'acétylation de HIF-1α et favorise ainsi sa stabilisation. Schéma adapté d'après Ke and Costa, 2006.

I.3. Les gènes cibles de HIF-1

Une fois l'hétérodimère HIF-1α/HIF-1β formé, plusieurs co-activateurs peuvent s'y associer pour cibler et affiner la transcription de gènes particuliers. C'est le cas par exemple de p300/CBP, TIF2 (transcription intermediary factor 2), SRC-1 (steroid receptor co-activators) (Carrero et al., 2000). Le complexe contenant HIF-1 se fixe sur les séquences HRE des gènes cibles et induit leur transcription. A l'heure actuelle, plus d'une centaine de gènes ont été identifiés comme cibles de HIF-1 (Ke and Costa, 2006) (Tableau 3). Quand ils sont exprimés, ces gènes permettent à la cellule de s'adapter à l'hypoxie, en favorisant l'angiogenèse, la survie cellulaire, le métabolisme glucidique et l'invasion tumorale (Semenza, 2013).

Fonction	Gène (abréviation)	Référence
Erythropoïèse/ métabolisme du fer	Erythropoietin (EPO)	(Semenza et al., 1991)
	Transferrin (Tf)	(Rolfs et al., 1997)
	Transferrin receptor (Tfr)	(Bianchi et al., 1999)
	Ceruloplasmin	(Lok and Ponka, 1999)
Angiogenèse	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	(Levy et al., 1995)
	Endocrine-gland-derived VEGF (EG-VEGF)	(LeCouter et al., 2001)
	Leptin (LEP)	(Grosfeld et al., 2002)
	Transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3)	(Scheid et al., 2002)
Tonus vasculaire	Nitric oxide synthase (NOS2)	(Melillo et al., 1995)
	Heme oxygenase 1	(Lee et al., 1997)
	Endothelin 1 (ET1)	(Hu et al., 1998)
	Adrenomedulin (ADM)	(Nguyen and Claycomb, 1999)
	α_{1B} -Adrenergic receptor	(Eckhart et al., 1997)
Matrice extra-cellulaire	Matrix metalloproteinases (MMPs)	(Ben-Yosef et al., 2002)
	Plasminogen activator receptors and inhibitors (PAIs)	(Kietzmann et al., 1999)
	Collagen prolyl hydroxylase	(Takahashi et al., 2000)
Métabolisme glucidique	Adenylate kinase-3	(O'Rourke et al., 1996)
	Aldolase-A,C (ALDA,C)	(Semenza et al., 1996)
	Carbonic anhydrase-9	(Wykoff et al., 2000)
	Enolase-1 (ENO1)	(Semenza et al., 1996)
	Glucose transporter-1,3 (GLUT1,3)	(Chen et al., 2001)
	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH)	(Graven et al., 1999)
	Hexokinase 1,2 (HK1,2)	(Mathupala et al., 2001)

	Lactate dehydrogenase-A (LDHA)	(Semenza et al., 1996)
	Pyruvate kinase M (PKM)	(Semenza et al., 1994)
	Phosphofructokinase L (PFKL)	(Semenza et al., 1994)
	Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)	(Semenza et al., 1994)
	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphate-3 (PFKFB3)	(Minchenko et al., 2002)
Prolifération cellulaire/Survie	Insulin-like growth factor-2 (IGF2)	(Feldser et al., 1999)
	Transforming growth factor- α (TGF- α)	(Krishnamachary et al., 2003)
	Adrenomedullin (ADM)	(Cormier-Regard et al., 1998)

Tableau 3 : Principaux gènes cibles du facteur de transcription HIF-1. Tableau adapté d'après Ke and Costa, 2006.

Bien que la majorité des gènes cibles de HIF-1 permettent aux cellules tumorales hypoxiques de s'adapter et survivre (progression tumorale), une hypoxie sévère ou prolongée peut également conduire à la mort cellulaire (régression tumorale) (Azad and Gibson, 2010). Les mécanismes précis l'induisant ne sont pas encore bien déterminés. En particulier il a été rapporté que les trois types de mort cellulaires pourraient intervenir : l'apoptose, la nécrose et la mort autophagique. Dans ce contexte, une protéine cible de HIF-1, synthétisée en situation hypoxique, pourrait jouer un rôle d'aiguilleur de signalisation. Il s'agit de BNIP3 (Bcl-2/E1B-19K-interacting protein 3), appartenant à la famille Bcl-2 (B Cell Lymphoma 2). Il a été montré que le stress hypoxique favorise la formation et l'insertion d'homodimères de BNIP3 dans l'enveloppe mitochondriale (Figure 6) (Chinnadurai et al., 2008). Ceci conduit à la chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_{mt}$) et à la génération d'espèces actives de l' O_2 . Suite au collapse du $\Delta\Psi_{mt}$, les trois types de signalisation semblent être activés. On peut observer une apoptose dépendante de Bax (BCL-2-Associated X protein)/Bak (BCL-2-homologous Antagonist Killer), une autophagie par libération de Beclin-1 du complexe Bcl-2/Bcl-xL (B-cell Lymphoma-extra large) mais aussi probablement une nécrose. L'autophagie induite par BNIP3 pourrait conduire à la survie ou à la mort cellulaire.

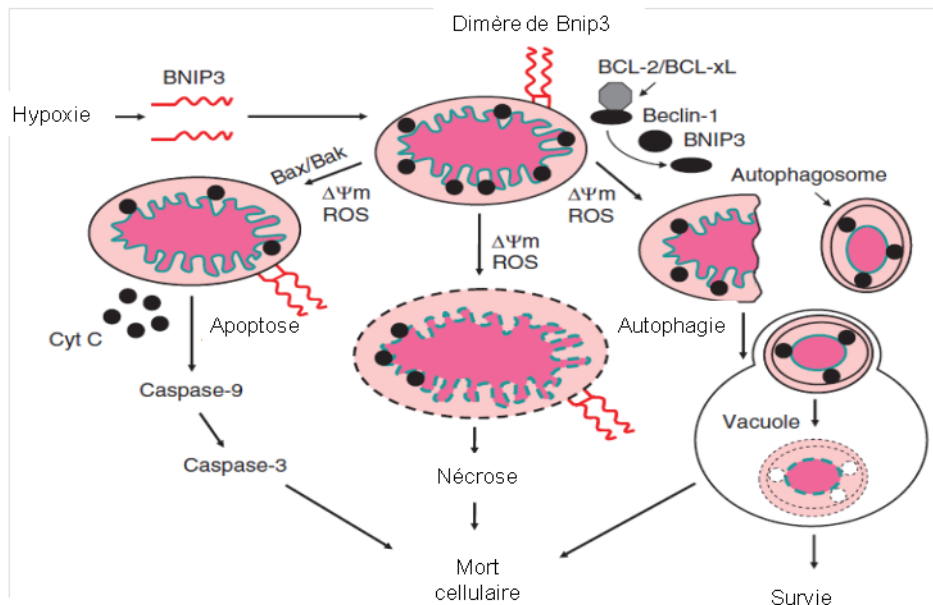


Figure 6 : Modèle de mort cellulaire contrôlée par BNIP3.

L'hypoxie induit une expression de BNIP3 qui va s'homodimériser et s'insérer dans la membrane externe mitochondriale. Ceci conduit soit à une mort apoptotique ou nécrotique, soit à de l'autophagie conduisant à la survie ou à la mort. $\Delta\Psi_m$: variation du potentiel mitochondrial membranaire, ROS : espèce réactive de l'O₂, Cyt C : Cytochrome C. Schéma adapté d'après Chinnadurai et al, 2008.

I.4. Rôle de HIF-1

L'hypoxie est un phénomène qui intervient comme régulateur d'un grand nombre de processus biologiques. Par exemple, elle peut favoriser le développement embryonnaire et remplir alors un rôle physiologique, mais elle peut également être impliquée dans de multiples pathologies, y compris le cancer.

1) HIF-1 et cancer

De nombreux cancers présentent une surexpression de HIF-1 α et HIF-2 α (Talks et al., 2000; Zhong et al., 1999). En effet, une masse tumorale devient progressivement hypoxique au fur et à mesure qu'elle augmente en taille (Ke and Costa, 2006). Des études d'immunohistochimie ont montré une surexpression de HIF-1 α dans les tumeurs métastatiques, alors qu'elle était juste détectable dans les tumeurs bénignes et absente des tissus sains (Harris, 2002; Zhong et al., 1999). De plus, l'injection de cellules HIF-1 α positives favorise la tumorigenèse en induisant l'angiogenèse et la croissance tumorale chez des souris immunodéprimées (Maxwell et al., 1997; Ryan et al., 2000).

Divers mécanismes peuvent activer HIF-1 au cours de la pathogenèse tumorale. En premier lieu se situe la capacité élevée de prolifération des cellules tumorales, entraînant l'apparition rapide de régions hypoxiques. Cette privation de dioxygène favorise la stabilisation et l'activation de HIF-1 α , permettant aux cellules cancéreuses de s'adapter aux

conditions hypoxiques. Cet effet est observé via l'activation du VEGF aboutissant à la néo-vascularisation des cellules tumorales, qui auront ainsi une capacité supplémentaire de prolifération. HIF-1 est également capable d'induire une expression de facteurs de croissance comme BDNF dans le neuroblastome (Nakamura et al., 2006). Ce facteur stimule l'angiogenèse par une augmentation de l'expression du VEGFR suite à sa fixation sur des cellules endothéliales exprimant TrkB (Kermani et al., 2005). Le NGF stimule également l'angiogenèse au niveau de neurones normaux, via une induction de HIF-1 α (Calza et al., 2001). Cette expression des facteurs trophiques et de leurs récepteurs conduit à une régulation autocrine de la prolifération cellulaire.

HIF-1 est également impliqué dans le contrôle de voies métaboliques, puisqu'il favorise l'expression de transporteurs membranaires du glucose comme GLUT1. Cela augmente sa concentration cytoplasmique et le rendement énergétique de la glycolyse comme mécanisme adaptatif à l'anaérobiose (Tanaka et al., 2006). Par ailleurs, cette « hypercaptation » de glucose est nécessaire à la mise en place de l'effet Warburg, qui est considéré comme une signature quasi constante des cancers. Cette caractéristique constitue d'ailleurs la base de l'utilisation du TEP / 18F-deoxyglucose (FDG) pour l'évaluation *in vivo* de la captation de glucose. Elle est utilisée en oncologie dans le diagnostic et le suivi de nombreux cancers.

En conditions normales d'oxygénation, certaines altérations génétiques activant des oncogènes ou inhibant des suppresseurs de tumeurs peuvent également contribuer à la stabilisation et à l'activation de HIF-1 α . En effet, la mutation « perte de fonction de VHL » aboutit à une expression constitutive de HIF-1 (Iliopoulos et al., 1996). De plus, la mutation « perte de fonction » de p53 augmente l'expression et l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α dans les tumeurs. En effet, la p53 sauvage favorise la dégradation de HIF-1 α par le protéasome suite à une ubiquitinylation par Mdm2 (Ravi et al., 2000). De plus, elle entre en compétition avec HIF-1 α pour la liaison à des co-activateurs tels que CBP/p300 (Schmid et al., 2004). Le gène *PTEN*, suppresseur de tumeur, très souvent muté dans les glioblastomes (Roux, 1999), inhibe normalement l'expression de HIF-1 α , probablement par l'inhibition de la voie PI3K/AKT. Or, sa perte de fonction résulte en une production protéique accrue de HIF-1 α (Zundel et al., 2000). Enfin, l'amplification de l'*EGFR*, rencontrée dans près de 40% des GBM (Burger et al., 2001), peut, même en cas de tumeurs non hypoxiques, induire et activer HIF-1, conduisant ainsi à la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose (Peng et al., 2006).

2) HIF-1 et thérapies anti-cancéreuses

Dans plusieurs études HIF1 est inhibé, directement ou indirectement, en ciblant les voies de signalisation qui l'activent. La transfection de cellules cancéreuses pancréatiques

par un dominant négatif de la sous-unité HIF-1 α a diminué leur tumorigénicité par l'inhibition de l'effet Warburg et la sensibilisation à l'apoptose et à l'arrêt de prolifération (Chen et al., 2003). De plus, la transfection des cellules de souris avec un polypeptide entrant en compétition avec HIF-1 α pour sa liaison avec CBP/p300, diminue l'expression de gènes inductibles par l'hypoxie tels que le *VEGF*, diminuant ainsi la croissance tumorale (Kung et al., 2000).

Plusieurs nouveaux agents thérapeutiques ont été rapportés comme ayant pu bloquer les fonctions de HIF-1 et en particulier ses effets pro-angiogéniques (Harris, 2002). D'autres molécules (Tableau 4) ciblent essentiellement les voies de prolifération (Ke and Costa, 2006).

Molécule et nom commercial éventuel	Cible inhibée
Trastuzumab (Herceptin®)	Protéines HER2
Gefitinib (Iressa®)	EGFR
Calphostine C	Protéine kinase C
Wortmannine et le LY294002	PI3K
PD98095	MAPK
Rapamycin	mTOR
Iodium diphénylène	Signal redox
Mannoheptulose	Glucokinase

Tableau 4 : Liste des agents thérapeutiques capables de bloquer HIF-1. Adapté d'après Ke and Costa, 2006.

3^{ème} partie : L'autophagie

Ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées à la réponse autophagique en cas de stress hypoxique. En effet, ce mécanisme d'adaptation permet la survie notamment des cellules saines ou cancéreuses. Pour ces dernières, les conditions hypoxiques favorisent l'induction de cette signalisation (Hu et al., 2012; Frieboes et al., 2014). Toutefois elle peut également dans certaines conditions provoquer leur mort (Azad et al., 2008).

L'autophagie, qui signifie littéralement « se manger soi-même », est un mécanisme catabolique hautement conservé au cours de l'évolution. En effet, elle est retrouvée chez la levure, les plantes, les vers, la mouche, la souris et l'homme (Levine and Yuan, 2005). A l'heure actuelle, ce processus constitue un des intérêts scientifiques majeurs. En effet, le nombre de publications contenant ce mot clé a fortement augmenté depuis une dizaine d'années (Klionsky, 2007).

A côté du protéasome, qui dégrade essentiellement des protéines à courte durée de vie, l'autophagie porte sur la destruction, via les lysosomes, des organites altérés ainsi que des protéines mal repliées ou à longue durée de vie. Elle est sollicitée lors d'un stress nutritif ou oxydant. Ceci aboutit à de nouveaux précurseurs en acides aminés et acides gras, ainsi que de l'ATP, assurant ainsi l'homéostasie et la survie cellulaire (Codogno and Meijer, 2005). Cependant, des réparations insuffisantes ou un stress important peuvent conduire à la mort cellulaire, on parle de la mort autophagique.

I. Les différents types de l'autophagie

I.1. La microautophagie

La microautophagie est un processus constitutif indépendant de stress physiologique. Il s'agit de la pénétration directe de molécules cytosoliques dans les lysosomes par invagination de la membrane (Kunz et al., 2004). Une forme particulière de la microautophagie est la micropexophagie, qui correspond à la dégradation des peroxisomes par microautophagie (Tuttle et al., 1993). Un mécanisme similaire a été décrit pour la dégradation de composants nucléaires non essentiels au niveau des points de jonction entre la vacuole de dégradation et le noyau chez la levure, il s'agit de la microautophagie fragmentaire du noyau ou PMN (Piecemeal Microautophagy of the Nucleus) (Roberts et al., 2003) (Figure 7).

I.2. La macroautophagie

La macroautophagie constitue la voie majeure de recyclage des composants cytosoliques par la voie lysosomale. C'est la forme prédominante étudiée dans ce travail : dans la suite de ce manuscrit, le terme « autophagie » fera référence à la macroautophagie.

Elle apparaît à partir de membranes isolées (ou phagophore) qui vont se réarranger de façon dynamique. Cela va aboutir à une structure en double membrane appelée autophagosome (Juhász and Neufeld, 2006) pouvant englober une partie du cytoplasme. A la fin du processus, l'autophagosome fusionne avec un lysosome pour former l'autophagolysosome où le matériel séquestré sera dégradé par les hydrolases acides des lysosomes (Levine and Klionsky, 2004). Les produits de dégradation serviront de précurseurs métaboliques après leur libération dans le cytosol par des perméases membranaires. Ce processus est orchestré par des gènes de la famille *ATG* (Autophagy related Genes) et des protéines Atg (Klionsky et al., 2003) (Figure 7).

Bien que la macroautophagie ait initialement été décrite comme non-sélective en séquestrant de nombreux éléments du cytoplasme, il semble qu'elle puisse intervenir de manière sélective. En effet, il a été mis évidence par microscopie électronique des compartiments cytoplasmiques exclusifs dans les autophagosomes et des protéines intervenant dans l'orientation et la sélectivité de ce mécanisme. À partir de ces observations, différentes dénominations ont été données, précisant la nature des éléments dégradés (Tableau 5).

Nom	Organites ou types de cellules	Organisme	Références
Pexophagie	Peroxisomes	Levures et mammifères	(Farre, Manjithaya et al. 2008)
Mitophagie	Mitochondries	Levures et mammifères	(Kim, Rodriguez-Enriquez et al. 2007)
Réticulophagie	Réticulum endoplasmique	Levures et mammifères	(Hamasaki, Noda et al. 2005)
Ribophagie	Ribosomes	Levures	(Kraft, Deplazes et al. 2008)
Xénophagie	Bactéries et virus	Mammifères et plantes	(Levine 2005)
Agréphagie	Agrégats protéiques	Levures, Drosophile, nématode et mammifères	(Overbye, Fengsrud et al. 2007)

Tableau 5 : Les différentes dénominations de la macroautophagie, en fonction de la nature des éléments dégradés.

I.3. Autophagie dépendante des chaperonnes

L'autophagie dépendante des chaperonnes ne nécessite pas de vésicule de transport comme observé dans la macroautophagie. Dans ce cas, une protéine mal repliée est complexée avec une chaperonne cytosolique, hsc-73 (heat shock protein-73) et transférée dans le lysosome après avoir lié un récepteur membranaire lysosomal appelé LAMP2a (lysosome-associated membrane protein type 2) (Cuervo et al., 1995; Cuervo and Dice, 2000) (Figure 7).

Pour être reconnue par la chaperonne, la protéine concernée par ce processus doit posséder un motif pentapeptide Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ) (Dice, 1990). Ensuite elle interagit directement avec LAMP2a et la chaperonne qui la « déroulera » pour faciliter son transport dans le lysosome. Cette forme de dégradation sélective se met en place lors de stress métaboliques ou oxydants (Dice, 1990; Dice and Terlecky, 1990; Kiffin et al., 2004).

Une défaillance de ce type d'autophagie est à l'origine de nombreuses pathologies. Par exemple, dans la maladie de Parkinson, la protéine mutante l' α -synucléine, s'associe au lysosome sans être internalisée, ce qui l'accumule dans les corps de Lewy (Alvarez-Erviti et al., 2010; Cuervo et al., 2004).

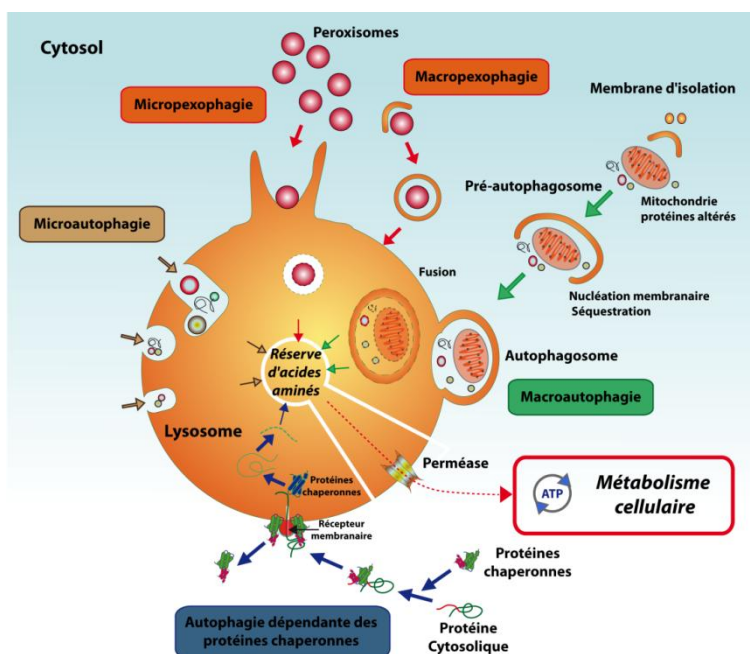


Figure 7 : Les différentes formes d'autophagie.

Il existe 3 formes principales d'autophagie: la microautophagie, la macroautophagie et l'autophagie dépendante des chaperonnes. La microautophagie correspond à la pénétration directe dans les lysosomes de molécules présentes dans le cytosol. L'autophagie dépendante des chaperonnes protéiques nécessite la reconnaissance spécifique par une protéine chaperonne d'un pentapeptide (KFERQ) sur la protéine à dégrader. La macroautophagie, ou autophagie, est la forme majeure de la dégradation lysosomale des protéines à longue durée de vie et des organites intracellulaires. La dégradation du matériel acheminé au lysosome produit un ensemble d'acides aminés réutilisables pour le métabolisme cellulaire. Schéma adapté par T. Naves d'après Cuervo Cuervo et al., 2004.

III. La machinerie moléculaire de l'autophagie

III.1. Les étapes du processus autophagique

Les gènes *ATG* codant les protéines de l'autophagie sont à l'origine de la machinerie moléculaire de l'autophagie. Ils ont été en premier lieu caractérisés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Mizushima, 2007). Chez les mammifères, de nombreux gènes (>30) sont impliqués dans le contrôle génétique de l'autophagie. Leurs protéines sont classées en 4 sous-groupes : le complexe Atg1/ULK1 et ses régulateurs, le complexe Atg6/Beclin1-phosphatidylinositol 3 Kinase de classe III (PI3K III), le complexe Atg9 et les systèmes de conjugaison Atg12 et Atg8. La figure 8 représente les différentes étapes de la macroautophagie.

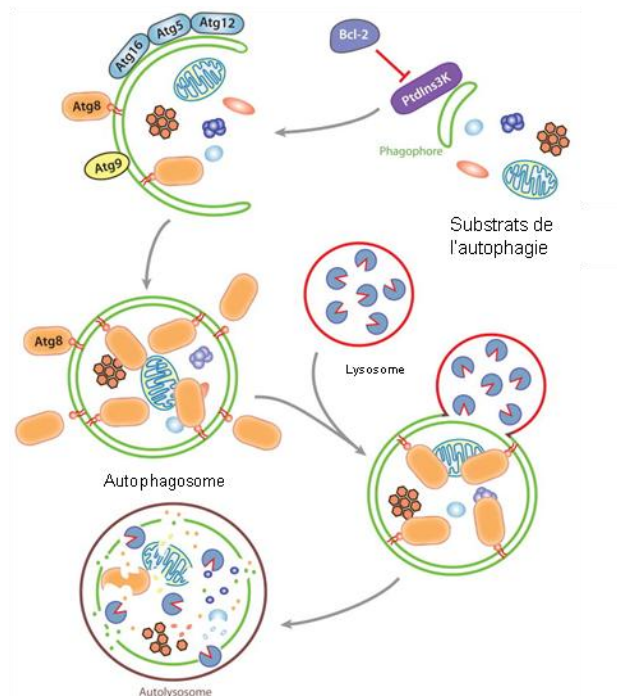


Figure 8 : Représentation schématique de la macroautophagie.

La macroautophagie se déroule en 4 étapes : 1) Initiation du phagophore, 2) Elongation de l'autophagosome, 3) Maturation/Fusion avec le lysosome, 4) Dégradation protéolytique du matériel séquestré (cargo autophagique). Adapté d'après He et al., 2009.

La formation de l'autophagosome se déroule en 3 étapes : initiation de la biogénèse de la membrane, élongation de la membrane isolée et fermeture des bords de la membrane pour former l'autophagosome.

III.1.a. Origine des membranes de l'autophagosome

L'origine membranaire de l'autophagosome a longtemps été débattue. Jusqu'en 2006, on considérait que la double membrane d'isolation ou « phagophore », pourrait avoir comme origine le réticulum endoplasmique (Dunn, 1990), l'appareil de Golgi, la membrane plasmique ou encore la mitochondrie. En 2008, Axe et ses collaborateurs ont mis en évidence, lors de privation en acides aminés, la formation, à partir de la membrane du réticulum endoplasmique (RE), d'un compartiment riche en phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P), à proximité d'une vésicule contenant la phosphatidylinositol 3 Kinase de classe III (PI3K III) ou Vps34 (Vacuolar protein sorting 34). Ce compartiment dynamiquement lié au RE a été nommé « Omégasome » en raison de sa structure en Ω -like. L'omégasome servirait à regrouper des protéines de la famille Atg (protéines de l'autophagie), pour former la membrane pré-autophagosomale appelée phagophore. Quand l'omégasome atteint sa taille maximale, le PI3P servirait à la définition du point de fusion du phagophore pour permettre la fermeture de la double membrane autophagosomale. A ce moment, l'autophagosome bourgeonne et peut aller fusionner avec le lysosome (Axe et al., 2008).

III.1.b. Initiation de l'autophagosome

1) Le complexe Atg1/ULK1

Le complexe initiateur de l'autophagie est appelé le complexe Atg1 chez la levure et ULK1/2 chez les mammifères (pour Unc-51-Like Kinase 1/2). Il est composé de la protéine Atg1/ULK1 elle-même, Atg13, Atg17 (FIP200 chez les mammifères) et ATG 101 (Hara and Mizushima, 2009; Mercer et al., 2009). Une étude récente a montré que ce complexe est colocalisé avec les omégasomes de manière PI3P dépendante (Karanasios et al., 2013). L'initiation de l'autophagie est régulée par le complexe mTORC1, formé *a minima* de mTOR et rapTOR (cf plus loin, régulation de l'autophagie). En condition riche en nutriments, mTORC1 est associée avec le complexe Atg1/ULK1-Atg13-Atg17/FIP200-ATG101. Le complexe mTORC1 phosphoryle et inhibe Atg1/ULK1 et Atg13 empêchant ainsi l'initiation de l'autophagie (Ravikumar et al., 2010). En condition de carence nutritionnelle ou par ajout de la rapamycine (inhibiteur de mTOR), mTORC1 se dissocie du complexe, diminuant la phosphorylation d'Atg1/ULK1 et d'Atg13 et active Atg1/ULK1 (Hosokawa et al., 2009). Atg1/ULK1 est une sérine-thréonine kinase qui va à son tour phosphoryler Atg13, Atg17/FIP200 et Atg1/ULK1 lui-même (Yeh et al., 2010) permettant ainsi l'initiation de l'autophagie (Figure 9).

2) Le complexe Atg6 (Beclin1)/Phosphatidylinositol3Kinase de classe 3 (PI3K III)

La formation de l'autophagosome requiert ensuite l'activité de la PI3K de classe III, responsable de la production de PI3P et nécessaire à la formation de l'autophagosome (Axe

et al., 2008). La PI3K de classe III s'associe avec Atg6 (Beclin1 chez les mammifères codé par *BECN1*) et p150 (Vps15). Ces trois membres forment le complexe de base auquel peuvent se rajouter d'autres protéines telles qu'UVRAG, Atg14 (Kihara et al., 2001a), Bif1 et Ambra1 (Takahashi et al., 2009). ATG14L et UVRAG se lient à Beclin 1 d'une manière mutuellement exclusive et forment ainsi des complexes fonctionnellement différents avec la PI3K-III. En s'associant avec Ambra1, ATG14L adresserait le complexe à certaines régions du RE (probablement à l'omégasome), alors qu'UVRAG, stimulé par sa liaison à Bif1, favoriserait la maturation de l'autophagosome. La 3-méthyladénine (3-MA) et la wortmannine, des inhibiteurs de PI3KIII, empêchent ces étapes d'initiation de l'autophagie (Seglen and Gordon, 1982); (Blommaert et al., 1997). L'invalidation de Beclin1 par siRNA inhibe également la formation des autophagosomes (Liang et al., 2008) (Figure 9).

3) Le complexe impliquant l'Atg9

L'Atg9 est une protéine transmembranaire localisée au niveau de la membrane autophagosomale. Elle permet le recrutement des lipides membranaires nécessaires à la formation des membranes de vacuolisation (Kim et al., 2002b; Noda et al., 2000). En effet, elle recrute le PI3P (lipide membranaire), produit au niveau du complexe Beclin1/PI3K III (Figure 9).

III.1.c. Elongation de l'autophagosome

L'élongation des membranes du phagophore dépend de deux systèmes de conjugaison ubiquitin-like.

1) Le système de conjugaison Atg12-Atg5-Atg16L

La conjugaison de l'Atg12 à Atg5 est essentielle à l'élongation du phagophore (Mizushima et al., 2001). Atg12 (protéine ubiquitin-like) est conjuguée à Atg5 de manière covalente en 4 étapes séquentielles. En présence d'ATP, Atg12 est activée par Atg7 (enzyme ubiquitin-E1-like), formant une liaison thioester entre la glycine carboxyterminale d'Atg12 et la cystéine 507 d'Atg7. Ensuite, Atg12 est transférée sur Atg10 (enzyme ubiquitin-E2-like) avec une nouvelle liaison thioester entre la glycine carboxyterminale d'Atg12 et la cystéine 133 d'Atg10. Enfin, la glycine carboxyterminale d'Atg12 forme une liaison covalente avec la lysine 149 d'Atg5 (Mizushima et al., 1998). Le complexe Atg12-Atg5 est ensuite associé à Atg16L via Atg5 et s'oligomérisise (grâce aux domaines « coiled-coil » ou superhélice d'Atg16L) pour former un large complexe Atg12-Atg5-Atg16L (Mizushima et al., 2003). Celui-ci s'associe de manière transitoire à l'extérieur de la membrane préautophagosomale. Ce complexe est indispensable à la formation et l'élongation de l'autophagosome. Il est nécessaire également au recrutement du deuxième système

ubiquitin-like d'Atg8 (LC3) à la membrane de l'autophagosome (Mizushima et al., 2001) (Figure 9).

2) Système de conjugaison Atg8 phosphatidyléthanolamine (PE)

Chez la levure, l'Atg8 est une protéine ubiquitin-like produite sous une forme cytosolique pro-Atg8 (Noda et al., 2009a). Lors de l'activation de l'autophagie, elle est immédiatement clivée dans sa partie carboxy-terminale via l'activité protéase de l'Atg4. Elle est ensuite activée par Atg7 (enzyme E1 ubiquitin-like), avant d'être transférée vers Atg3 (enzyme E2 ubiquitin-like) qui permet sa conjugaison à un phosphatidyléthanolamine (PE) (Ichimura et al., 2000; Kirisako et al., 2000). Le complexe Atg12-Atg5 semblerait participer à la lipodation d'Atg8. En effet, l'absence du conjugué Atg12-Atg5 ou une mutation sur le gène *ATG5* réduisent la réaction de lipodation d'Atg8 (Hanada et al., 2007; Mizushima et al., 2002). A l'inverse, l'absence du conjugué Atg8-PE n'est pas indispensable à la formation du conjugué Atg12-Atg5, mais elle est primordiale pour achever la formation de l'autophagosome. Atg8 est retrouvée sur les deux faces de l'autophagosome. Une fois ce dernier achevé, la protéase à cystéine Atg4 clive la liaison du conjugué Atg8-PE présent sur la face cytosolique afin de régénérer la réserve cytoplasmique d'Atg8 (Ichimura et al., 2000; Kirisako et al., 2000). Elle est absente de toutes les structures membranaires et est uniquement retrouvée à la membrane des autophagosomes pendant toute la durée de leur maturation, jusqu'à leur dissipation après fusion avec les lysosomes. C'est la seule des Atg qui ne participe pas de manière transitoire à la formation des autophagosomes.

Le principal homologue à l'Atg8 chez les mammifères est la MAP-LC3 (microtubule-associated protein 1 (MAP1) light chain 3), qui constitue un marqueur primordial de l'autophagie. Elle se présente sous trois formes : une forme pro-LC3 correspondant à la protéine entière après sa synthèse, une forme LC3I, ayant subi un clivage protéolytique (par Atg4) et une forme LC3II correspondant à la forme conjuguée au PE associée aux membranes des autophagosomes (Kirisako et al., 2000). La MAP-LC3 représente aujourd'hui un marqueur fiable pour suivre l'évolution et l'intensité de la signalisation autophagique. En effet, la quantité de LC3II (LC3-PE) est corrélée au nombre d'autophagosomes (Kabeya et al., 2000) (Figure 9).

III.1.d. Maturation de l'autophagosome

1) Fusion avec le lysosome

L'autophagosome nouvellement formé, qui séquestre du matériel à éliminer, peut fusionner directement ou indirectement avec le lysosome pour former l'autolysosome ou l'autophagolysosome. La fusion directe avec le lysosome a été mise en évidence depuis 1990 par Dunn (Dunn, 1990). Dans la fusion indirecte, l'autophagosome fusionne d'abord

avec les endosomes précoces par l'intermédiaire du complexe COPI (Razi et al., 2009). Ensuite il se lie avec les endosomes tardifs, par l'intermédiaire du système ESCRT (endosomal sorting complex required for transport). La perte du complexe ESCRT-III dans des neurones conduit à une accumulation d'autophagosomes et pourrait participer à la neurodégénération (Lee et al., 2007a).

Une famille particulière de protéines intervient dans cette étape de fusion de l'autophagosome : la famille des SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factors attachment protein receptors). Dans cette famille, les protéines NSF/SNARE, TI-VAMP/VAMP7 et VAMP3 ont été identifiées (Fader et al., 2009; Ishihara et al., 2001) (Figure 9).

2) Dégradation protéolytique

Le lysosome possède environ 50 enzymes hydro ou lipolytiques (Kroemer and Jäättelä, 2005). Ces sont toutes sont des hydrolases acides, actives seulement à pH acide dans la lumière lysosomale. La membrane lysosomale contient des perméases et des pompes à protons maintenant l'acidité du pH interne, grâce à un transport actif de protons du cytosol vers le lysosome. Après fusion de l'autophagosome avec le lysosome, le pH de ce dernier s'acidifie favorisant la dégradation rapide du matériel séquestré. Le complexe Atg8-PE/LC3-II ancré sur la face interne de l'autophagosome est dégradé au même titre que le matériel séquestré par l'autophagosome. Les produits de cette dégradation (acides aminés, lipides, glucides, etc.) sont transportés vers le cytosol par les perméases de la membrane lysosomale (Saftig and Klumperman, 2009).

L'inhibition des pompes à protons par la Bafilomycine A1 ou la Chloroquine bloque l'acidification du lysosome et par conséquent l'activité des hydrolases lysosomales (Gonzalez-Noriega et al., 1980; Yamamoto et al., 1998). Ce blocage provoque une accumulation de vacuoles autophagiques, ainsi que de la forme Atg8-PE/LC3-II (Figure 9).

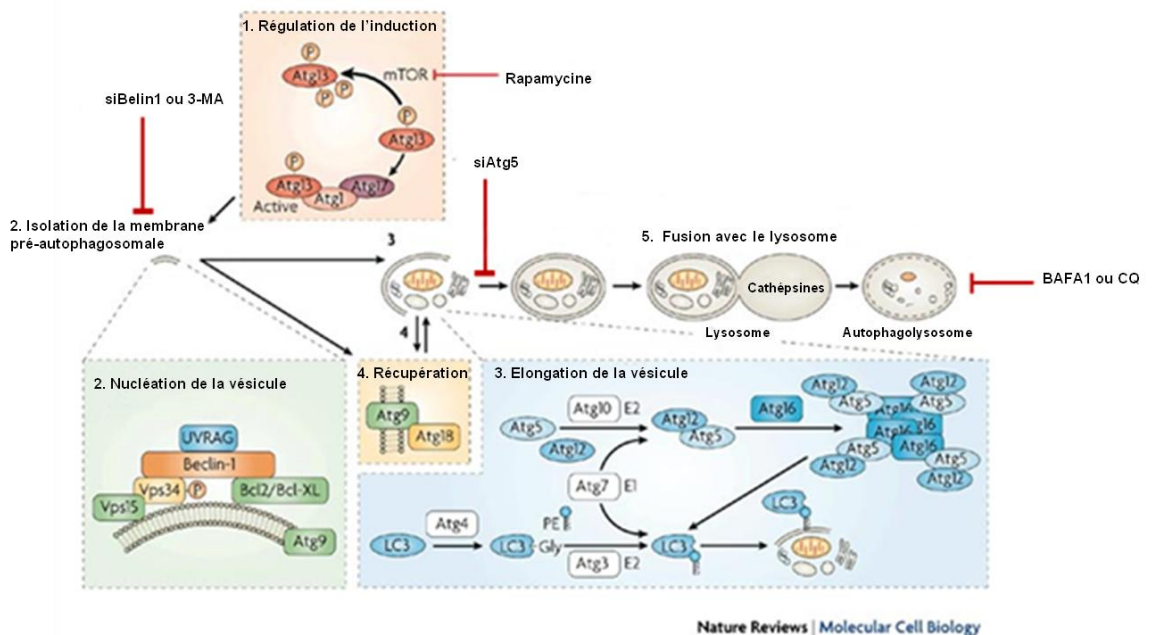


Figure 9 : Molécules et complexes impliqués dans le déroulement et la régulation de l'autophagie.

L'autophagie est régulée par 3 grands complexes : le complexe d'initiation régulé par mTOR, le complexe PI3K de classe III permettant la nucléation de la vésicule autophagique et les 2 systèmes de conjugaison ubiquitin-like régulant l'élongation de l'autophagosome. L'initiation de l'autophagie peut être inhibée par des siRNA dirigés contre les transcrits de Beclin1 ou par la 3-MA (3-MéthylAdénine). Des siRNA dirigés contre les transcrits d'Atg5 inhibent l'élongation, alors que la BAFA1 (BAFilomycine A1) et la CQ (ChloroQuine) inhibent l'activité lysosomale. PE : PhosphatidylEthanolamine. Schéma adapté d'après Maiuri et al., 2007IV.

IV. Contrôle de l'autophagie

Diverses protéines kinases jouent un rôle important dans l'initiation et le déroulement de l'autophagie. Parmi elles, mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Phosphate) et AMPK (AMP-activated protein kinase) régulent directement des composantes de la machinerie autophagique (Figure 10). D'autres kinases comme les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) et la PKC (Protéine Kinase C) régulent indirectement l'autophagie en modulant le niveau ou la fonction de protéines liées à ce processus. Leur implication est moins bien caractérisée que celle régulant directement l'autophagie (Sridharan et al., 2011).

Nous allons décrire brièvement le rôle de quelques kinases dans la régulation de l'autophagie, dont certaines, selon le contexte cellulaire, ont des rôles à la fois activateurs et inhibiteurs du processus.

IV.1. mTOR (mammalian Target Of Rapamycin)

mTOR est une sérine/thréonine kinase initialement identifiée comme étant la cible de la rapamycine (Sabers et al., 1995). Plus tard, son rôle dans la traduction protéique et la croissance cellulaire ont été caractérisés, en aval de la signalisation des facteurs de croissance (Guertin and Sabatini, 2007). Décrite comme un détecteur du niveau l'énergie, mTOR est placée au centre de la régulation de l'autophagie (Menéndez-Benito and Neefjes, 2007). Cette protéine participe à la formation de deux complexes : mTORC1 (mTOR, rapTOR, mLST8 et PRAS40) et mTORC2 (mTOR, ricTOR, mLST8 et Sin1).

mTORC1, agit via ses cibles : la protéine p70S6K (p70S6 kinase) et la 4E-BP1 (4E-Binding Protein 1) (Burnett et al., 1998; Kim et al., 2002a). Son activité est régulée par certains facteurs environnementaux tels que les facteurs de croissance, la disponibilité de nutriments et d'énergie, l'insuline, le taux de dioxygène,... (Corradetti and Guan, 2006). Lorsqu'un taux suffisant de nutriment est disponible, mTORC1 inhibe la formation d'autophagosome en s'associant avec le complexe initiateur de l'autophagie ULK1-Atg13-FIP200 et en phosphorylant ULK1 et Atg13 (Chan, 2009; Jung et al., 2009; Kim et al., 2011). L'inhibition de mTORC1 par la rapamycine ou par la privation sérique induit une déphosphorylation d'ULK1 et l'initiation de l'autophagie. Puisque la p70S6K est une cible de mTORC1, elle devrait inhiber l'autophagie (Blommaert et al., 1995). Or, plusieurs études suggèrent que la S6K induit l'autophagie au lieu de l'inhiber. Scott et ses collaborateurs ont démontré l'induction d'une autophagie de survie dans les corps lipidiques de la drosophile en cas de privation de nutriments. TOR inhibe cette autophagie indépendamment de la dS6K (drosophila S6 Kinase), qui au contraire, est importante pour son induction (Scott et al., 2004). De plus, l'inhibition de S6K par le resveratrol bloque cette signalisation (Armour et al., 2009). Inversement cette protéine active le processus suite une addition de la 6-thioguanine dans des cellules de cancer colorectal (Zeng and Kinsella, 2008). De plus, elle induirait la synthèse de certaines protéines importantes pour la formation de l'autophagosome, ainsi que pour sa maturation (Abeliovich et al., 2000; Lawrence and Brown, 1993). Cette régulation positive sous le contrôle de mTOR limiterait une activation excessive, lors d'une privation prolongée en acides aminés, conduisant à la mort via cette signalisation (Sridharan et al., 2011).

Bien que mTORC1 soit le complexe qui inhibe directement l'autophagie, mTORC2 (insensible à la rapamycine) pourrait également la réguler via ses effets sur Akt ou PKC (Sridharan et al., 2011). En effet, l'activation d'Akt induit la phosphorylation et l'inactivation de FoxO3, par translocation du noyau vers le cytosol, où il sera séquestré par la protéine 14-3-3, inhibant ainsi l'expression de ses gènes cibles. Leur expression correspond à des

protéines importantes pour l'autophagie, telles que la LC3 et BNIP3 (Brunet et al., 1999; Mammucari et al., 2007; Singh et al., 2010).

IV.2. AMPK (Adenosin MonoPhosphate-dependent Protein Kinase)

L'AMPK est activée en condition de stress principalement énergétiques (non disponibilité de nutriments ou d'ATP) et régule négativement mTORC1. En effet, elle phosphoryle TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex-2) et rapTOR, ce qui inhibe l'activité de mTORC1 et active l'autophagie (Gwinn et al., 2008; Inoki et al., 2003). De plus, AMPK régule ce processus en phosphorylant ULK1 (Egan et al., 2011; Kim et al., 2011; Lee et al., 2010). Cette protéine favorise également l'accumulation de FoxO3 dans le noyau tout en stimulant l'expression de ses gènes cibles liés à l'autophagie (Chiacchiera and Simone, 2009).

IV.3. PI3K (Phospholinositide 3 Kinase) et Akt

Les PI3K catalysent la phosphorylation des Phosphatidyl Inositol (PI). Il en existe 3 classes. Les PI3K de classe I sont activées en réponse à des facteurs de croissance et produisent du Phosphatidyl Inositol 3 Phosphate PI3P, du PI3,4P2 et du PI3,4,5P3. Ces seconds messagers stimulent diverses protéines dont Akt (Lawlor and Alessi, 2001). De ce fait, les PI3K de classe I régulent négativement l'autophagie. Suite à l'activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase, PI3K I agit positivement sur Akt via PDK1 (3-Phosphoinositide Dependent protein Kinase-1). Celle-ci phosphoryle et inhibe TSC2, l'inhibiteur de mTORC1, ce qui induit son activation favorisant alors la synthèse protéique et la croissance cellulaire aux dépens de l'autophagie (Huang and Manning, 2009).

Très peu de données sur les PI3K de classe II sont disponibles, alors que le seul membre des PI3K de classe III, Vps34, remplit une fonction bien documentée d'initiateur de l'autophagie. Comme dit plus haut, il interagit indirectement avec Beclin1 (Kihara et al., 2001a) et contribue à la formation de la vésicule autophagosomale (Kihara et al., 2001b). Il facilite également l'adressage à la membrane autophagosomale, de protéines ayant des domaines de liaison au PI, telles que WIPI1 (Proikas-Cezanne et al., 2004) et WIPI2 (ATG18) qui recrutent et produisent la lipidation de la LC3 (Polson et al., 2010). Cependant, selon sa localisation, Vps34 peut également activer mTORC1 en cas de présence de nutriments (Gulati and Thomas, 2007). A contrario, il existe une autophagie indépendante de mTOR, passant uniquement par la production de PI3P (Sarkar et al., 2005).

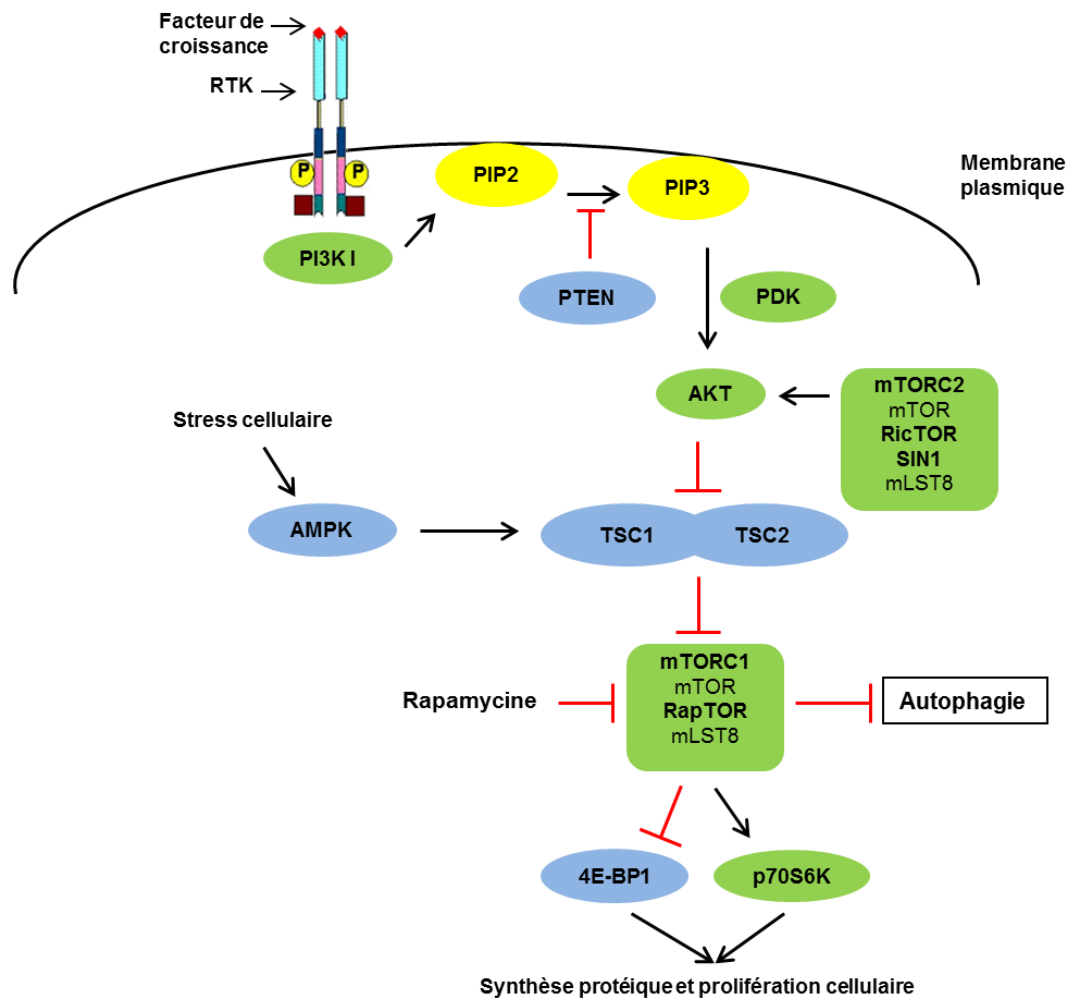


Figure 10 : Régulation de l'autophagie par la voie PI3K/Akt/mTOR.

Suite à la fixation d'un facteur de croissance sur un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK), la PI3K de classe I est activée et phosphoryle le PIP2 (ou PI4,5P2 : Phosphatidyl Inositol 4,5-bisPhosphate) pour produire le PI3P. Ce dernier recrute Akt et PDK, ce qui facilite la phosphorylation d'Akt par la PDK. Une fois Akt est activée, elle active le complexe mTORC1, ce qui inhibe l'autophagie. Il existe un autre complexe mTORC2 qui inhibe également l'autophagie par activation d'Akt. Adapté d'après Weichhart and Saemann, 2009.

IV.4. MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases)

Les MAPKs sont des sérine/thréonine kinases qui s'activent en réponse à différents stimuli extracellulaires, tels que les facteurs de croissance. Il en résulte une cascade de phosphorylations séquentielles, puis celles de facteurs de transcription. Les MAPKs les mieux étudiées sont ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), la p38 et JNK (c-Jun N-terminal Kinase). ERK est plutôt activée en réponse à un signal prolifératif, alors que la p38 et JNK sont associées aux situations de stress (Hazzalin and Mahadevan, 2002).

IV.4.a. ERK

Suite à des signaux extracellulaires de croissance, la petite protéine G Ras se lie à Raf et l'active ce qui initialise la cascade de signalisation des MAPK. Celle-ci passe par les MEK (MAPK/extracellular signal-regulated kinase), en aval de Raf, qui à leur tour, phosphorylent et activent ERK1/2 (McKay and Morrison, 2007). Elles constituent les deux isoformes d'ERK. Cette protéine contrôle la prolifération, la migration, la différenciation et la mort cellulaire (Murphy and Blenis, 2006). Elle joue également un rôle important dans l'autophagie (Cagnol and Chambard, 2010). Il a été montré dans des cellules de cancer colorectal, que l'inhibition pharmacologique de cette protéine inhibe ce processus quand il est induit par la privation sérique (Ogier-Denis et al., 2000). De plus, un grand nombre d'agents anti-cancéreux, induisent une autophagie dépendante d'ERK, tels que la soyasaponine dans des cellules de cancer colorectal (Ellington et al., 2006), la capsaïcine dans des cellules de cancer du sein (Choi et al., 2010) et le cadmium dans les cellules mésangiales (cellules adhérant aux parois des petits vaisseaux sanguins du rein) (Wang et al., 2009; Yang et al., 2009). Cependant, l'activation anormalement prolongée d'ERK induite par un agent cancérigène, le lindane, inhibe la maturation des vacuoles autophagiques dans les cellules de Sertoli (Corcelle et al., 2006).

IV.4.b. p38 MAPK ou p38

La famille p38 MAPK comprend 4 isoformes dont la mieux étudiée est la p38 α (Ono and Han, 2000). Plusieurs études lui ont attribué un rôle suppresseur de tumeur aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et la différenciation terminale (Wagner and Nebreda, 2009). Cependant, la p38 a également été impliquée dans la progression tumorale en favorisant l'invasion, l'angiogenèse et l'inflammation (Wagner and Nebreda, 2009). Des études récentes ont suggéré un rôle de la p38 dans la régulation de l'autophagie : certaines parlent d'un rôle inducteur de l'autophagie, d'autres d'un rôle inhibiteur de ce processus (Webber and Tooze, 2010a).

Certains agents anti-cancéreux induisent l'autophagie via l'activation de p38, tels que le polygonatum cyrtonema lectin (PCL) dans des cellules de mélanome humain (Liu et al., 2009), la « Monocyte Chemotactic Protein-1 » (MCP-1) dans le cardiomyoblaste (Younce and Kolattukudy, 2010), la silibinine dans des cellules de fibrosarcome (Duan et al., 2011), le bromelain dans des cellules de cancer du sein (Bhui et al., 2010), l'ordinine dans des cellules HeLa (Cui et al., 2007) et le resveratrol dans des cellules de carcinome hépatocellulaire (Liao et al., 2010). De plus, l'induction de l'autophagie par la p38 est parfois accompagnée

d'une augmentation de l'expression de certaines protéines Atg, telles que Beclin1 et Atg5 (Cui et al., 2007; Lim et al., 2010).

De façon contradictoire, la p38 a également été décrite comme étant un régulateur négatif de l'autophagie. En effet, son inhibition dans des cellules de cancer colorectal (Thyagarajan et al., 2010) et dans celles de leucémiques myéloïdes K562 (Colosetti et al., 2009) a été associée à une augmentation de l'expression de Beclin1 et une induction de l'autophagie. De même, la p38 peut entrer en compétition avec l'Atg9 transmembranaire, pour sa liaison avec la p38IP (p38 Interacting Protein) (Webber and Tooze, 2010b). Cette liaison est importante pour le trafic de l'Atg9 entre l'appareil de Golgi et les autophagosomes en élongation (Webber and Tooze, 2010b). La p38 inhiberait donc ce trafic et ainsi l'autophagie. Une étude plus récente sur des cellules de cancer colorectal, a montré un rôle de la p38 dans la sensibilité à un agent thérapeutique, le 5-Fluorouracil (5-FU). En effet, l'inhibition de la p38 par le SB203580 ou par des siRNA, bloque l'apoptose induite par la p53 et induit l'autophagie, permettant ainsi la résistance des cellules cancéreuses au 5-FU (de la Cruz-Morcillo et al., 2013).

IV.4.c. JNK

JNK est également appelée la SAPK (Stress-Activated Protein Kinase). Il existe 3 membres au sein de la famille JNK : JNK1, JNK2 et JNK3 (Hazzalin and Mahadevan, 2002; Wagner and Nebreda, 2009). JNK1 et JNK2 sont exprimés de manière ubiquitaire, alors que JNK3 est essentiellement exprimé dans le cerveau (Hazzalin and Mahadevan, 2002; Wagner and Nebreda, 2009). JNK est activé suite à divers stimuli, tels qu'un choc thermique ou osmotique, des irradiations ultraviolettes et des cytokines (Adler et al., 1995; Kayali et al., 2000). Une fois activé, JNK agit sur différentes cibles telles que l'AP1, ELK1, ATF2, p53 et Bcl-2 (Wagner and Nebreda, 2009).

L'implication de JNK dans l'induction de l'autophagie a été rapportée en cas de privation en acides aminés (Li et al., 2006), de stimulation par des cytokines (Jia et al., 2006), d'une activation du récepteur des cellules T (Li et al., 2006), de stimuli neuronaux excitotoxiques (Borsello et al., 2003) et de stress du RE (Ogata et al., 2006). De même, JNK régule la transcription de Beclin1 via la phosphorylation de c-Jun (Bhui et al., 2010; Ren et al., 2010; Wu et al., 2010).

Au contraire, des souris « knockout » pour les gènes *JNK1*, *JNK2* et *JNK3* présentent une augmentation de l'autophagie dans leurs neurones (Xu et al., 2011).

IV.5. PKC (Protéine Kinase C)

La famille PKC regroupe des protéines à activité sérine/thréonine kinase dépendante des phospholipides. Il en existe plusieurs membres : PKC α , β I, β II, γ , δ , ϵ , ζ , η , θ et ι (Basu, 1993) impliqués dans des fonctions cellulaires diverses. La PKC est la cible de la Phospho Lipase C γ (PLC γ), l'une des voies activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase. On peut citer par exemple les récepteurs aux neurotrophines auxquels nous nous intéressons dans la 4^{ème} partie de l'introduction. Comme JNK et la p38 MAPK, la PKC peut induire ou inhiber l'autophagie. En effet, la PKC θ favorise l'autophagie due à un stress du RE (Sakaki et al., 2008), alors que la PKC δ inhibe l'autophagie dans des cellules de carcinome canalaire pancréatique (Ozpolat et al., 2007).

V. Fonctions de l'autophagie:

L'autophagie joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en raison de sa fonction de contrôle qualité du cytoplasme. Elle est aussi impliquée dans l'adaptation et la survie des cellules soumises à des conditions de stress, notamment métaboliques. Cependant, elle peut dans certains contextes conduire à la mort cellulaire, il s'agit de la mort autophagique anciennement appelée mort cellulaire de type II. L'implication de ce processus dans la mort cellulaire est complexe et controversée. En effet, le blocage de l'autophagie par des siRNA ciblant des ARN de gènes essentiels du processus, ou par des produits pharmacologiques tels que la 3-Méthyladénine (3-MA) (inhibiteur de PI3K) ou la Bafilomycine (BAFA1)/Chloroquine (CQ) (inhibiteurs de l'activité lysosomale), induirait la mort. Dans d'autres cas, l'inhibition de l'autophagie entrainerait celle de l'apoptose. Outre ces fonctions physiologiques, le processus autophagique et son dérèglement est impliqué dans un grand nombre de pathologies. Dans ce document, nous avons choisi de cibler ses rôles dans le cancer.

V.1. Autophagie et survie cellulaire

L'autophagie est initialement un mécanisme enclenché pour favoriser la survie cellulaire, et *in fine* celle de l'individu. En effet, des auteurs (Kuma et al., 2004), s'interrogeant sur la survie du nouveau-né dans la période entre la coupure du cordon et le début de l'allaitement, ont montré une forte augmentation de l'activité autophagique dans plusieurs organes dont le cœur et le diaphragme. De plus, les embryons murins dont le gène l'*Atg5* été invalidé, meurent 24h après la naissance, en raison d'un faible apport de nutriments et d'énergie dans leur circulation. Plus généralement, l'induction de l'autophagie est essentielle à la survie des cellules en réponse à des variations de conditions environnementales (Mizushima, 2005). Celles-ci incluent la carence en nutriments dont les

facteurs de croissance, l'hypoxie... L'autophagie est alors augmentée pour fournir les précurseurs requis au renouvellement des constituants cellulaires et de l'ATP (Hait et al., 2006).

Ce processus participe, à côté du protéasome, au contrôle qualité du cytoplasme en prévenant l'accumulation de structures (protéines et/ou organites) excédentaires ou endommagées (Lorin et al., 2008). En effet, il a été montré dans les hépatocytes et les neurones des souris déficientes pour l'autophagie ($ATG5^{-/-}$) que des protéines ubiquitinylées ainsi que des organites excédentaires et/ou altérés s'accumulent et provoquent la dégénérescence cellulaire (Mizushima, 2006). De plus, les conditions oxydantes favorisent les mauvais repliements protéiques, qui forment alors des agrégats toxiques pour la cellule. Ceux-ci ne peuvent pas être éliminés par le protéasome et leur clairance nécessite l'intervention de l'autophagie. Dans ce contexte, la SQSTM1 (séquestrome 1) ou p62 permet la reconnaissance des agrégats ubiquitinylés par les autophagosomes. Cette protéine adaptatrice peut se lier à la fois à l'ubiquitine et à la LC3 (Pankiv et al., 2007). Aussi, elle possède un rôle de « cargo » en conduisant les éléments à dégrader vers l'autophagosome. De ce fait, c'est également un substrat de l'autophagie, qui est responsable de sa dégradation. Par conséquent, elle est fortement exprimée dans les cellules et organes déficients pour l'autophagie. Elle a initialement été mise en évidence dans des maladies de type synucléopathies, avec accumulation d' α -synucléine cytoplasmique en présence de p62/SQSTM1 mutée ou inactivée (Heinen et al., 2010; Kuusisto et al., 2008; Stefanis et al., 2001).

Les conditions oxydantes peuvent également être à l'origine du dysfonctionnement d'organites, comme par exemple les mitochondries. Lorsque celles-ci sont endommagées et surproductrices d'espèces réactives de l' O_2 (ROS), elles sont éliminées par une autophagie spécifique, la mitophagie (Tatsuta and Langer, 2008). Dans celle-ci p62/SQSTM1 intervient en reconnaissant certaines protéines, préalablement ubiquitinylées. Ceci est également vrai dans le cas d'autres organites altérés, tels que les peroxysomes et les ribosomes (Kim et al., 2008; Kirkin et al., 2009).

V.2. Autophagie et mort cellulaire

La mort autophagique, anciennement dénommée mort programmée de type II (la mort cellulaire de type I définissant l'apoptose), correspond à l'accumulation progressive de vacuoles autophagiques, sans condensation de la chromatine. Cette définition nourrit la controverse entre « mort autophagique » et « mort accompagnée d'autophagie » (Clarke and Puyal, 2012; Kroemer and Levine, 2008). Néanmoins, ce type de mort pourrait être la conséquence d'une destruction massive des constituants cellulaires due à une autophagie

exacerbée, ou résulter de la séquestration et la dégradation spécifique de facteurs vitaux pour la cellule. Morphologiquement, elle est également caractérisée par des cellules rondes, par la présence d'une membrane convolutive et perméable et ne fait pas intervenir les caspases (Yu et al., 2004). Comme pour l'apoptose, l'autophagie n'entraîne pas de réponse inflammatoire (Levine and Yuan, 2005). La mort autophagique intervient au cours de la métamorphose chez les insectes (Martin and Baehrecke, 2004), ou lors du développement embryonnaire chez les mammifères (Levine and Yuan, 2005). Elle est également impliquée dans plusieurs pathologies humaines telles que la cardiomyopathie dilatée ou la maladie de Parkinson. Enfin, certains traitements provoquent une mort autophagique dans des cellules cancéreuses humaines (Levine and Yuan, 2005).

Elle participerait également à l'activation ou à l'amplification des signaux de mort de type apoptotique ou nécrotique. Par conséquent, ce processus pourrait intervenir de façon dépendante ou non des autres types de mort cellulaire. L'interaction entre autophagie et apoptose est en réalité complexe et les données sur ce sujet sont souvent contradictoires (Eisenberg-Lerner et al., 2009).

V.3 Interrelation entre autophagie et apoptose

Selon les données actuelles, l'autophagie peut agir soit en synergie avec l'apoptose pour induire la mort cellulaire, ou à l'inverse, elle peut la bloquer pour permettre la survie (Eisenberg-Lerner et al., 2009).

Dans le premier cas de figure, si l'apoptose est bloquée, l'autophagie prend le relais pour induire la mort cellulaire. Ainsi, le traitement par l'étoposide ou la straurosporine, deux inducteurs d'apoptose, de cellules MEF doublement invalidées pour Bax et Bad ($Bax^{-/-}$ et $Bad^{-/-}$: 2 facteurs pro-apoptotiques), conduit à une mort cellulaire dépendante de Beclin1 et d'Atg5 (Shimizu et al., 2004). Dans le second cas de figure, l'autophagie atténue l'apoptose en rétablissant dans la cellule des conditions propices à sa survie. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie par la 3-Méthyladénine (inhibiteur des PI3KIII) ou par extinction de Beclin1 par des siRNA, peut provoquer l'apoptose des cellules soumises à une carence nutritionnelle (Boya et al., 2005; González-Polo et al., 2005). Au sein de notre équipe, nous avons observé une induction de l'autophagie dans des cellules de neuroblastome mutées pour la p53. Dans cette lignée, en réponse à un stress au chlorure de cobalt (mimétique chimique de l'hypoxie), l'autophagie protège dans un premier temps les cellules puis les conduit à une mort autophagique (Naves et al., 2013). Son inhibition pharmacologique est responsable d'une activation de l'apoptose, mort cellulaire mise en évidence dans la lignée SHSY5Y qui possède un gène p53 sauvage, en réponse au même type de stress (Naves et al., 2013).

Ce lien entre l'autophagie et l'apoptose vient de l'existence de régulateurs communs. En effet, les membres anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xl régulent négativement les deux processus, par leur capacité d'interaction avec les domaines BH3 que possèdent Beclin1 et Bax. Ils peuvent donc séquestrer l'une ou l'autre de ces protéines, inhibant ainsi l'autophagie ou l'apoptose respectivement (Maiuri et al., 2007). De plus, une étude récente a montré la formation d'un complexe entre la caspase 9 et l'Atg7, aboutissant ainsi à un nouveau mécanisme d'interaction entre l'apoptose et l'autophagie (Han et al., 2014a). En effet, il a été montré que les capacités catalytiques de la caspase 9 sont importantes pour la formation de l'autophagosome, par interaction avec l'Atg 7. Cependant en fonction du contexte cellulaire, on observe un effet inverse avec une inhibition de cette caspase et ses capacités apoptotiques (Han et al., 2014a).

La mort autophagique peut cependant survenir de manière indépendante de l'apoptose. En effet, il a été montré que la surexpression de l'oncogène *ras* dans des cellules de glioblastomes, induit une mort cellulaire complètement distincte de l'apoptose (Chi et al., 1999). Ce processus est accompagné d'une accumulation de vacuoles dérivant essentiellement du lysosome, avec un noyau intègre et une absence d'activation de caspases. De plus, la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 n'inhibe pas cette mort cellulaire. Celle-ci a également été observée dans des cellules de cancer colorectal (Chi et al., 1999) et de neuroblastome (Kitanaka et al., 2002).

V.4. Autophagie et cancer

V.4.a. Autophagie et tumorigénèse

Les relations entre l'autophagie et le développement des cancers sont complexes. Plusieurs études ont rapporté la fonction suppresseur de tumeur de l'autophagie. En particulier, il a été montré que *BECN1*, le gène codant Beclin1, est délété dans 75% de cancers ovariens, dans 50% de cancers du sein et dans 40% de cancers de la prostate (Aita et al., 1999), le classant parmi les suppresseurs de tumeur haplo-insuffisants. La mutation d'un seul allèle de *BECN1* augmente la survenue des tumeurs (Yue et al., 2003). La délétion d'*ATG7* a également été rapportée dans plusieurs cancers (Miyakis et al., 2003). Dans des conditions de stress métabolique, l'inhibition de l'autophagie par l'inactivation de *BECN1* ou *ATG5* augmente les dommages à l'ADN, ainsi que l'instabilité chromosomique des cellules (Tsuchihara et al., 2009). Ainsi, l'autophagie pourrait prévenir les dommages causés à l'ADN et limiter la survenue de cancers. Enfin, une signalisation autophagique est induite par la protéine suppresseur de tumeur, PTEN (Phosphatase and TENsin homologue), alors qu'elle est inhibée par des oncogènes (Maiuri et al., 2009). De plus, l'accumulation de p62 suite à

une autophagie défectueuse, contribue à la tumorigénèse (Mathew et al., 2009). Tous ces éléments sont en faveur d'un rôle anti-tumoral de l'autophagie.

Cependant, la capacité à recycler le contenu intra-cellulaire protège les cellules tumorales des conditions défavorables de l'environnement. Ainsi, l'autophagie constitue un mécanisme d'adaptation au sein des tumeurs solides faiblement vascularisées. Elle assure l'indépendance en nutriments et l'énergie nécessaire à la survie des cellules tumorales des régions hypoxiques (Jin and White, 2007). En effet, comme déjà décrit dans la deuxième partie, l'hypoxie provoque la stabilisation de la sous-unité α du facteur de l'hypoxie HIF1. Ceci active la transcription de plusieurs gènes cibles, tels que *VEGF* permettant la néo-vascularisation tumorale (Levy et al., 1995) et *GLUT1-3*, assurant le transport du glucose (Chen et al., 2001).

L'autophagie présenterait donc une dualité fonctionnelle dans le cancer (White and DiPaola, 2009). Dans les phases précoces de la tumorigénèse, elle limiterait la prolifération cellulaire, les dommages à l'ADN et par conséquent la progression tumorale. Lorsque la tumeur est plus importante et que sa vascularisation est restreinte, elle pourrait favoriser la survie des cellules tumorales situées dans des régions carencées et hypoxiques de la tumeur.

V.4.b. Autophagie et cellules initiatrices de tumeurs

Il est de plus en plus admis que les cellules souches cancéreuses (CSC), ou les cellules initiatrices de tumeurs, sont responsables de résistance tumorale aux traitements anti-cancéreux. L'induction de l'autophagie par ces molécules au niveau des CSC a été montrée dans différents cancers. En effet, un travail mené sur une population de cellules souches cancéreuses au niveau du cancer de la vessie, a montré leur résistance à certains agents chimiothérapeutiques (la Gemcitabine, la Mitomycine et la Cisplatine) et une induction importante du processus autophagique. L'inhibition de celui-ci a significativement sensibilisé les cellules souches à la chimiothérapie (Ojha et al., 2014). De façon comparable, la thérapie photodynamique appliquée au niveau de cellules souches du cancer colorectal, a induit une autophagie de survie. Son inhibition a déclenché l'apoptose et diminué le caractère souche de ces cellules *in-vitro* (diminution de leur capacité à former des sphères) et leur tumorigénicité *in-vivo* (Wei et al., 2014).

Concernant les cellules initiatrices de gliomes (CIG), leur traitement par radiothérapie a induit une autophagie provoquant leur radiorésistance (Lomonaco et al., 2009). L'inhibition de ce processus a significativement diminué la viabilité des CIG et leur capacité à former des neurosphères (Lomonaco et al., 2009). En revanche, Zhuang et ses collaborateurs ont attribué à l'autophagie un rôle dans la différenciation des cellules initiatrices de gliomes et

leur radiosensibilité (Zhuang et al., 2011). Pour ces auteurs, leur traitement par de la Rapamycine et de la radiothérapie, suivie de greffes chez la souris, n'entraînait pas de formation de glioblastome (Zhuang et al., 2011). Par ailleurs, une étude récente a montré l'implication de deux protéines régulatrices de l'autophagie, DRAM1 (Damage-Regulated Autophagy Modulator 1) et p62, dans l'invasion et la migration des cellules souches de glioblastomes (CSG) (Galavotti et al., 2013).

V.4.c. Autophagie et traitement des tumeurs

La dualité fonctionnelle de l'autophagie s'observe également au niveau du traitement des tumeurs. En effet, bien que l'autophagie confère à certains cancers une résistance aux agents chimiothérapeutiques (Morselli et al., 2009; Schoenlein et al., 2009; Sui et al., 2014) et aux radiations ionisantes (Han et al., 2014b), la mort de ce type peut également être induite par certaines molécules. Par exemple, un traitement avec le Tamoxifen (un anti-œstrogène) induit une mort autophagique des cellules MCF-7 (carcinome mammaire) et l'addition de la 3-MA, inhibe cette activation (Bursch et al., 1996). Elle peut être également sollicitée pour inhiber l'angiogenèse. Ainsi, l'endostatine (agent anti-angiogénique) induit la mort autophagique des cellules endothéliales (Chau et al., 2003). D'autres molécules auraient un rôle dichotomique, aboutissant soit à la survie ou à la mort selon le type du cancer. Par exemple, l'Etoposide induit une « mort autophagique » dans des carcinomes cervicaux, tandis qu'il induit une autophagie pro-survie dans des carcinomes cervicaux et hépatiques (Lee et al., 2007b; Xie et al., 2011).

Des études menées sur des lignées de glioblastome traitées au trioxyde d'arsenic, présentent un arrêt du cycle cellulaire en G₂/M accompagné d'une mort autophagique (Kanzawa et al., 2003). De plus, le Témazolomide (Temodal®), la molécule la plus utilisée pour traiter ce cancer, induit l'autophagie dans des lignées de ce type, leur conférant une résistance au traitement. L'inhibition de cette signalisation augmente la cytotoxicité à cette molécule (Zou et al., 2014a). Cependant, en présence d'autres inducteurs d'autophagie, tel que le RAD001 (inhibiteur de mTOR), le Témazolomide induit une autophagie conduisant plutôt à la mort (Josset et al., 2013). Le succès de la radiothérapie de cette tumeur peut être, comme la chimiothérapie, favorisé ou inhibé par l'autophagie induite par les radiations ionisantes. En effet, l'autophagie peut augmenter la radio-résistance des cellules tumorales (Cerniglia et al., 2012; Choi et al., 2014) ou au contraire, les radio-sensibiliser (Palumbo et al., 2012).

Considérant ces rôles contradictoires de l'autophagie dans le cancer, on s'intéresse de plus en plus aux voies de signalisations qui régulent ce processus, et qui regroupent celle de PI3K/Akt/mTOR, des MAPK (Erk, JNK et p38) et de la PLCγ (PKC). Ces voies sont activées

par les récepteurs aux neurotrophines, auxquels nous nous sommes également intéressés au cours de ce travail.

4ème partie: les neurotrophines (NTs)

I. Définition et historique

Les neurotrophines (NTs) constituent une famille de facteurs de croissance. Elles sont impliquées dans la différenciation, la prolifération, la survie, l'apoptose ainsi que dans la croissance axonale et la plasticité synaptique des cellules neuronales et astrocytaires.

Cette famille est constituée de 6 membres dont le premier qui a été découvert est le NGF. En 1956, Cohen et Levi-Montalcini l'ont isolé à partir des glandes salivaires de « *californian moccasin snake* » (Cohen and Levi-Montalcini, 1956). Cette molécule était capable de stimuler la différenciation et la survie des neurones sympathiques et sensoriels (Levi-Montalcini and Cohen, 1956). Plus tard, le rôle du NGF dans le maintien et la survie des neurones cholinergiques projetant dans l'hippocampe et le cortex cérébral a été décrit dans de nombreux travaux (Ebendal, 1992).

En 1982, Barde et ses collaborateurs ont purifié à partir du cerveau du porc, un second facteur neurotrophique, le BDNF (Barde et al., 1982), homologue au NGF (Leibrock et al., 1998). L'analyse des homologies de structures primaires entre le NGF et le BDNF a abouti à la description de 4 autres membres de neurotrophines : la neurotrophine-3 (NT-3) (Hohn et al., 1990; Jones and Reichardt, 1990; Maisonpierre et al., 1990), la neurotrophine-4/5 (NT-4/5) (Davies et al., 1993; Ip et al., 1992) et les neurotrophine-6 (NT-6) et 7 (NT-7), présentes uniquement chez le poisson : (Götz et al., 1994; Nilsson et al., 1998).

II. Les gènes des neurotrophines

Les gènes codant les NTs sont très conservés au cours de l'évolution. Ils sont issus de la duplication d'un même gène ancestral (Hallböök et al., 1991). Il existe plusieurs variants de transcrits de neurotrophines issus d'épissage alternatifs (Tableau 6).

Neurotrophine	Localisation chromosomique	Nombre de variants transcriptomiques
BDNF	1p13, 1	18
NGF	11p13	3
NT-3	12p13	2
NT-4/5	19q13, 3	1

Tableau 6 : Caractéristiques génétiques des NTs. Les localisations chromosomiques ainsi que le nombre de variants transcriptomiques de chaque NT sont obtenus à partir de la banque génomique NCBI.

III. Les protéines de type neurotrophines

Une fois synthétisées, les NTs subissent le même processus de maturation. En effet, elles sont générées, à partir d'un seul précurseur protéique de 260 à 266 acides aminés (aa) nommé pré-pro-neurotrophine, composé d'un pré-pro-domaine, d'un pro-domaine et d'un domaine mature. Ces domaines sont séquentiellement clivés afin d'obtenir une NT mature de 115 à 130 aa (Thoenen, 1991). Ainsi, les protéines non matures (contenant le peptide signal) sont clivées dans le réticulum endoplasmique pour donner une pro-neurotrophine. Celle-ci est ensuite coupée au niveau de paires d'acides aminés dibasiques (LysArg- et – ArgArg) par des protéases intracellulaires telles que la furine ou la proconvertase (Bresnahan et al., 1990 ; Seidah et al., 1996) afin de donner une NT mature qui sera sécrétée par la cellule. Cependant, les pro-NTs peuvent également être sécrétées, puis clivées par des protéases extracellulaires comme la plasmine et certaines métalloprotéases (MMP-3, MMP-7 ou MMP-9) (Lee et al., 2001; Pang et al., 2004). Ce processus de maturation protéolytique dépend du type de NT et de la disponibilité des protéases et des pro-convertases actives. Par exemple, le NGF est souvent sécrété sous sa forme mature, ce processus est constitutif afin d'assurer la survie des neurones cholinergiques. En revanche, le BDNF semble être majoritairement sécrété sous sa forme immature par les neurones, afin de jouer son rôle dans la plasticité synaptique (Mowla et al., 1999). Des études de l'équipe de Farhadi ont été menées sur des neurones de l'hippocampe et des cellules AtT20 (cellules tumorales murines issues de la glande pituitaire) transfectées pour surexprimer la pro-NT-3. Ils ont montré que la majorité de la molécule néosynthétisée est sécrétée de manière constitutive sous sa forme mature. Cela serait dû à la forte activité des furines au niveau du réseau trans-Golgien. L'inhibition de leur activité ou la surexpression de la pro-NT-3, induit une sécrétion régulée de cette dernière. En revanche, dans les cellules sur-exprimant la pro-NT-3 et le pro-BDNF, les deux NTs sont stockées dans des granules de sécrétion, puis libérées suite à des stimuli extracellulaires, probablement après une hétérodimérisation (Farhadi et al., 2000).

La NT-3 joue un rôle central dans la neurogénèse. En effet, elle induit la différenciation neuronale du cortex (Ghosh and Greenberg, 1995) et des progéniteurs de l'hippocampe (Vicario-Abejón et al., 1995). Il a également été démontré que la NT-3 joue un rôle dans les dernières étapes de la maturation neuronale via son influence sur le développement et la spécification des connexions neuronales, ainsi que sur la synaptogénèse des afférents de l'hippocampe (Martínez et al., 1998). De plus, la NT-3 augmente, comme le BDNF, l'efficacité de la transmission synaptique (Kang and Schuman, 1995) et régule la croissance dendritique et axonale (Kang and Schuman, 1995; McAllister et al., 1997).

IV. Les récepteurs aux neurotrophines

Afin d'interagir avec leurs cellules cibles, les NTs se fixent sur deux types de récepteurs:

- Les récepteurs de « haute affinité » de la famille Trk « Tropomyosin-related kinase », qui sont au nombre de 3 : TrkA, TrkB et TrkC.

- Le récepteur de « faible affinité » ou p75^{NTR}, membre de la famille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor), en raison de la présence d'un domaine de mort au niveau de sa partie intra-cellulaire. Ce récepteur est capable de lier l'ensemble des NTs matures avec une faible affinité. En revanche, il possède une forte affinité pour les pro-neurotrophines (pro-NTs) (Chao, 2003; Arévalo and Wu, 2006)

Une dualité fonctionnelle des NTs a été constatée. Lorsqu'elles sont produites sous forme de pro-NTs, elles présentent une activité proapoptotique par fixation de haute affinité à un complexe hétérodimérique constitué du récepteur p75^{NTR} et de la sortiline, la protéine de transport intra-cellulaire des pro-NTs (Teng et al., 2005). En revanche, lorsque les NTs sont produites sous forme mature, elles conduisent à la survie cellulaire par activation sélective des récepteurs Trk (Chao, 2003; Arévalo and Wu, 2006).

IV.1. Les récepteurs à haute affinité : les Trk

Il s'agit de récepteurs à activité tyrosine kinase, partageant une large homologie structurale. Ce sont des récepteurs transmembranaires comportant 3 domaines (Figure 11) :

- le domaine extracellulaire qui lie le ligand spécifique. Il est constitué d'une région riche en leucine entourée par deux régions riches en cystéines et deux domaines Immunoglobuline-like « Ig-like ».

- le domaine transmembranaire composé d'une courte hélice d'acides aminés hydrophobes.

- le domaine intracytoplasmique porteur de l'activité tyrosine kinase (Patapoutian and Reichardt 2001).

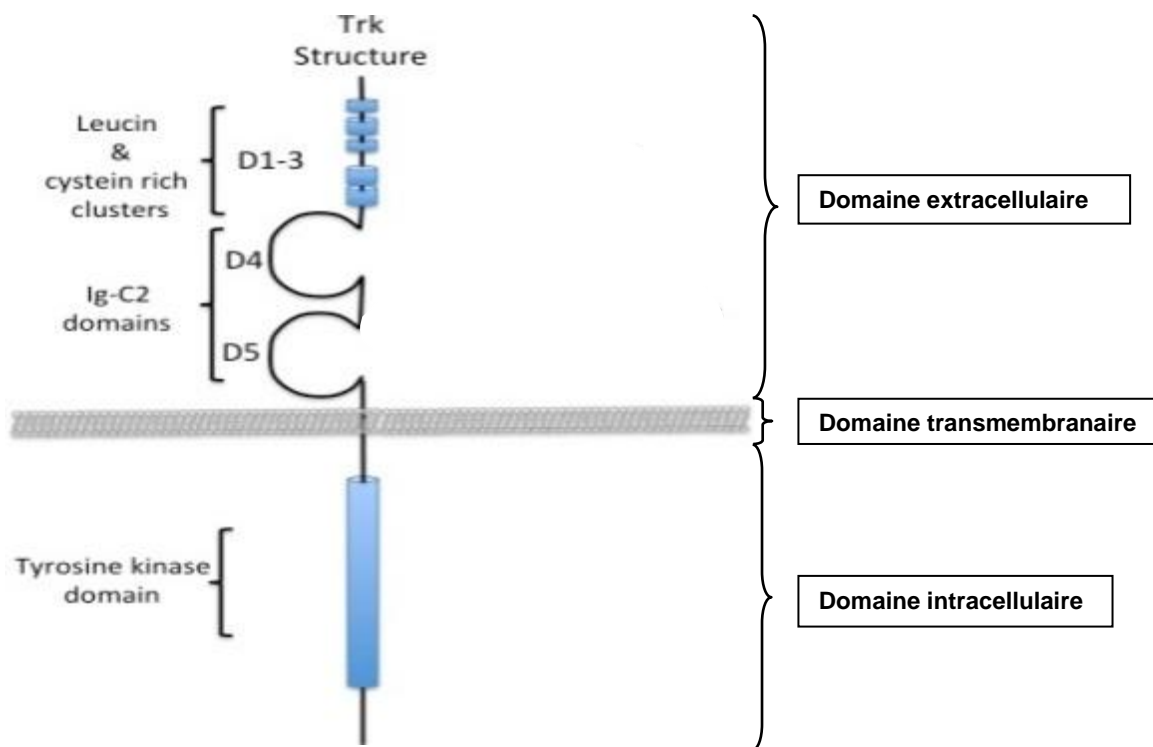


Figure 11 : Structure des récepteurs de type Trk.

Les trois récepteurs aux NTs se caractérisent par une structure commune de 145 à 150 kDa constituée de 3 domaines : un extracellulaire, un transmembranaire et un segment intracellulaire à activité tyrosine kinase. La liaison des NTs aux récepteurs Trks, ainsi que leur dimérisation s'effectuent au niveau des domaines « Ig-like ». Schéma adapté d'après Ruggeri et al., 2013.

Trois récepteurs spécifiques des NTs ont été identifiés : le TrkA, le TrkB et le TrkC. Chaque récepteur reconnaît son propre ligand : TrkA est activé par le NGF, TrkB va lier spécifiquement le BDNF et la NT4/5, et TrkC est activé par la NT-3 (Patapoutian and Reichardt, 2001). Cependant, en absence de son récepteur préférentiel et dans certains contextes particuliers, la NT-3 peut également interagir avec TrkA et TrkB (Rydén and Ibáñez, 1996). L'interaction des NTs avec leurs récepteurs s'effectue essentiellement au niveau des domaines « Ig-like » (Urfer et al., 1995), bien que le domaine riche en leucine puisse également intervenir (Windisch et al., 1995a, 1995b, 1995c). Enfin, le second domaine « Ig-like 2 » intervient dans la stabilisation de la forme monomérique de ces récepteurs, empêchant alors leur dimérisation et leur activation en absence de NTs.

IV.1.a. TrkA ou NTRK1

Il s'agit du premier récepteur Trk, mis en évidence en 1986, lorsque l'équipe de Martin-Zanca l'a identifié comme gène transformant dans une biopsie de carcinome de côlon humain (Martin-Zanca et al., 1986). Ce proto-oncogène était activé par réarrangement somatique entre des séquences codant les domaines transmembranaire et tyrosine kinase de TrkA et des séquences du gène de la tropomyosine non musculaire, d'où la dénomination

de Trk pour Tropomyosine-related kinase. Quelques années plus tard, le récepteur TrkA fut associé à son ligand, le NGF (Johnson et al., 1986; Kaplan et al., 1991; Klein et al., 1991). L'identification de TrkB et de TrkC, basée sur leur homologie de séquence et de structure, a suivi (Klein et al., 1989; Lamballe et al., 1991).

Trois variants de TrkA ont été décrits. Ils sont le résultat d'épissages alternatifs, conduisant ainsi à des isoformes ayant des fonctions biologiques différentes :

- TrkA-I, qui est épissé de l'exon 9, est préférentiellement exprimé dans les tissus non neuronaux et est incapable de lier la NT-3 (Brodeur et al., 2009).

- TrkA-II, qui est non épissé. C'est l'isoforme la plus longue des TrkA et a été mise en évidence dans les tissus neuronaux (Brodeur et al., 2009). De plus, elle est capable de s'autophosphoryler suite à sa liaison à la NT-3 (Clary and Reichardt, 1994).

- TrkA-III, qui est épissé des exons 6, 7 et 9, est un proto-oncogène capable de s'autophosphoryler indépendamment de la présence de son ligand (Brodeur et al., 2009).

IV.1.b. TrkB ou NTRK2

Le TrkB est codé par un gène de grande taille. En effet, *NTRK2* fait plus de 350 Kpb et comprend 24 exons (Nakagawara et al., 1995). A l'issue de la transcription de ce gène, au moins 100 isoformes d'ARN peuvent être produites, codant dix protéines différentes dont trois sont dites majoritaires :

- TrkB-FL (Full Length) (145 KDa), dont le transcrit est épissé des exons 16 et 19. Il contient son codon stop dans le dernier exon du gène *NTRK2*, l'exon 24 (Stoilov et al., 2002; Luberg et al., 2010).

- TrkB-T1 (95 KDa) est l'isoforme la plus courte. Son transcrit est non épissé et contient son codon stop dans l'exon 16. Ce récepteur est dépourvu de la majorité du domaine intracellulaire tyrosine kinase (Stoilov et al., 2002; Luberg et al., 2010).

- TrkB-T-Shc, son transcrit est épissé de l'exon 16. Il contient son codon stop dans l'exon 19 (Stoilov et al., 2002; Luberg et al., 2010). Ce récepteur possède dans son domaine intracellulaire une région de liaison aux protéines Shc et a été identifié uniquement dans le cerveau (Luberg et al., 2010).

Il a été suggéré que le TrkB-T1 joue un rôle potentiel de « dominant négatif » par induction de l'internalisation du récepteur TrkB-FL (Biffo et al., 1995), ou par la formation d'hétérodimères TrkB-FL-TrkB-T1, biologiquement inactifs (Eide et al., 1996). Physiologiquement, TrkB-T1 est responsable de l'élongation des dendrites distales alors que le TrkB-FL est impliqué dans l'augmentation des dendrites proximales de neurones corticaux

pyramidaux (Yacoubian and Lo, 2000). Stimulé par le BDNF, TrkB-T1 induit l'entrée du calcium au niveau des cellules gliales (Rose et al., 2003).

IV.1.c. TrkC ou NTRK3

En 1991, Lamballe et ses collaborateurs ont isolé et caractérisé un nouveau membre de la famille des gènes *NTRK*, le *NTRK3* codant le NTRK3 ou le TrkC. Il s'agit d'une protéine de 145 à 150 KDa, possédant de fortes homologies structurales avec les 2 autres récepteurs à activité tyrosine kinase, le TrkA et le TrkB (Lamballe et al., 1991).

Le TrkC est essentiellement exprimé dans le cerveau, au niveau de l'hippocampe, le cortex cérébral et la couche de cellules granuleuses du cervelet. Ce récepteur ne lie ni le NGF ni le BDNF, mais en revanche, fixe la NT-3 avec une forte affinité (Lamballe et al., 1991).

Il existe des isoformes tronquées de TrkC, dépourvues du domaine catalytique. Cependant, des isoformes de TrkC « catalytiques », présentant une activité tyrosine kinase ont également été caractérisées ; elles présentent des tailles très proches après migration sur SDS-PAGE (Lamballe et al., 1993). En effet, TrkC K2 (2^{ème} isoforme catalytique de TrkC) et TrkC K3 (3^{ème} isoforme catalytique de TrkC) ne diffèrent du TrkC K1 (1^{ère} isoforme catalytique), que par l'absence de 14 et 25 acides aminés respectivement au niveau du domaine catalytique (Lamballe et al., 1993). Ces 3 protéines ont des propriétés biologiques différentes notamment au niveau de la différenciation neuronale. Ceci pourrait être expliqué par une signalisation différente. En effet, TrkC K1 est capable de phosphoryler la PLC γ et la PI3K de classe I, alors que TrkC K2 et TrkC K3 ne le font pas (Lamballe et al., 1993).

Les isoformes tronquées non catalytiques ne sont pas encore bien identifiées, bien qu'il soit connu depuis longtemps, qu'il en existe au moins 4, obtenues par des jeux d'épissage alternatifs (Brodeur et al., 2009). Elles sont exprimées de manière différentielle au niveau du système nerveux et à des stades de développement différents. En effet, certaines formes tronquées ne sont exprimées qu'au cours des premières étapes de développement embryonnaire, alors que d'autres existent dans le cerveau adulte (Tsoulfas et al., 1993; Valenzuela et al., 1993; Menn et al., 1998). Cependant, la forme tronquée de TrkC majoritaire, reste celle appelée à l'heure actuelle TrkC-T1 ou TR-NTRK3 (Brodeur et al., 2009), dont le transcrit est reconnu dans la base de données NCBI sous le nom de variant 3 (Guidi et al., 2010) (Tableau 7).

Les formes tronquées de TrkB et TrkC ont été retrouvées exprimées au niveau des astrocytes de rat cultivés *in-vitro* (Rudge et al., 1994).

TrkC	Variant transcriptomique	Référence NCBI
TrkC FL	2	NM_002530.3
TrkC FL	1	NM_001012338.2
TrkC FL	4	NM_001243101.1
TrkC-T1	3	NM_001007156.2

Tableau 7 : Les différentes isoformes de TrkC.

Le gène *NTRK3* code plusieurs isoformes catalytiques ou TrkC FL et non catalytiques ou tronquées dont le TrkC-T1 ou TR-NTRK3 est majoritaire. Parmi les TrkC catalytiques, c'est le variant 2 qui est prédominant.

Jusqu'en 2005, les travaux effectués pour déterminer l'expression spatio-temporelle des isoformes de TrkC étaient réalisés sur l'animal. En 2005, Beltaifa et ses collaborateurs ont mené des études sur des cerveaux humains provenant d'individus morts à des âges différents (Beltaifa et al., 2005). L'expression spatio-temporelle des ARNm, ainsi que des protéines de TrkC a été recherchée au cours du développement au niveau du cortex préfrontal humain. Il a été possible de détecter les 2 isoformes majeures de TrkC : le TrkC FL (145 KDa) et le TrkC tronqué (50 à 60 KDa). Le TrkC FL était faiblement exprimé au cours du développement, alors que la forme tronquée était présente à des niveaux modérés au cours des stades précoces du développement, puis augmentait à l'adolescence. Les ARNm de TrkC étaient uniformément exprimés chez la majorité des cas postnataux, et diminuaient au cours du vieillissement. Au niveau cellulaire, les protéines TrkC, ainsi que les ARNm étaient à la fois exprimés au niveau des neurones pyramidaux et non pyramidaux. De plus, les protéines TrkC ont été détectées dans les cellules gliales et le neuropile (axones, dendrites, synapses et prolongement des cellules gliales) (Beltaifa et al., 2005).

IV.2. Le récepteur à basse affinité : le p75^{NTR}

Initialement appelé LNGFR (Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor), le p75^{NTR} (p75 NeuroTrophin Receptor) est une glycoprotéine de 75 KDa appartenant à la famille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor). Il est capable de lier toutes les NTs matures avec une faible affinité (Rodriguez-Tébar et al., 1990) et les NTs immatures ou pro-Nts avec une forte affinité (Chao, 2003; Arévalo and Wu, 2006). C'est une protéine transmembranaire avec 4 domaines riches en cystéine au niveau de sa partie extracellulaire correspondant au site de liaison des NTs matures et immatures (Yan and Chao, 1991) et un domaine de mort DD (Death Domain) au niveau de sa partie intracellulaire (Roux and Barker, 2002).

Il existe plusieurs isoformes de p75^{NTR} qui sont le résultat soit de l'épissage alternatif du transcrit (Dechant and Barde, 1997), soit de la protéolyse de la protéine elle-même (Zupan et al., 1989; DiStefano et al., 1993).

V. Signalisation des récepteurs aux NTs

V.1. Signalisation des récepteurs Trk FL

Les voies de signalisation activées par les NTs aboutissent à différentes fonctions neuronales, telles que la survie cellulaire, la différenciation, la formation dendritique et synaptique, la croissance et la guidance axonale. Cette variété d'effets dépend des molécules recrutées en aval des récepteurs. La liaison des NTs aux récepteurs Trk induit la dimérisation et la trans-phosphorylation de ces derniers, le recrutement de différentes molécules adaptatrices et enzymes pour finalement activer plusieurs voies de signalisation (Arévalo and Wu, 2006). Ce recrutement dépend de la tyrosine (Y) phosphorylée au niveau du domaine à activité tyrosine kinase du récepteur (Stephens et al., 1994; Qian et al., 1998; MacDonald et al., 2000), qui attire des protéines ayant un domaine de reconnaissance de tyrosines phosphorylées, tels que le domaine SH2 (Src-Homology 2).

Parmi les voies de signalisation activées par les récepteurs Trk, les voies PI3K/Akt, Ras/MAPK, et PLC γ sont les plus étudiées (Figure 12).

La protéine PI3K possède un domaine SH2, et est capable de se lier à une tyrosine phosphorylée particulière (Cuevas et al., 2001). Ensuite, elle phosphoryle le PI2P membranaire en PI3P, qui attire des protéines ayant un domaine de reconnaissance de phospholipides, PH (Pleckstrin Homology), telles que la PDK (Phosphoinositide Dependent Kinase) et la PKB (Protéine Kinase B)/Akt (ou Akt). Du fait du rapprochement de ces deux kinases, PDK phosphoryle et active Akt qui est impliquée dans la régulation de la fonction de nombreuses protéines anti-apoptotiques comme Bad, et de facteurs de transcription comme FoxO (Forkhead box O), ou NF κ B (nuclear factor kappa B) ce qui assure la fonction de survie des NTs (Huang and Reichardt, 2003). Akt recrute mTOR de manière directe par phosphorylation du résidu S2448 (Sekulić et al., 2000) (Figure 12) ou indirecte par inhibition du complexe TSC1/TSC2, suite à la phosphorylation de TSC2 (Inoki et al., 2002) (Figure 10). mTOR favorise la survie et la synthèse protéique par l'activation de la p70S6K et l'inhibition du 4E-BP1 (4E-Binding Protein 1), ce qui engage le facteur initiateur de la transcription, l'eIF4E (Eukaryotic translation Initiation Factor 4E) (Hay and Sonenberg, 2004).

La voie des MAPK est recrutée en aval des Trks via l'activation de Ras. Dans ce cas, la protéine adaptatrice Grb2, à domaine SH2, se lie à une tyrosine phosphorylée au niveau du domaine intracellulaire des Trks. Elle est en permanence couplée à SOS (Son Of

Sevenless), un facteur d'échange de guanosine (Basu et al., 1994). Grb2/SOS se lie directement aux phospho-Y, ou indirectement via la protéine Shc (Obermeier et al., 1993). SOS échange le GDP de Ras, pour du GTP et la rend active. Ras/GTP recrute Raf et MEKK (MAPKKK), qui seront phosphorylées par une protéine kinase qui serait probablement la PKC. Raf et MEKK phosphorylent les MEK (MAPKK), qui à leur tour activent ERK1/2, la p38MAPK et JNK (MAPK) (Huang and Reichardt, 2003). Cette activation transitoire est essentielle pour certaines fonctions neuronales notamment par son implication dans la nutrition des neurones (Marshall, 1995). Si l'activation de Ras se prolonge, elle favorise plutôt la différenciation neuronale (Marshall, 1995).

Finalement, la PLC γ peut aussi être activée en aval des Trks. Elle se lie directement aux phospho-Y des Trks et est activée par phosphorylation (Ohmichi et al., 1991). Elle peut alors catalyser l'hydrolyse du PIP2 membranaire en DAG (DiAcyl Glycérol) qui reste ancré à la membrane et en IP3 (Inositol-1,4,5-triphosphate) cytosolique. DAG recrute la PKC qui sera phosphorylée et activée par une kinase qui n'est pas identifiée avec certitude. L'IP3 induit la libération du calcium des stocks intracellulaires et enclenche ainsi les voies de signalisation sensibles au calcium (Huang and Reichardt, 2003) (Figure 12).

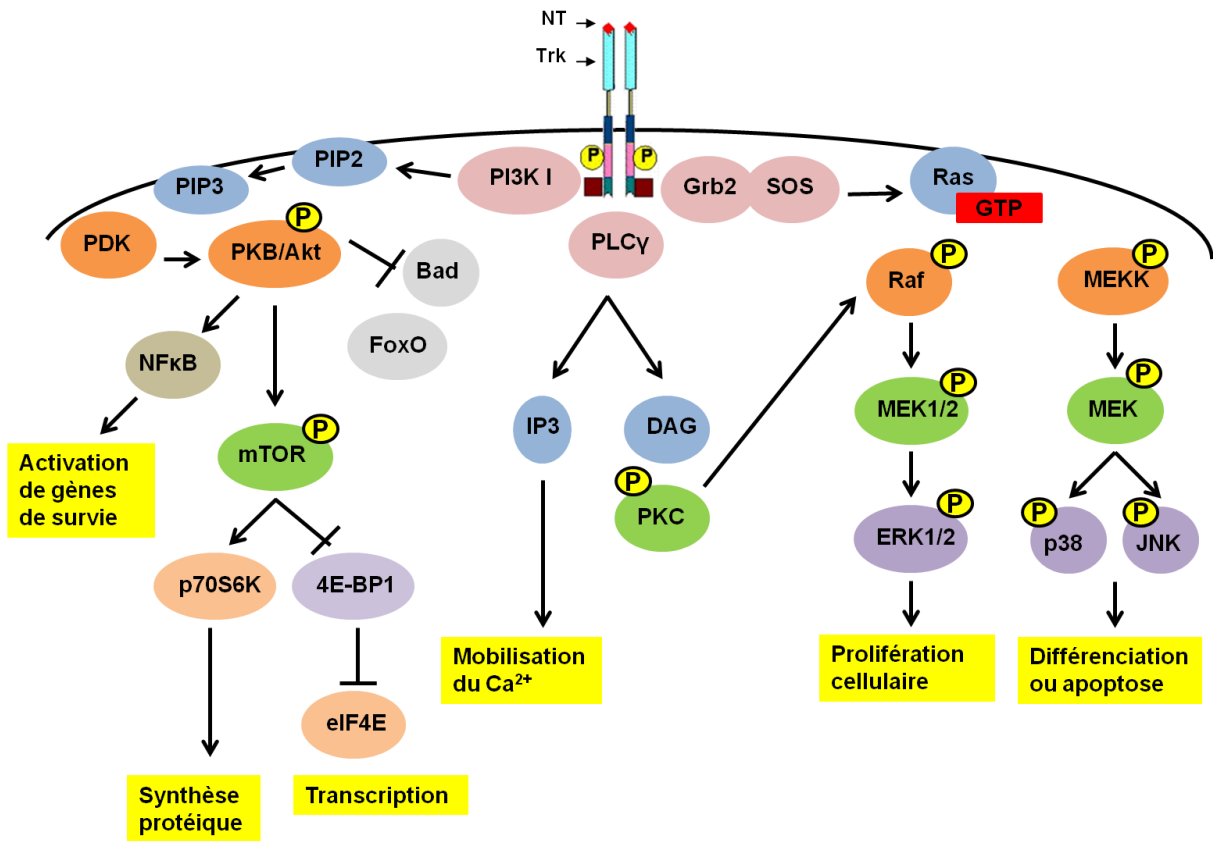


Figure 12 : Représentation simplifiée des principales voies de signalisation des Trks.

Les récepteurs Trks engendrent diverses fonctions biologiques comme la survie, la prolifération et la différenciation via l'activation des différentes voies de signalisation MAPK, PI3K/Akt et phospholipase C γ (PLC γ). La liaison de NTs à leurs récepteurs Trks entraîne leur activation par dimérisation et autophosphorylation. Grb2 : Growth factor receptor-bound protein ; SOS : Son Of Sevenless ; Ras : Ras GTPase activating protein ; Raf: Raf kinase ; ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase ; MEK : MAP ERK Kinase ; Protein Kinase C; PI3K : Phosphatidyl Inositol Triphosphate Kinase ; JNK : c-Jun N-terminal Kinase ; p38 : p38 MAP Kinase ; PKB : Protéine Kinase B ; PDK : Phosphoinositide Dependent Kinase ; FoxO : Forkhead box O ; NF κ B : nuclear factor kappa B ; eIF4E : Eukaryotic translation Initiation Factor 4E ; 4E-BP1 : 4E-Binding Protein 1 ; DAG : DiAcyl Glycérol ; IP3 : Inositol-1,4,5-triphosphate.

V.2. Signalisation du récepteur p75^{NTR}

Comme déjà mentionné, le p75^{NTR} possède un domaine de mort DD dans sa partie intracellulaire. Ce domaine est dépourvu d'une activité catalytique intrinsèque, mais est capable de lier des molécules adaptatrices conduisant à l'activation de la cascade des caspases et à la mort apoptotique (Roux and Barker, 2002). Le p75^{NTR} n'induit pas seulement l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire, mais également la survie, la différenciation et la prolifération cellulaire. En effet, une étude a montré qu'à faible dose, le p75^{NTR} était capable d'activer Akt et d'inhiber l'apoptose dans des cellules de fibroblastes humains (Roux et al., 2001). Ceci est dépendant de l'activation de la PI3K et résultait en l'augmentation du contenu en phosphotyrosine de diverses protéines cellulaires telles que la protéine adaptatrice Shc et la p85 correspondant à la sous-unité régulatrice de la PI3K (Roux et al., 2001).

Par ailleurs, le p75^{NTR} peut interagir avec les récepteurs Trk pour former des hétérodimères capables de lier les NTs matures avec une plus grande affinité (Hempstead et al., 1991). Dans ce cas, la voie de signalisation enclenchée est plutôt une voie de survie et de différenciation (Nykjaer et al., 2005). Il peut également interagir avec la sortiline (un des récepteurs à la neurotensine). Le complexe va alors lier les pro-NTs (NTs immatures) pour induire la mort apoptotique (Teng et al., 2005).

Au niveau des astrocytes de rats, le traitement avec du NGF, a réduit la prolifération cellulaire, suite à sa fixation sur le p75^{NTR}, sans pour autant induire une mort apoptotique (Cragolini et al., 2009).

V.3. Cas particulier de la signalisation du récepteur TrkC-T1

La principale fonction qui a longtemps été associée au TrkC tronqué (TrkC-T1), repose sur son rôle de « dominant négatif » du récepteur TrkC FL, par séquestration de la NT-3 (Palko et al., 1999). Cependant en 2006, Esteban et ses collaborateurs, ont mis en évidence un rôle du TrkC-T1 dans le remodelage membranaire et la réorganisation du cytosquelette. En effet, après liaison de la NT-3, le TrkC-T1 s'associe à la Tamaline (une protéine d'échafaudage capable d'interagir avec diverses protéines, Kitano et al., 2002, 2003), par une région intracellulaire codée par l'exon 14bm, présent uniquement dans la séquence codant le TrkC-T1. La Tamaline forme un complexe avec ARNO (ARf Nucleotide-binding site Opener) (Nevrivy et al., 2000), un facteur d'échange de Guanine pour Arf1 et Arf6, deux protéines à activité GTPase (Frank et al., 1998). De ce fait, Arf6-GDP sera recruté par ARNO et transféré à la membrane plasmique où il induit le renflement membranaire et le remodelage du cytosquelette après échange du GDP / GTP (Randazzo et al., 2000). Une partie de cet effet d'Arf6 est contrôlé par l'activation de Rac1, une Rho GTPase située en

aval d'Arf6 (Radhakrishna et al., 1999). C'est ainsi que l'équipe d'Esteban a mis en évidence un rôle de remodelage d'actine suite à l'activation d'Arf6-Rac1 par le complexe TrkC-T1/Tamaline, lui-même induit par la NT-3 (Esteban et al., 2006).

Or, Arf6 a également un rôle dans le trafic cellulaire (Brown et al., 2001). Il est impliqué dans la signalisation des endosomes et la migration cellulaire (Schiefermeier et al., 2011). Il pourrait donc de ce fait être engagé dans le trafic des autophagosomes.

VI. Implication des NTs dans le processus autophagique

Comme nous venons de le voir, la signalisation des NTs active des acteurs décrits pour être des régulateurs de l'autophagie. Par conséquent, la signalisation des NTs pourrait moduler celle de l'autophagie. La réciproque peut également être vraie si des membres de la signalisation neurotrophique sont dégradés par autophagie.

Il existe très peu de données dans la littérature liant ces deux signalisations. Cependant, il a été démontré en 2004 une implication de la mort autophagique au niveau des neurones cérébraux de Purkinje. Cette mort autophagique, associée à l'activation de p75^{NTR} est inhibée par l'ajout du NGF. Cela laisse supposer qu'en présence de facteurs trophiques neuronaux, le p75^{NTR} contrôle la survie des neurones de Purkinje. En absence de son ligand ce récepteur induit la mort autophagique au niveau de ces cellules (Florez-McClure et al., 2004).

En 2007, il a été montré que le TrkA induit la mort autophagique de cellules de GBM humain. En effet, au niveau de la lignée G55 transfectée par la séquence codant TrkA, les auteurs ont remarqué l'apparition de nombreuses structures vacuolaires cytosoliques suivie par une mort cellulaire. Cette mort était caractérisée par une absence d'activation des caspases, alors qu'elle était inhibée par la 3-MA et accompagnée de plusieurs marqueurs autophagiques (acidification des vacuoles, augmentation de la LC3, arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M,...). La formation de ces vacuoles était également accompagnée d'une activation d'ERK et de JNK, alors que la p38 restait intacte (Hansen et al., 2007).

Le BDNF semble aussi remplir un rôle ambigu dans la régulation du processus autophagique. Une étude récente menée sur des neurones corticaux isolés à partir de rates gestantes, suggère une induction de l'autophagie par le BDNF, via l'inhibition de la voie PI3K/mTOR/p70S6K (Chen, 2013). Dans un autre travail réalisé sur des neurones primaires de l'hippocampe, le BDNF jouerait un rôle de neuroprotecteur en modulant l'autophagie et mTOR. En effet, le BDNF induit une autophagie pro-survie dans ces neurones, puis il active mTOR pour éviter une autophagie excessive ; l'ajout de la Rapamycine conduit à la mort cellulaire suite à une autophagie exacerbée (Smith et al., 2014).

Nous avons vu que l'isoforme TrkC-T1 est capable d'activer Arf6, qui est impliqué dans le trafic cellulaire (endosomes, autophagosomes,...). Or une étude récente a également montré une implication d'Arf6 dans la biogenèse autophagosomale par la production de PI2P et l'activation de la phospholipase D (Moreau et al., 2012). En effet, une colocalisation partielle d'Arf6 avec certains acteurs de l'autophagie, tels que l'Atg16-L1 et l'Atg5 est observée. De plus, l'extinction d'Arf6 par siRNA diminue l'autophagie induite par la privation sérique, mais réduit également la phosphorylation de la p70S6K, cible de mTOR. Cela sous-entend qu'Arf6 induirait l'autophagie de manière indépendante de mTOR (Moreau et al., 2012). Les auteurs ont également démontré une colocalisation des autophagosomes avec le PI2P. Celui-ci est important pour la membrane autophagosomale et peut être généré par l'action d'Arf6 au niveau de la membrane plasmique (Brown et al., 2001). De plus, Arf6 est capable d'induire l'activation de la phospholipase D, conduisant à la formation de l'acide phosphatidique (PA), un lipide impliqué dans la biogenèse autophagosomale (Dall'Armi et al., 2010).

En résumé, l'activation du TrkC-T1 par la NT-3 conduit à l'activation d'Arf6 qui, contrôlerait la biogenèse et le trafic des autophagosomes, impliquant une régulation de l'autophagie par l'un des récepteurs aux NTs.

VII. Implication des NTs dans le processus cancéreux

Plusieurs études se sont intéressées à la signalisation des NTs dans le cancer. Bien que dans la majorité des cas, les NTs ont été associées à la survie tumorale, certaines ont été considérées comme étant de bons pronostics. Ces signalisations neurotrophiques ont été retrouvées dans différents types de cancers, neuronaux ou non (Tableau 8).

Cancers	Signalisations neurotrophiques	Effets	Références
Cancer du sein	<p>1-TrkA</p> <p>2-p75^{NTR}</p> <p>3-BDNF (surexpression)</p> <p>4-NT-3</p>	<p>1-Prolifération, invasion, métastase et angiogénèse</p> <p>2-Activation NFκB et augmentation de la survie cellulaire</p> <p>3-Survie cellulaire</p> <p>4-Croissance et métastase au niveau du cerveau</p>	<p>1-Com et al., 2007; Descamps et al., 1998; Lagadec et al., 2009</p> <p>2-Descamps et al., 2001; El Yazidi-Belkoura et al., 2003</p> <p>3-Patani et al., 2011</p> <p>4-Louie et al., 2013</p>
Mélanome	1-NGF	1-Prolifération, migration	1-Bröcker et al., 1991;

	2-p75 ^{NTR}	et invasion cellulaire 2-Migration cellulaire après couplage à un co-récepteur : la sortiline	Truzzi et al., 2008 2-Truzzi et al., 2008
Cancer du pancréas	1-NGF	1-Prolifération, invasion et augmentation de la tumorigénicité	1-Torrisani and Buscail, 2002; Zhu et al., 2002
Cancer gastrique	1-BDNF/TrkB (surexpression) 2-p75 ^{NTR}	1-Progression tumorale 2-Inhibition de la prolifération tumorale	1-Okugawa et al., 2013 2-Jin et al., 2007
Cancer de la prostate	1-Perte d'expression du p75 ^{NTR} (suppresseur de tumeur) 2-TrkA et TrkB (surexpression)	1-Prolifération, survie et métastase 2-Prolifération et survie	1-Khwaja et al., 2006; Krygier and Djakiew, 2002 2-Papatsoris et al., 2007; Sclabas et al., 2005
Cancer du poumon non à petites cellules	1-TrkB (surexprimé)/BDNF	1-Invaison cellulaire	1-Zhang et al., 2010
Adénocarcinomes du poumon	1-TrkB	1-Métastases	1-Sinkevicius et al., 2014
Myélomes multiples	1-BDNF/TrkB	1-Progression et survie tumorale	1-Pearse et al., 2005
Neuroblastome	1-TrkA FL 2-TrkA-III 3-NGF lié au p75 ^{NTR} 4-BDNF/TrkB 5- TrkC en absence de la NT-3	1-Apoptose et inhibition de l'angiogénèse 2-Survie et résistance au stress hypoxique 3-Apoptose 4-Survie, résistance à la chimiothérapie et à l'hypoxie suite à l'induction de l'angiogénèse 5-Apoptose	1-Lavoie et al., 2005 ; Eggert et al., 2000a 2-Tacconelli et al., 2005a, 2005b 3-Kuner and Hertel, 1998 4-Middlemas et al., 1999 5-Bouzas-Rodriguez et al., 2010
Médulloblastome	1-NGF/TrkA 2-NT-3/TrkC (surexpression)	1-Apoptose 2-Apoptose et inhibition de la croissance tumorale	1-Katsetos et al., 2003 2-Gruber-Olipitz et al., 2009; Kim et al., 1999

Tableau 8 : Implication des neurotrophines dans le processus cancéreux.

Des travaux réalisés au sein de notre équipe ont montré un rôle de la signalisation BDNF/TrkB dans la survie des lignées pré-B, matures et plasmocytaires (Fauchais et al., 2008). Cette survie est dépendante de l'activation de la sortiline, qui n'avait jamais encore été décrite dans les cellules B (Fauchais et al., 2008). Le couple BDNF/TrkB favorise également la croissance et la survie de cellules de cancer colorectal et est surexprimé dans

les tissus tumoraux issus de patients atteints par ce cancer (Akil et al., 2011). De plus, une étude menée sur la signalisation de NGF/TrkA dans des cellules de lymphome B diffus à grandes cellules, indique un rôle de cette voie dans la survie de ces cellules, ainsi que dans leur résistance au rituximab (un agent utilisé en chimiothérapie pour lutter contre ce type de cancer) (Bellanger et al., 2011). Par ailleurs, il a été récemment mis en évidence dans notre équipe un rôle de la sortiline dans le transfert des exosomes entre les cellules tumorales d'une lignée de cancer du poumon. Ce transport est lié à la formation d'un complexe entre la sortiline et les récepteurs à activité tyrosine kinase, le TrkB et l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Wilson et al., 2014).

- **Cas particulier des gliomes**

Concernant les gliomes, l'activation du TrkA par le NGF a été corrélée à une augmentation de la prolifération cellulaire dans des lignées de GBM multiforme humain (Singer et al., 1999). En 2003, une étude réalisée sur des biopsies de tumeurs de gliomes de différents grades ainsi que sur du tissu cérébral péri-tumoral de patients adultes, a montré que dans ce dernier, seuls les neurones exprimaient TrkA et TrkB. Au contraire, dans les sections tumorales, l'expression de TrkA et TrkB est présente dans la majorité des cellules gliales. Au niveau des tumeurs de bas grades (grades I et II), TrkA et TrkB sont fortement exprimés. Dans les tumeurs malignes de grade IV (GBM à cellules géantes et GBM multiforme), il y a une très faible expression de ces deux récepteurs. Ceci suggère que TrkA et TrkB sont impliqués dans la pathogénèse tumorale, plus particulièrement dans les stades précoces. Ils pourraient répondre à des signaux favorisant la prolifération gliale et la progression vers un stade plus avancé et vers la malignité (Wadhwa et al., 2003). Cependant, en 2007, il a été publié que TrkA serait un indicateur de bon pronostic, pour sa capacité à induire la mort autophagique (Hansen et al., 2007).

Le récepteur p75^{NTR} a été fortement associé à la capacité invasive des gliomes malins. En effet, il est proposé comme régulateur principal de leur migration et invasion, et ce de manière dépendante des NTs. Une activation des signalisations en aval produit des changements nets du cytosquelette des cellules envahissantes. Ces réponses rendent les gliomes malins hautement invasifs, incurables par les thérapies conventionnelles (Johnston et al., 2007). De plus, l'inhibition du p75^{NTR} par siRNA ou encore l'absence de son clivage par les α et γ -sécrétases diminue la prolifération des cellules initiatrices de tumeurs cérébrales (Forsyth et al., 2014). Suite à la recherche de p75^{NTR} et de ses produits de clivage (partie carboxy-terminale et domaine intracellulaire) dans des prélèvements de patients atteints de gliomes de différents grades, le récepteur p75 a été retrouvé chez tous les patients, alors que les produits de clivage sont fortement présents chez les patients atteints de GBM (grade IV) (Forsyth et al., 2014). Dans une étude récente de Xiong et

collaborateurs, une forte expression de la forme immature du BDNF (pro-BDNF), du p75^{NTR} et de la sortiline dans les gliomes de haut grade, était corrélée au grade de malignité des tumeurs (Xiong et al., 2013a). Pour ces auteurs, la signalisation pro-BDNF/p75^{NTR} jouerait un rôle dans l'induction de l'apoptose et la diminution de la prolifération cellulaire, observée *in-vitro* dans des cellules de gliomes (cellules C6 ; Xiong et al., 2013a). Dans ce même modèle cellulaire, l'expression de la forme mature du BDNF serait associée à l'inhibition de l'apoptose et l'augmentation de la prolifération et de l'invasion cellulaires (Xiong et al., 2013b).

Objectifs de la thèse

Malgré un traitement optimal associant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie, les patients atteints de GBM subissent souvent une rechute incurable. En effet, la durée moyenne de survie de ces patients est inférieure à 16 mois. Le GBM est une tumeur capable de survivre même dans des conditions d'oxygénation très faibles. Il existe donc des voies d'adaptation induites en condition d'hypoxie, permettant à cette tumeur de résister. Des travaux récents ont montré l'induction du processus autophagique en réponse à l'hypoxie dans des cellules de GBM humain (Hu et al., 2012). Leurs travaux ont été réalisés sur plusieurs lignées de GBM dont les U87MG. Notre objectif était d'abord de reproduire leurs résultats sur les U87MG, dans nos propres conditions de culture, puis de les étendre à d'autres lignées cellulaires qui sont les M059K et les M059J. Il s'agit de 2 lignées issues d'un même patient, dont une est radiorésistante (M059K) et l'autre radiosensible (M059J). Le but était ensuite d'inhiber cette voie autophagique et regarder les effets sur le devenir cellulaire. L'autophagie induite par l'hypoxie dans les lignées de GBM étudiées, était bien une voie de survie cellulaire, mais son inhibition seule n'était pas suffisante pour induire la mort des cellules cancéreuses. Par conséquent, il était indispensable d'étudier d'autres voies de survie cellulaire, afin d'identifier les facteurs impliqués dans la résistance des cellules à des conditions environnementales défavorables, et d'explorer de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Nous nous sommes donc intéressés à la signalisation des neurotrophines, qui sont avant tout, des facteurs de croissance du système nerveux. De plus, les neurotrophines s'inscrivent dans la thématique principale de l'EA 3842, qui s'intéresse à leur implication dans le processus cancéreux. Le but était donc d'établir l'état des lieux de la signalisation neurotrophique en condition de normoxie et d'hypoxie, en particulier dans les cellules U87MG, puis d'essayer d'inhiber cette signalisation afin de provoquer la mort cellulaire. La co-inhibition des signalisations autophagique et neurotrophique a également fait partie des objectifs de cette thèse.

La suite de nos travaux a cherché à mettre en évidence le processus autophagique au niveau de coupes de tumeurs issues de patients atteints de GBM, et de comparer les résultats obtenus au cavernome (tumeur cérébrale bénigne). De plus, cette étude *ex-vivo* s'est également intéressée au couple NT3/TrkC de la signalisation neurotrophique, dont l'expression a augmenté en hypoxie au cours des expériences réalisées *in-vitro*.

Matériels et Méthodes

I. Culture cellulaire

I.1. Modèles cellulaires

Les lignées cellulaires humaines de glioblastome utilisées dans ce travail proviennent de l'American type Culture collection (ATCC). Il s'agit des cellules U87MG (Ref : HTB-14), M059K (Ref : CRL-2365), et M059J (Ref : CRL-2366). Les U87MG constituent la lignée de référence et sont par conséquent très employées. Les cellules M059K et M059J sont issues du même patient et présentent une pentaploïdie au niveau du bras long du chromosome 8, où se trouve le gène codant la sous-unité catalytique de la DNAPK, (*DNAPK_{cs}*). Il s'agit d'une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN suite à des dommages tels que les rayonnements ionisants. La lignée M059K, possède 5 copies sauvages de ce gène, alors que pour les M059J, ces séquences sont mutées. Cela a pour conséquence de rendre radiosensible la lignée M059J, alors que la lignée M059K est radiorésistante. Attention l-mal formulé car les M059K sont issues des M059J.

I.2. Conditions de culture

La lignée U87MG est cultivée dans du milieu DMEM-GlutaMAX (Invitrogen), tandis que pour les lignées M059K et M059J c'est le DMEM/F12 (Invitrogen) qui est utilisé. Pour toutes ces cellules le milieu est complété par 1 % de mélange d'acides aminés non essentiels (Invitrogen), 1% de Pénicilline/Streptomycine (Invitrogen) et de 10% de sérum de veau foetal (Lonza) décomplémenté pendant 30 min à 56°C. Ils constituent les « milieux complets ».

Les cellules sont cultivées soit en normoxie c'est-à-dire, sous atmosphère enrichie de 5% de CO₂, soit en hypoxie, où la pression partielle du diazote est de 94% et celle du dioxygène de 1%. Dans les deux cas, les étuves sont thermostatées à 37°C. Pour les repiquages (quand les cellules atteignent 70 à 80 % de confluence) ainsi que pour les différentes analyses, les cellules sont décollées de leur support par addition de 3 mL de trypsine (Invitrogen) dans les flasques de 75 cm², durant 5 minutes à 37°C. Il s'ensuit une étape de centrifugation à 90 g pendant 10 minutes dans du milieu complet. Pour toutes les études réalisées, les cellules U87MG sontensemencées à 2x10⁶ cellules/flasques de 75 cm² avec du milieu complet, tandis que les cellules M059K et M059J sontensemencées à 10⁶ cellules/75cm². Le choix de la concentration cellulaire favorise le contact cellulaire, car il a été montré que la présence de molécules d'adhérence et de communication entre les cellules augmentent l'effet de l'hypoxie (Skuli et al., 2009). Pour cela, une numération / viabilité en présence de bleu trypan (0,1%, Invitrogen) est réalisée sur lame de Malassez. La capacité des cellules à exclure ce colorant est déterminée par observation au microscope à

lumière blanche, grossissement X40. La viabilité cellulaire est définie en pourcentage de cellules ayant exclu le bleu trypan.

Remarque : Les mycoplasmes étant des micro-organismes contaminant fréquemment les cultures cellulaires, leur absence est contrôlée par marquage de l'ADN par le DAPI (0,1µg/ml). Si nécessaire, les cultures sont décontaminées par addition de 250 µg/ml de plasmocine (agent anti-mycoplasme).

I.3. Congélation-Décongélation des cellules

Les cellules en culture sont décollées et centrifugées (90 g pendant 10 minutes à 25°C). Elles sont ensuite remises en suspension dans du milieu complet additionné de 10% d'un cryoprotecteur, le diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich), à raison de 10⁶ cellules par cryotube. Ceux-ci sont placés dans un bloc à congélation contenant de l'isopropanol (Sigma-Aldrich) pendant 24 heures à -80°C, avant d'être stockés dans un container d'azote liquide à -196°C. L'isopropanol assure une congélation progressive des cellules en abaissant la température d'1°C/min. E revanche, l'étape de décongélation doit être rapide pour obtenir une viabilité cellulaire optimale. Ainsi, aussitôt sorti de l'azote liquide, le cryotube est placé, dans un bain-marie à 37°C jusqu'à décongélation complète de la suspension cellulaire. Les cellules sont reprises dans du milieu complet et centrifugées (90 g, 10 minutes à 25°C) afin d'éliminer le DMSO en excès. Elles sont alors remises en culture dans du milieu complet. Pour les lignées possédant les gènes de résistance à la néomycine et/ou à la puromycine, l'antibiotique est ajouté à la suspension cellulaire à partir du second repiquage. Les cellules ne sont employées qu'après deux repiquages successifs.

I.4. Traitements

Les cellules sontensemencées comme décrit (conditions de culture) dans des flasques de 75cm² et dans du milieu complet, puis laissées au repos pendant une nuit en normoxie. Ensuite, les cellules sont soit laissées en normoxie, soit placées en hypoxie pendant 4, 8, 12 et 16h. Dans les deux cas, des traitements à la Chloroquine (40 µM, Sigma), un inhibiteur des pompes à protons ATPases dépendantes, sont réalisés pour inhiber la phase tardive de l'autophagie (acidification des lysosomes/autophagolysosomes). La Chloroquine est laissée avec les cellules pendant toute la cinétique effectuée (maximum 16h).

II. Transfections

Deux types de transfections ont été réalisés sur les cellules : une pour faire exprimer une protéine de fusion LC3-GFP, qui nous a permis de visualiser la formation d'autophagosomes, l'autre pour éteindre par siRNA l'expression de protéines d'intérêt.

II. 1. Obtention des lignées exprimant la protéine de fusion GFP-LC3

Nous avons transfecté les cellules U87MG, M059K et M059J afin qu'elles expriment la protéine MAP-LC3 humaine fusionnée à la protéine fluorescente GFP. Pour cela, le vecteur lentiviral pCT-Autophago-GFP (System Biosciences) a été utilisé. Tout d'abord, une amplification de ce vecteur a été effectuée par transformation de bactéries compétentes.

II.1. a. Transformation de bactéries compétentes par un vecteur

Une aliquote d'1 µg du vecteur pCT-Autophago-GFP est ajoutée à 20 µL de bactéries thermocompétentes GC-α (Sigma). Le plasmide est alors introduit dans les bactéries par choc thermique : après 20 minutes dans la glace, le mélange bactéries / vecteur est transféré pendant 20 secondes dans un bain-marie à 37°C puis immédiatement remis dans la glace. Les bactéries sont ensuite mises en culture, avant d'être incubées pendant une heure à 37°C sous agitation pour qu'elles puissent exprimer les gènes codés par le vecteur d'intérêt et notamment le gène de résistance à l'ampicilline.

II.1.b. Mise en culture des bactéries transformées

Les bactéries transformées sont étalées sur une boîte de pétri contenant de la gélose (15 g d'agar pour 1 litre de milieu complet LB, Invitrogen) dans laquelle est ajoutée l'ampicilline (50 µg/mL, Invitrogen) afin de sélectionner les bactéries ayant incorporées le vecteur d'intérêt. La culture est alors placée dans une étuve à 37°C pendant une nuit. Une colonie composée de bactéries résistantes à l'ampicilline, est prélevée et déposée dans 200 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline. L'amplification des clones est réalisée sous agitation pendant une nuit à 37°C.

II.1.c. Purification des vecteurs amplifiés

La culture bactérienne est centrifugée à 6000 x g pendant 15 min à 4°C. Après élimination du surnageant, la purification des vecteurs contenus dans le culot bactérien a été réalisée à l'aide du kit MaxiPrepTM (Qiagen), les instructions délivrées avec ce kit ont été rigoureusement suivies. L'ADN plasmidique est dosé par spectrophotométrie (nanodrop, ThermoFisher) à 260 nm.

II.1.d. Transfection des cellules HEK192 et concentration des particules virales

L'ADN vectoriel obtenu est ensuite introduit par infection dans des cellules de la lignée HEK192, connues pour être très facilement infectées par un lentivirus.

Une aliquote de 2 µg d'ADN d'intérêt avec l'agent transfectant, le jetPEI (Polyplus) d'une part et de 1µg du vecteur d'emballage (Sigma) permettant l'encapsulation des particules virales et du jetPEI d'autre part, est ajoutée pendant 15 min à température ambiante. Ensuite les deux mélanges sont rassemblés, agités vigoureusement et rajoutés sur les cellules HEK192 avec 1µg/ml de polybrène. 24h après. Le surnageant des cellules HEK192 contenant les premières particules virales formées, est récupéré, 24h plus tard, l'opération est répétée. Les particules lentivirales sont alors concentrées à l'aide du LentiX concentrator (Clontech) (1 volume du concentrator pour 3 volumes de particules virales), par incubation une nuit à 4°C. Puis une centrifugation à 1500 g pendant 45 min à 4°C est réalisée. Le culot contenant les particules virales est resuspendu dans 100 µl de milieu de culture et stocké à -80°C.

II.1.e. Infection des cellules d'intérêt avec les particules virales et tri cellulaire

Des cellules des lignées U87MG, M059K et M059J sontensemencées dans une plaque 6 puits, à une concentration permettant d'avoir 50 à 70% de confluence. Après adhésion, 100 µl de particules virales (MOI (Multiplicity Of Infection = 10) sont rajoutés sur les cellules en présence de 1 µg/ml de polybrène. 48h plus tard, le milieu de culture est remplacé avec du milieu de sélection contenant 2 µg de puromycine/ml afin d'éliminer les cellules n'ayant pas incorporé l'ADN d'intérêt. Le milieu est changé toutes les 48 h. Les cellules transfectées sont ensuite triées en fonction de leur fluorescence afin de concentrer la fraction de celles possédant un grand nombre de copies de l'ADN d'intérêt.

II. 2. Inhibition précoce de l'autophagie par des siRNA

La signalisation autophagique inhibée par des siRNA ciblant des gènes intervenant à un stade relativement précoce : Beclin-1 ou ATG5. Les cultures sontensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 120 000 cellules/2ml pour les U87MG et de 50 000 cellules/2ml pour les M059K, afin qu'elles soient entre 30 et 50% de confluence au moment de la transfection.

Après adhésion des cellules, le siRNA est préparé comme suit : 20 nM de siRNA de Beclin1 ou d'Atg5 (Cell Signaling) ou d'Arf6 (Dharmacon), sont rajoutés à 200 µl de milieu sans sérum auxquels sont additionnés 16 µl d'agent transfectant, l'interféline (Polyplus). Le mélange est laissé incubé pendant 10 min à température ambiante, avant d'être transféré sur les cellules. Puis, après 48h, après avoir vérifié la transfection par western blot, les

cellules sont placées en normoxie ou en hypoxie pendant 16h, puis plusieurs tests sont effectués (XTT, numération, recherche du clivage de la PARP par western blot).

Les M059J se sont révélées sensibles à cette technique de transfection. Cela nous a conduit à les transférer à l'aide du Kit T Amaxa Cell Line Nucleofactor (Lonza). Pour cela, les cellules sont décollées, mélangées avec du nucleofactor et laissées au repos pendant 15 min à RT. Ensuite, le mélange subit une électroporation d'environ 2 secondes avant qu'il ne soit ensemencé dans une plaque 6 puits.

III. Etude transcriptomique

Les transcrits des neurotrophines ainsi que de leurs récepteurs ont été quantifiés par RT-PCR quantitative.

III.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction d'ARN est réalisée sur des culots cellulaires stockés à -80°C des lignées étudiées dans différentes conditions de culture. Le kit Qiagen (RNAeasy kit, Qiagen) a été utilisé pour cette extraction et les instructions du fabricant ont été suivies. A la dernière étape d'extraction, les ARN sont élués dans 30 µL d'eau « RNase free » et dosés par spectrophotométrie (Nanodrop, ThermoScientist) à 260 nm. Les acides nucléiques (ADN et ARN) absorbent à 260 nm, les protéines à 280 nm et les polysaccharides à 230 nm, les rapports d'absorbance 260/280 et 260/230 sont alors calculés, afin de vérifier la pureté des ARN extraits, qui est convenable quand les ratios sont proches de 2.

III.2. Transcription inverse des ARN

Les ARN ainsi extraits sont transformés et amplifiés en ADN complémentaire (ADNc) par RT-PCR. Cette étape est réalisée à l'aide du Kit Applied Biosystem, où 2 µg d'ARN sont dilués dans de l'eau « nuclease free » (volume final de 10 µl) auxquels sont rajoutés 10 µl du mélange. Il contient 2,5 U d'enzyme (MultiScribe™ Reverse Transcriptase), dans son tampon (RT Buffer), un mélange d'hexamères aléatoires (Random Primers) et 4 mM de nucléotides (mélange de dNTP) dilués dans de l'eau « nuclease free ». Le mélange réactionnel (20 µl) est placé dans un Thermocycler (VWR). Les hexamères aléatoires sont d'abord hybridés par une incubation de 10 min à 25°C, ceci évite un éventuel décrochage des oligonucléotides de l'ADN matrice au cours de l'étape suivante. Ensuite, une incubation de 2h à 37°C est réalisée pour permettre la fixation des oligonucléotides, ainsi que la synthèse de l'ADN. Enfin, la réaction est terminée par une incubation de 5 min à 85°C afin de d'inactiver la reverse transcriptase, qui pourrait inhiber l'action de la PCR quantitative.

III.3. PCR quantitative (qPCR)

Les ADNc résultants de la RT-PCR, sont dilués afin de pouvoir en prélever au minimum 4 µl. La réaction de qPCR est réalisée en plaque de 96 puits, chaque puits contient 100 ng d'ADNc et 1X du mix de la réaction. Le mix utilisé correspond au master mix Taqman rapide (TaqMan® Fast Advanced Master Mix, Life Technologies) contenant la Taq polymérase (AmpliTaq® Fast DNA Polymerase), des dNTP avec des dUTP ainsi qu'un tampon de réaction. 0,4 µM des amorces sens et anti-sens ainsi que 0.4 µM des sondes sont rajoutés au mix (voir figure 13 résumant le principe d'une qPCR réalisée à l'aide d'une sonde Taqman).

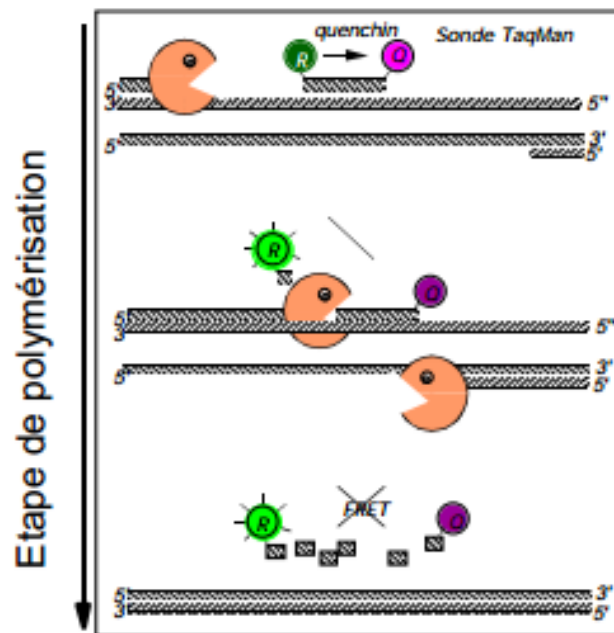


Figure 13 : Représentation de la réaction Taqman™.

La sonde Taqman est spécifique d'une partie interne du fragment d'ADN amplifié. Elle est marquée en 5' par une molécule fluorescente appelée « Reporter R » et en 3' par une autre molécule fluorescente appelée « Quencher Q ». Le spectre d'émission du Reporter chevauche le spectre d'excitation du Quencher. De par sa proximité, le Quencher absorbe la fluorescence du Reporter. Au cours de la polymérisation, l'activité exonucléase 5' → 3' de la Taq Polymérase dégrade la sonde Taqman libérant ainsi le Reporter qui augmente son émission de fluorescence. La dégradation de la sonde est proportionnelle à l'augmentation de la fluorescence, au nombre de copies d'ADN effectué et à la quantité d'ADN matrice présente au début de la réaction. D'après ©Généthon, 2001, www.genethon.fr.

Les séquences des amorces sens et anti-sens, ainsi que les sondes utilisées pour amplifier les différents gènes sont indiquées dans le Tableau 9.

Gènes (protéines)		Séquences
BDNF (BDNF)	Sens	5'-GGCTATGTGGAGTTGGCATT-3'
	Anti-sens	5'-CAAAACGAAGGCCTCTGAAG-3'
	Sonde	5'- ATTTCTGAGTGGCCATCCCAAGGTCTAG -3'
NGF (NGF)	Sens	5'-AGCTTTCTATCCTGGCCACA-3'
	Anti-sens	5'-ATACAGGCGGAACCACTC-3'
	Sonde	5'- AGGTGCATAGCGTAATGTCCATGTTGTTCT -3'
NTF3 (NT-3) Variant 1	Sens	5'-GTGGGGGAGACTTTGAATGA-3'
	Anti-sens	5'-GGTGAACAAGGTGATGTCCA-3'
	Sonde	5'- GCCATGGTTACTTTTGCCACGATCTTAC -3'
NTF3 (NT-3) Variants 1 et 2	Sens	5'-TGGCATCCAAGGTAACAACA-3'
	Anti-sens	5'-TAACGTCCACCATCTGCTTG-3'
	Sonde	5'- TCCCTCATTATTAAGCTGATCCAGGCAGAT -3'
NTRK1 (TrkA)	Sens	5'-CAGGGACTGGTGGTCAAGAT-3'
	Anti-sens	5'-CGAGAGCATCCTGTACCGTA-3'
	Sonde	5'- TATCTACAGCACCGACTATTACCGTGTGGG -3'
NTRK2 (TrkB 145) Variant 1	Sens	5'-CTGGTGA AAAATCGGGGACT-3'
	Anti-sens	5'-AGGAAATTCACGACGGAAAG-3'
	Sonde	5'- TGTACAGCACTGACTACTACAGGGTCCGGTG -3'
NTRK2 (TrkB 95) Variant 2 (Tronqué)	Sens	5'-AAGATCCCCTGGATGGGTA-3'
	Anti-sens	5'-GGAAGTGCTGCTTATCTGGG-3'
	Sonde	5'- ATAAAGGAAAAGACAGAGAAAGGGGCTGTG -3'
NTRK3 (TrkC) Variants 1, 2 et 4	Sens	5'-TGAGAACCCCACTACTTCC-3'
	Anti-sens	5'-GAGAAGTGGGTGAGGGAGC-3'
	Sonde	5'- CGTATGTGCACATTAAGAGGAGAAGACA -3'
NTRK3 (TrkC) Variant 3 (Tronqué ou T1)	Sens	5'-TCCAGAGTGGGGAAGTGTCT-3'
	Anti-sens	5'-CATGACGTCTTTGCTGAAA-3'
	Sonde	5'- ATTCCAAGCTCTTAACCATGGCATCTATG -3'
NGFR (p75^{NTR})	Sens	5'-CACCACCGACAACCTCATC-3'
	Anti-sens	5'-AAGCAGAACAAGCAAGGAGC-3'
	Sonde	5'- CCTACATAGCCTTCAAGAGGTGGAACAGCT -3'

Tableau 9 : Séquences d'amorces Sens et anti-sens ainsi que les sondes utilisées pour amplifier les gènes d'intérêt.

Dans notre travail, toutes les sondes Taqman utilisées sont couplées en 5' avec le 6-CarboxyFluorescien ou 6FAM (Reporter) et en 3' par le Minor groove Binder-Non Fluorescent Quencher ou MGBNFQ (Quencher). Le gène de référence utilisé est le *HPRT1* (Life Technologies). En effet, d'autres gènes de référence comme *18S* et *GAPDH* ont été également testés au cours des cinétiques d'hypoxie effectuées. Cependant, leurs niveaux d'expression étant trop variables seuls les résultats du *HPRT1* ont été pris en considération.

La réaction de qPCR est réalisée à l'aide du StepOne™ System (Life Technologies). Le programme d'amplification effectué commence par une première dénaturation à 95°C pendant 12 s, cette étape sert également à activer la Taq polymérase (enzyme dite « Hot Strat »). Elle est suivie de 40 cycles comprenant chacun une dénaturation à 95°C de 2 s, suivie d'une hybridation des amorces et sondes à 60°C pendant 20s.

III.4. Analyses des résultats de la qPCR : Calcul des RQ (Relative Quantities)

Au fur et à mesure des cycles de la qPCR, les sondes sont dégradées ce qui est à l'origine d'émission de fluorescence. Un seuil de fluorescence est établi par la StepOne. Quand celui-ci est dépassé, un nombre de cycles PCR appelé "Ct" pour "Cycle Threshold" ou cycle seuil est déterminé. Cela permet de calculer le dCt de chaque échantillon : $dCt = Ct$ (gène d'intérêt) – Ct (gène de référence), puis le ddCt : $ddCt = dCt$ (condition contrôle) – dCt (condition traitée), enfin le RQ ou Relative Quantity de chaque échantillon : $RQ = 2^{-ddCt}$.

III.5. Extraction des ARN totaux à partir des tumeurs de patients atteints de GBM

Les tumeurs (30 mg au maximum), sont d'abord broyées dans des tubes contenant des billes et le tampon de lyse (RLT du kit Qiagen). Le broyage est effectué avec un broyeur-homogénéiseur (Percellys[®]) à 5500 rpm pendant 20s. Ce programme est répété 4 fois afin de s'assurer que tout est bien broyé. Ensuite, l'extraction est complétée avec le kit Qiagen selon les instructions du fabricant.

IV. Etude protéomique

IV.1. Western Blotting (WB)

IV.1.a. Extraction des protéines totales en condition dénaturants

L'extraction des protéines totales est réalisée sur les culots cellulaires préalablement stockés à -80°C. Les cellules subissent une lyse chimique dans le tampon de lyse Cell lysis buffer (Cell Signaling Technology) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Sigma-Aldrich) et de 2 mM de PMSF, pendant 30 min sur la glace. La lyse chimique est ensuite complétée par sonification paramétrée à 60 Hz, amplitude 2 s, pendant 1 minute. Puis, les lysats sont centrifugés à 14 000 g pendant 25 min à 4°C, le surnageant contenant les protéines est transféré dans un tube stérile. Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford avec un réactif de même nom (Sigma-Aldrich) à 595 nm en référence à une gamme étalon contenant de la BSA.

IV.1.b. Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Des aliquotes de 30 à 60 µg de protéines sont mélangées à un volume identique de tampon d'échantillon 2X (Laemli Buffer, Biorad). Ce tampon contenant du SDS confère à toutes les protéines une même charge négative, et leur séparation se fera donc selon uniquement leurs poids moléculaires. Le tampon est additionné d'environ 20% de β-

mercaptoéthanol, puis la dénaturation de ces dernières est complétée par une incubation pendant 5 min à 95°C. Ensuite, les protéines sont séparées sur un gel d'électrophorèse pré-coulé SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel, Biorad). Il s'agit d'un gel sur gradient de 4 à 15% de concentration en acrylamide permettant ainsi la bonne séparation de toutes les protéines de tous les poids moléculaires. Après dépôt des échantillons, la migration se fait à l'aide du Trans-Blot® (Biorad), pendant environ 45 min à 150 V dans le tampon de migration (Biorad). Un marqueur de poids moléculaire est utilisé à chaque migration (PageRuler Prestained Protein Ladder 10-170K, Fisher Scientific).

Une fois séparées par électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Polyvinylidène difluoride) ayant des pores de 0,2 µm (Biorad). Les papiers Wattman sont imbibés dans du tampon de transfert (Biorad). Ceux-ci, ainsi que la membrane situés du côté Anode sont déposés en premier dans la cassette de transfert, suivis par le gel et finalement les papiers Wattman situés sur le côté Cathode. Le transfert s'effectue à l'aide de l'appareil TransBlot® Turbo™ Transfer System (Biorad) pendant 7 min à 25 V / 1,3 A pour les protéines comprises entre 10 et 150 KDa et pendant 10 min à 25 V / 2,5 A pour les protéines au-delà de 150 KDa.

IV.1.c. Saturation de la membrane et incubation avec les anticorps

La membrane est saturée en ajoutant à température ambiante pendant au moins 30 min une solution du TBS 1X contenant 0,1% de tween-20 (0,1%) et 5% de lait écrémé ou 5% de BSA quand il s'agit de la recherche de protéines phosphorylées. L'immunomarquage est réalisé en incubant pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire, dirigé contre les épitopes spécifiques des protéines d'intérêt (Tableau 10). Après trois lavages dans du tampon TBS 1X-Tween 20 (0.1%), la membrane est incubée pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire adéquat couplé à la peroxydase (Tableau 11). La membrane est ensuite lavée 3 fois avec du TBS 1X-Tween 20 (0.1%).

Anticorps	Fournisseur	Référence	Espèce	Utilisation	PM (KDa)
Akt	Cell Signaling	2920	Lapin	1/2000 ^e	60
Phospho-Akt (S473)	Cell Signaling	9271	Lapin	1/2000 ^e	60
Arf6	Cell Signaling	5740	Souris	1/1000 ^e	19
Atg5-Atg12	Cell Signaling	2630	Lapin	1/1000 ^e	55
Beclin-1	Cell Signaling	3738	Lapin	1/1000 ^e	60
BNIP3	Thermo	MA1-24688	Souris	1/100 ^e	60
ERK1/2	R&D	AF1576	Lapin	1 µ/ml	43/44
Phospho-ERK1(T202/204)/ERK2(T185/187)	R&D	MAB1018	Souris	0.5 µ/ml	43/44
LC3 I/II	Cell Signaling	2775	Lapin	1/1000 ^e	16/14
mTOR	Cell Signaling	2972	Lapin	1/1000 ^e	289
Phospho-mTOR (S2448)	Cell Signaling	2971	Lapin	1/1000 ^e	289
NT-3/pro-NT-3	Santa Cruz	sc-547	Souris	1/200 ^e	14/34
p38 MAPK	Cell Signaling	8690	Lapin	1/1000 ^e	38
Phospho-p38 MAPK (T180/Y182)	Cell Signaling	4511	Lapin	1/1000 ^e	38
PARP-1/PARP-1 clivée	Santa Cruz	sc-8007	Souris	1/200 ^e	116/89
SAP/JNK	Cell Signaling	9258	Lapin	1/1000 ^e	43/57
Phospho-SAP/JNK	Cell Signaling	4668	Lapin	1/1000 ^e	43/57
SQSTM1/p62	Cell Signaling	5114	Lapin	1/1000 ^e	62
Tubuline-α	Santa Cruz	sc-23948	Souris	1/5000 ^e	55
TrkC/TrkC tronqué	R&D	MAB3731	Souris	1µg/ml	145/60
Phospho-TrkC (Y820)	Abcam	ab79811	Mouton	1/1000 ^e	145

Tableau 10 : Anticorps primaires utilisés en western blot. PM : Poids Moléculaire.

Anticorps secondaires	Hôte	Société	Référence	Utilisation
Anti-IgG de souris HRP	Chèvre	Dako	P0448	1/1000 ^e
Anti-IgG de Lapin HRP	Chèvre	Dako	P0447	1/1000 ^e
Anti-IgG de mouton HRP	Lapin	Dako	P0163	1/1000 ^e

Tableau 11 : Anticorps secondaires utilisés en western blot. HRP : HoRse Peroxydase

IV.1.d. Révélation par chimioluminescence

La révélation du western blot est effectuée par chimioluminescence. La réaction repose sur l'oxydation du luminol par l' O_2 , produit par l'action de la peroxydase sur l' H_2O_2 . La membrane est mise en contact pendant 1 minute avec le mélange du kit Immobion Blot (Millipore) dans les proportions 1:1 (luminol : H_2O_2). Il se forme un composé intermédiaire instable qui, en revenant à l'état stable, émet de la lumière. Celle-ci est captée par la caméra de la G-box (Ozyme) et apparaît sous forme de bandes plus ou moins intenses. Les images numériques obtenues à partir des révélations des western-blot sont traitées à l'aide du logiciel d'analyse d'image (Genesnap, Syngene), puis semi-quantifiées par le logiciel Image j (NIH).

IV.2. ImmunoFluorescence Indirecte (IFI)

Les cellules sontensemencées en Labtek (Thermo Fisher) contenant 8 puits en plastique ou en verre, de $0,7\text{ cm}^2$ de surface. Après chaque condition de culture ou de traitement, les cellules sont fixées avec de la PFA (paraformaldéhyde) à 4% pendant 10 min à température ambiante en cas d'analyse de protéines membranaires et fixées/perméabilisées par du méthanol glacial pendant 5 min en cas d'analyse de protéines intracellulaires. Ensuite, le tapis cellulaire est lavé 3 fois avec du PBS.

Les anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêts (Tableau 12) sont incubés une nuit à 4°C dans une solution de PBS contenant 3 % de BSA. Puis, trois lavages de 5 min en PBS sont effectués. L'incubation de l'anticorps secondaire couplé à un Alexa fluor 488® (Fluorescence verte) ou un Alexa fluor 594® (Fluorescence rouge, Tableau 8) a lieu pendant 2 h à température ambiante dans la solution de PBS-BSA. Après trois lavages en PBS, les noyaux cellulaires sont marqués par le DAPI ($0,1\ \mu\text{g}/\text{ml}$; Fisher Scientific). A la fin des marquages, les puits sont retirés et la préparation cellulaire est recouverte de quelques gouttes du liquide de montage (Aequous Mounting Medium, Dako). Les lames sont placées à 4°C , avant d'être observées en microscopie confocale (LSM 510 Zeiss, équipé de laser Hélium/Néon et Argon (grossissement 40X ou 63X : pour la GFP-LC3) ou en épifluorescence (Visiolab 2000, pour le TrkC). Les images sont traitées avec le logiciel Image J (NIH).

Anticorps primaires	Société	Référence	Espèce	Dilution	Incubations
GFP	Cell Signaling	2555	Lapin	1/100 ^e ; PBS-BSA 5%	ON ; 4°C
TrkC	R&D	MAB3731	Souris	1/100 ^e ; PBS-BSA 3%	ON ; 4°C
Anticorps secondaires	Société	Référence	Hôte	Dilutions	Incubations
Alexa fluor 488®	Life Technologies	A10266	NC	1/500 ^e	2h ; RT
Alexa fluor 594®	Life Technologies	A10270	NC	1/500 ^e	2h ; RT

Tableau 12 : Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence, ainsi que les conditions de dilution et d'incubation.

« RT : Room Temperature », ON : OverNight, NC : Non Communiqué.

IV.3. ImmunoHistoChimie (IHC) (tumeurs incluses en paraffine)

Des tumeurs incluses en blocs de paraffine nous ont été fourni par la tumorotheque du CHU de Limoges. Ces prélèvements correspondent soit à des GBM soit à une tumeur bénigne du cerveau appelée Cavernome. Les tissus sont coupés au microtome puis déposés sur lames (cette préparation a été gracieusement réalisée par des techniciens du service d'anatomopathologie).

1) Prétraitement des lames

Les tissus sont d'abord réhydratés dans 2 bains de toluène de 5 min, suivis de 2 bains d'éthanol absolu de 5 min. Les lames sont ensuite plongées dans du PBS. Une étape de démasquage des antigènes cytosoliques est réalisée par immersion dans du tampon citrate de pH 6 (1,8 mM d'acide citrique + 2,8 mM de citrate de sodium), suivie de 3 (antigène cytosolique) ou 4 cycles (antigène nucléaire) de 5 min aux micro-ondes à 750 W. Les lames sont laissées refroidir puis plongées dans du PBS.

2) Inhibition des peroxydases endogènes et saturation des sites aspécifiques

Comme les anticorps secondaires qui seront utilisés sont couplés à la peroxydase, il est important d'inhiber les peroxydases endogènes. Cette étape est effectuée pendant 10 min dans de l'eau oxygénée (H₂O₂) contenant 5% de méthanol ; les lames sont ensuite lavées dans un bain d'eau distillée puis de PBS. Les limites des coupes sont délimitées à l'aide du DAKO Pen (encre hydrophobe) et une saturation des sites antigéniques aspécifiques des tissus est réalisée pendant 30 min dans du PBS contenant 3% de BSA.

3) Incubation avec les anticorps primaires et secondaires

Les anticorps primaires et secondaires utilisés, ainsi que leurs conditions d'incubation sont représentés dans le tableau 13. Deux lavages au PBS sont réalisés avant et après l'incubation de l'anticorps secondaire.

Anticorps primaires	Référence	Espèce	Société	Dilution	Incubation
BNIP3	PA5-11402	Rabbit	Thermo	1/50 ^e ; PBS-BSA 3%	ON ; 4°C
LC3B	0231-100	Souris	Nanotools	1/200 ^e ; PBS-BSA 3%	2h ; RT
TrkC	NBP2-15185	Rabbit	Novus Biologicals	1/50 ^e ; PBS-BSA 3%	ON ; 4°C
NT3	AF-267-NA	Chèvre	R&D	1/50 ^e ; PBS-BSA 3%	ON ; 4°C
Anticorps secondaires	Référence	Hôte	Société	Dilution	Incubations
Polymère-HRP anti-Souris	K4006	NC	Dako	/	30 min ; RT
Polymère-HRP anti-Lapin	K4002	NC	Dako	/	30 min ; RT
Polymère-HRP anti-Chèvre	MP-7405	NC	Vector Laboratories	/	30 min ; RT

Tableau 13 : Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunohistochimie, ainsi que les conditions de dilution et d'incubation.

« RT : Room Temperature », ON : OverNight, HRP : HoRse Peroxydase, NC : Non Communiqué.

4) Réaction enzymatique

Après lavages au PBS, les coupes sont incubées avec un substrat chromogène de la peroxydase, le 3,3'-DiAminoBenzidine ou DAB. Cette incubation varie en fonction de l'intensité du marquage, pouvant aller de 5 s à quelques min. La réaction enzymatique est immédiatement arrêtée par lavage intense des lames dans l'eau courante.

5) Contre-coloration à l'hématoxyline

Les lames sont plongées pendant 10 s dans une solution d'hématoxyline aqueuse, pour colorer les noyaux. Un lavage intense est ensuite effectué dans l'eau courante. Puis les coupes sont incubées dans un bain de carbonate de lithium permettant de bleuir la coloration (contraste), avant d'être lavées intensément dans l'eau courante.

6) Déshydratation et montage

Les coupes sont déshydratées dans 2 bains d'éthanol absolu, suivis de 2 bains de toluène. Ensuite, les tissus sont couverts avec le milieu de montage Coverquick (Labonord). Le séchage a lieu dans l'obscurité à température ambiante avant l'analyse au microscope inversé en lumière blanche.

Résultats

1^{ère} partie : Etudes in-vitro : Effet de l'hypoxie sur des lignées de GBM humain

I. Recherche de mutations et/ou altérations géniques dans les lignées étudiées

Avec l'aide du service d'anatomo-pathologie du CHU de Limoges, nous avons cherché certaines mutations fréquemment rencontrées dans le GBM, dont les plus importantes sont représentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 14). Les copies d'une même séquence dans les gènes d'intérêt ont été dénombrées par la technique MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), MRC-Holland. Il s'agit d'une variante de la PCR multiplexe, qui utilise une sonde divisée en deux, nécessitant la liaison des deux parties pour que l'amplification ait lieu.

Gènes	U87MG	M059K	M059J
<i>IDH1</i>	-	-	-
<i>IDH2</i>	Mutation Exon 4 R172M	-	Amplification Exon 10 + Exon 2
<i>TP53</i>	-	-	Amplification Exon 8
<i>EGFR</i>	Non recherché	-	Amplification Exon 2
<i>PTEN</i>	Non recherché	-	Amplification Exon 6

Tableau 14 : Recherche de mutations/altérations géniques dans les lignées de GBM étudiées.

L'ADN génomique des trois lignées cellulaires (U87MG, M059K et M059J) a été analysé par MLPA, MRC-Holland pour rechercher les principales mutations génétiques décrites dans le GBM.

II. Expression de BNIP3

Un stress hypoxique (1% de dioxygène) a été appliqué aux trois lignées cellulaires issues de GBM humain : les U87MG, les M059K et les M059J, pour des temps allant de 4 à 16h. Afin de vérifier le stress hypoxique, nous avons évalué par western blot le taux d'expression d'une cible transcriptionnelle du facteur de transcription HIF-1 (stabilisé en réponse à l'hypoxie) : le BNIP3 (Figure 14).

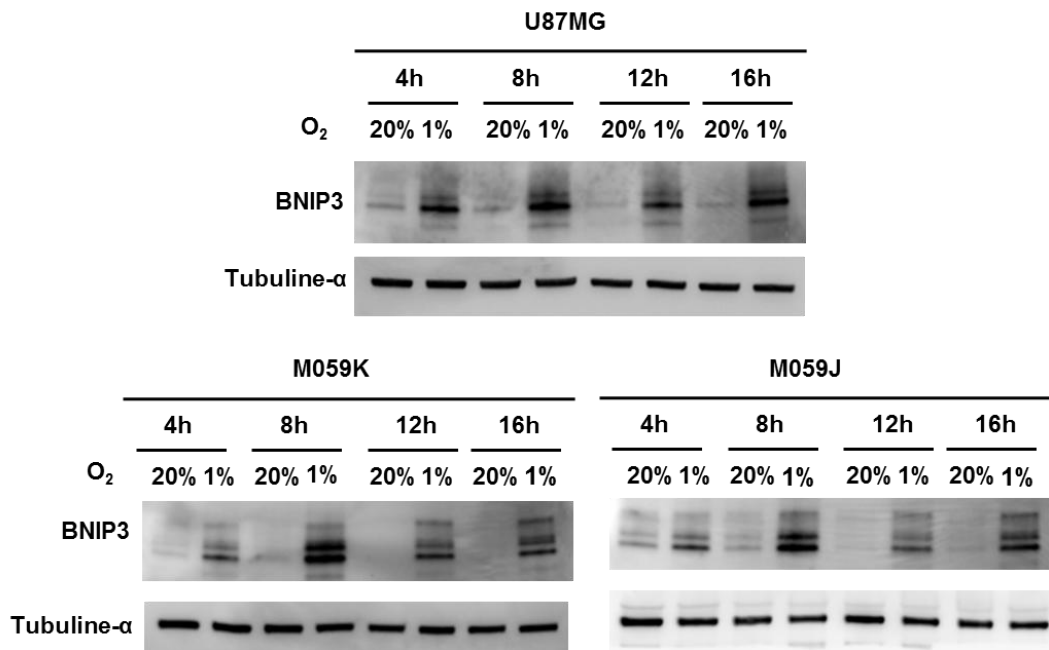


Figure 14 : Effet de l'hypoxie sur l'activité transcriptionnelle d'HIF-1.

L'expression de la protéine BNIP3 a été recherchée par western blot dans les cellules U87MG, M059K et M059J cultivées ou non en hypoxie pendant une cinétique allant de 4 à 16h. L'expression de la tubuline permet de vérifier la quantité de protéines déposée. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

III. Effet de l'hypoxie sur la viabilité cellulaire et l'activité déshydrogénase mitochondriale des lignées U87MG, M059K et M059J

Nous avons évalué les effets de l'hypoxie sur l'activité déshydrogénase mitochondriale (test XTT) et la viabilité des cellules des lignées U87MG, M059K et M059J. Le test XTT a été effectué sur des cellules cultivées en condition habituelle d'oxygénation (20% de dioxygène) ou suite à un stress hypoxique de 4, 8, 12 et 16 heures (Figure 15A). La viabilité cellulaire en conditions de normoxie et d'hypoxie a également été quantifiée (Figure 15B).

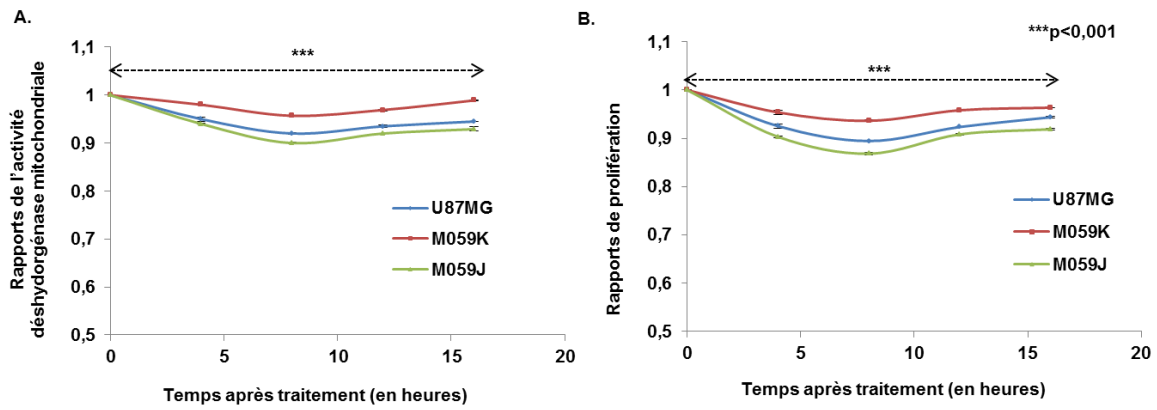


Figure 15 : Effet de l'hypoxie sur les cellules U87MG, M059K et M059J.

Les cellules ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant une cinétique allant de 4 à 16h, puis l'activité déshydrogénase mitochondriale a été évaluée par un test XTT (A) et la viabilité cellulaire a été déterminée par une numération en présence du bleu trypan (B). Les rapports moyens Hypoxie/Normoxie de trois expériences indépendantes sont représentés. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test PLSD de Fisher, où une comparaison entre les conditions normoxiques et hypoxiques a été effectuée pour chaque temps. La valeur de p est indiquée.

L'hypoxie induit une diminution progressive de l'activité déshydrogénase mitochondriale à 4h et 8h d'hypoxie dans les 3 lignées cellulaires (figure 15A). Puis, l'activité déshydrogénase mitochondriale ré-augmente tout en restant inférieure à celle des cellules cultivées en normoxie.

Les résultats obtenus par l'évaluation de la viabilité en présence de bleu trypan ont confirmé ceux obtenus avec le test XTT. En effet, le rapport nombre de cellules en hypoxie / nombre de cellules en normoxie a diminué dans les trois lignées cellulaires à 4h et 8h d'hypoxie (Figure 15B). Puis ce nombre augmente progressivement, montrant une adaptation des cellules. Cette diminution du nombre de cellules cultivées en hypoxie n'est à priori pas due à une mort cellulaire (très peu voire pas de cellules ayant incorporé le bleu trypan), mais plutôt à un retard de prolifération.

IV. Effet de l'hypoxie sur les signalisations cellulaires

IV.1. Effet de l'hypoxie sur l'apoptose

Le glioblastome est connu pour sa forte résistance à l'apoptose, ce qui est en accord avec les résultats obtenus lors de la culture en condition hypoxique (Figure 15). Néanmoins, pour écarter toute activation de mort apoptotique, nous avons recherché par western blot le clivage de l'enzyme de polymérisation de l'ADN, la PARP (Poly ADP Ribose Polymérase) qui se produit lors d'une mort apoptotique dépendante des caspases (Figure 16).

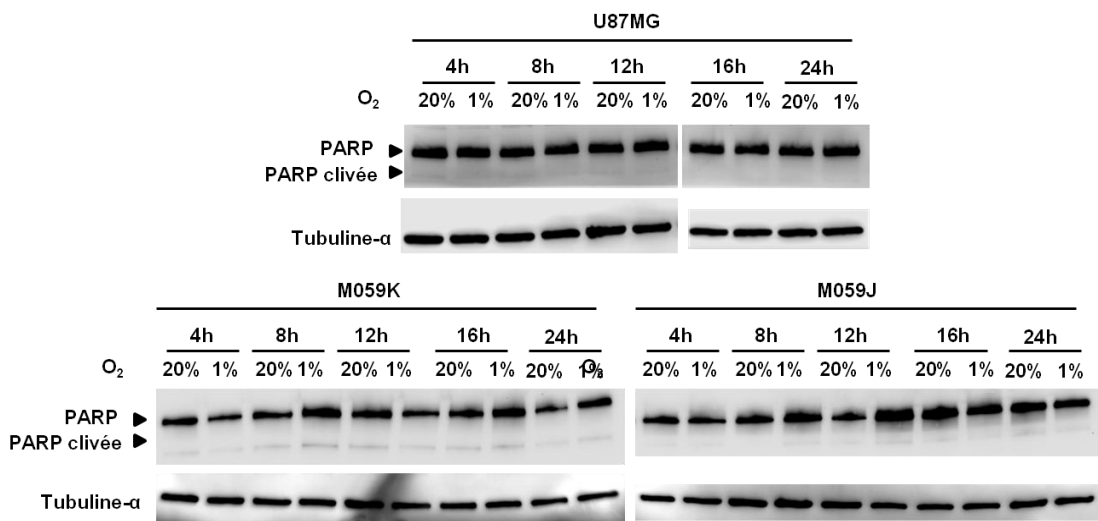


Figure 16 : Effet de l'hypoxie sur la mort apoptotique dépendante des caspases.

Les cellules U87MG, M059K et M059J ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant une cinétique allant de 4 à 24h. La PARP a été recherchée par western blot sous ses 2 formes (clivée ou non). Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Dans les trois lignées cellulaires, le clivage de la PARP était très faible voire absent tout au long de la cinétique que ce soit en normoxie ou en hypoxie. Cela signifie qu'il n'y a pas de mort apoptotique dépendante des caspases induite par l'hypoxie dans les trois lignées de glioblastome étudiées.

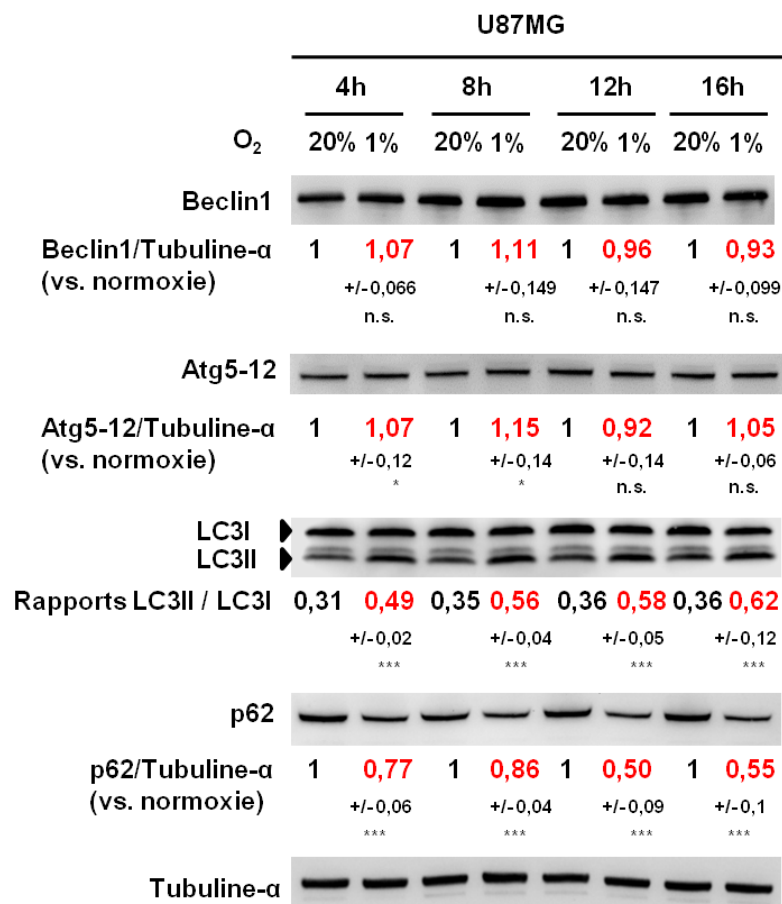
IV.2. Effet de l'hypoxie sur l'induction de l'autophagie

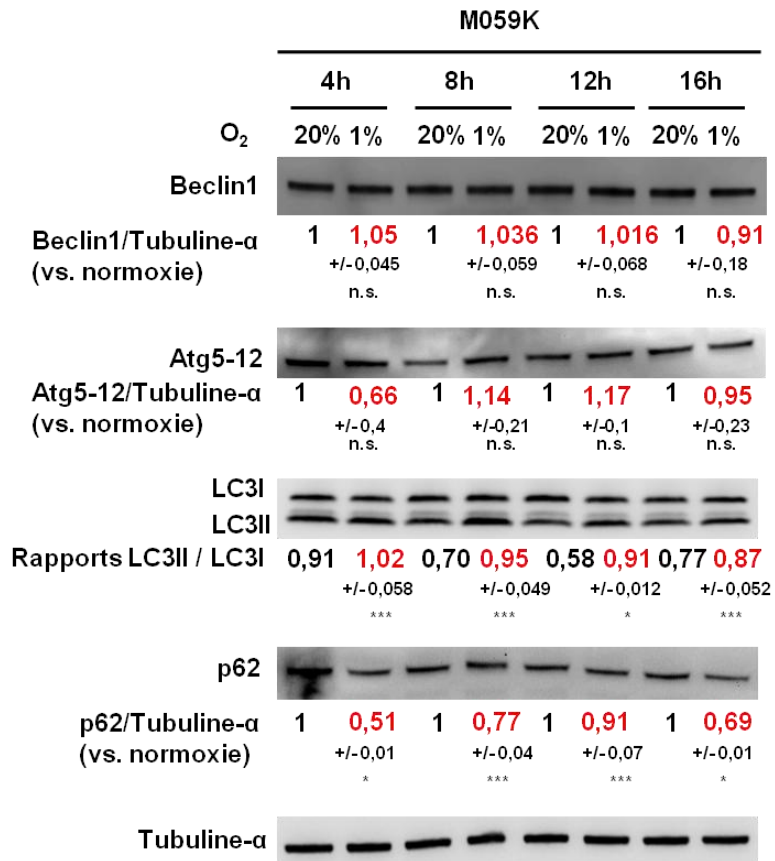
IV.2.a. Etude de l'expression de protéines clés du processus autophagique

Comme nous n'avons pas observé de mort apoptotique dépendante des caspases dans les trois lignées cellulaires étudiées, nous avons recherché différents acteurs de la signalisation autophagique dans ces lignées. La formation de l'autophagosome débute par l'association de Beclin1 avec une PI3K de classe III, complexe sur lequel viennent s'ajouter

des molécules de la famille Atg comme Atg5 et Atg12 permettant son élongation. Au cours de l'étape de nucléation, l'Atg8, appelée LC3 chez les mammifères, vient s'associer à la membrane autophagosomale, où elle passe d'une forme libre (LC3I) à une forme « lipidée » (LC3II), caractéristique du processus. La protéine cargo, p62, peut se lier aux substrats de l'autophagie et les conduire à l'autophagosome ; elle sera dégradée au cours du processus.

Nous avons cherché par western blot les acteurs Beclin-1, le complexe Atg5-12, la p62 et la LC3 sous ses formes libre et liée dans des cellules des lignées U87MG, M059K et M059J cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant une cinétique allant de 4 à 16h (Figure 17).





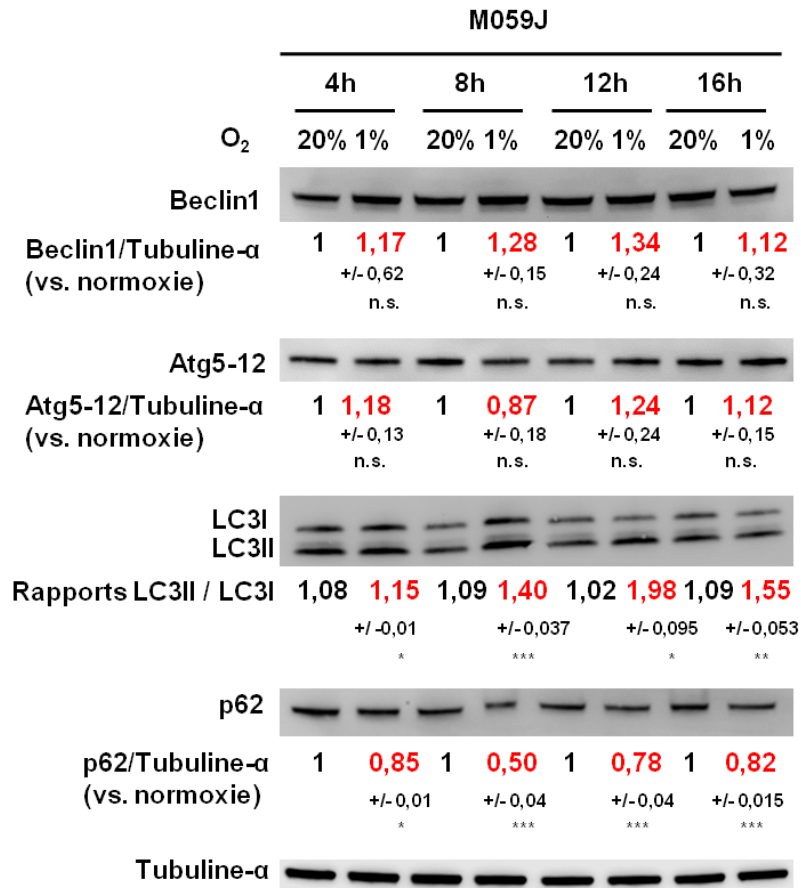


Figure 17 : Expression de Beclin1, d'Atg5-12, de p62 et de la LC3 dans les cellules U87MG, M059K et M059J.

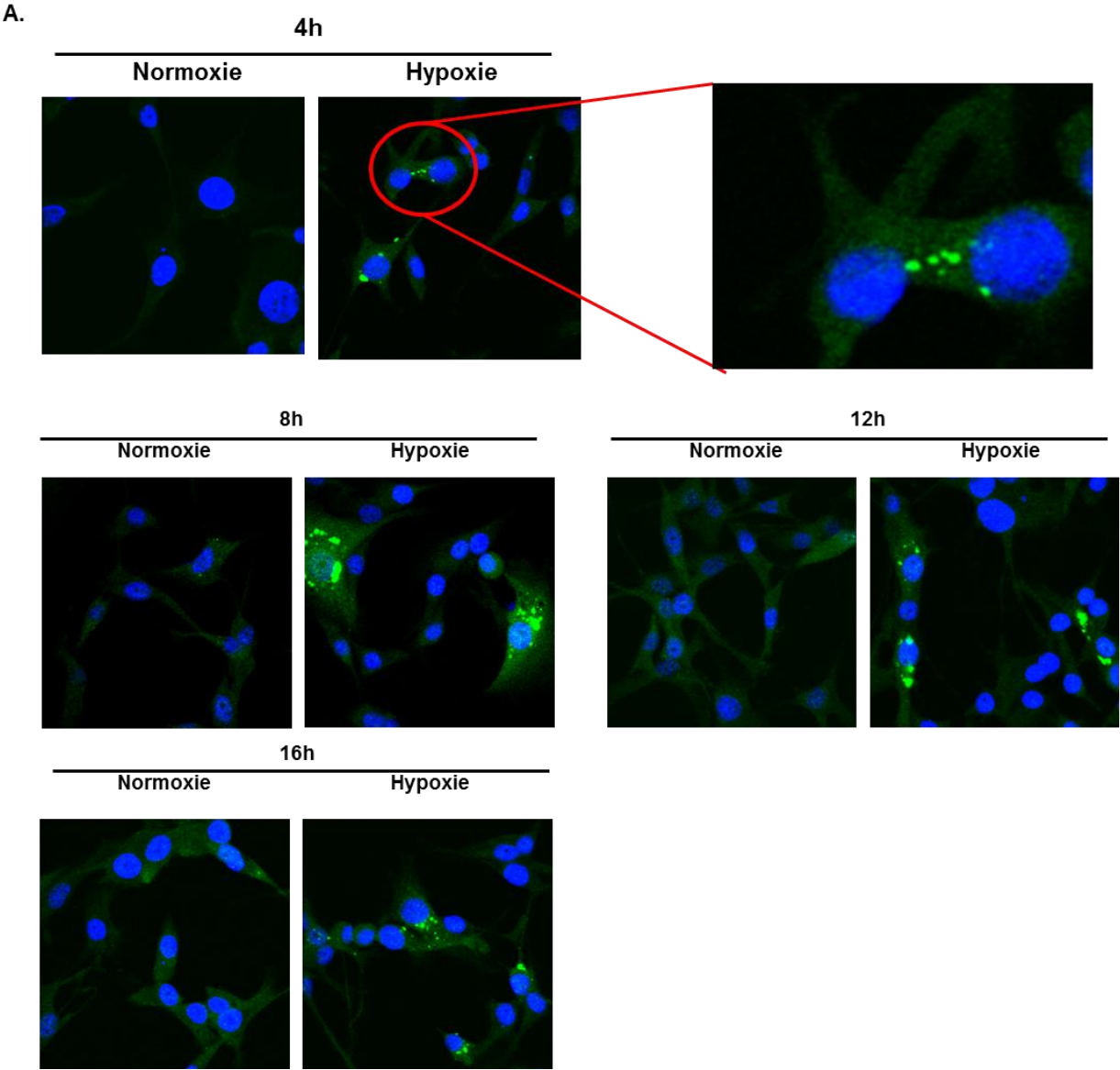
Les trois lignées cellulaires ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant une cinétique allant de 4 à 16h. Après extraction de protéines, un western blot avec des anticorps spécifiques a été réalisé. L'image est représentative d'au moins de trois expériences indépendantes, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$, n.s. = non significatif.

Suite une incubation des cellules en l'hypoxie, nous n'avons pas observé de variation majeure de Beclin1 en comparaison avec les cultures en normoxie. Pour le complexe Atg5-12, il augmente significativement à 4 et 8h d'hypoxie dans la lignée U87MG et ne varie pas significativement dans les 2 autres lignées cellulaires. La conversion de la MAP-LC3I (18KDa) en MAP-LC3II (16KDa) est plus importante à chaque temps d'hypoxie, signifiant l'induction de l'autophagie par l'hypoxie. Enfin, la protéine p62 est moins exprimée à chaque condition d'hypoxie, suggérant sa dégradation par autophagie (Figure 17).

IV.2.b. Visualisation des autophagosomes lors de la réponse à l'hypoxie

Pour confirmer l'induction de l'autophagie en réponse au stress hypoxique, les cellules des trois lignées cellulaires ont été transfectées de manière stable afin d'exprimer la protéine LC3 fusionnée à la GFP (Green Fluorescent Protein). Dans ce cas, la fluorescence punctiforme de la GFP reflète la formation d'autophagosomes (Figures 18, 19 et 20, A). Le

nombre de cellules présentant des autophagosomes (Figures 18, 19 et 20, B) ainsi que le nombre de vésicules par cellule ont été évalués (Figures 18, 19 et 20, C).



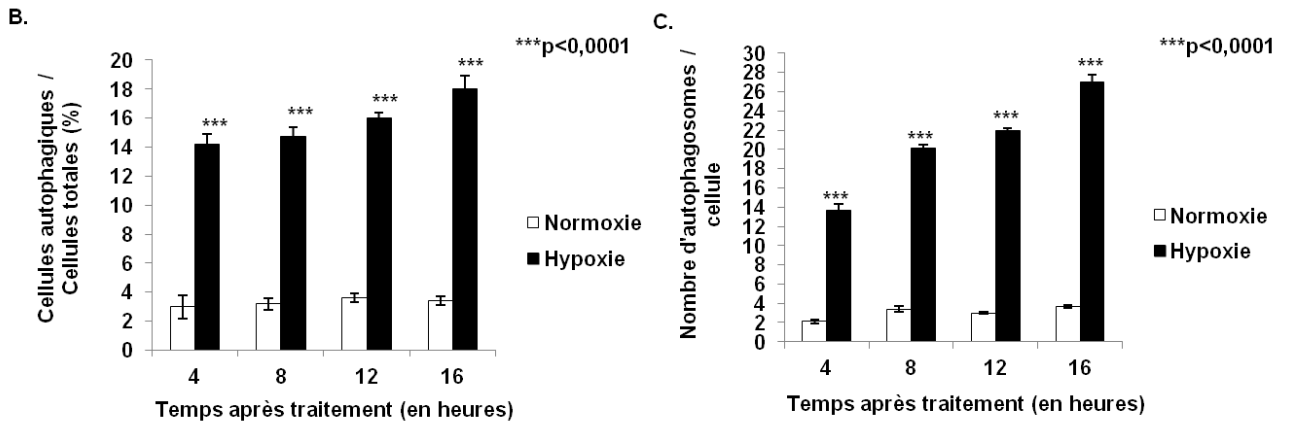
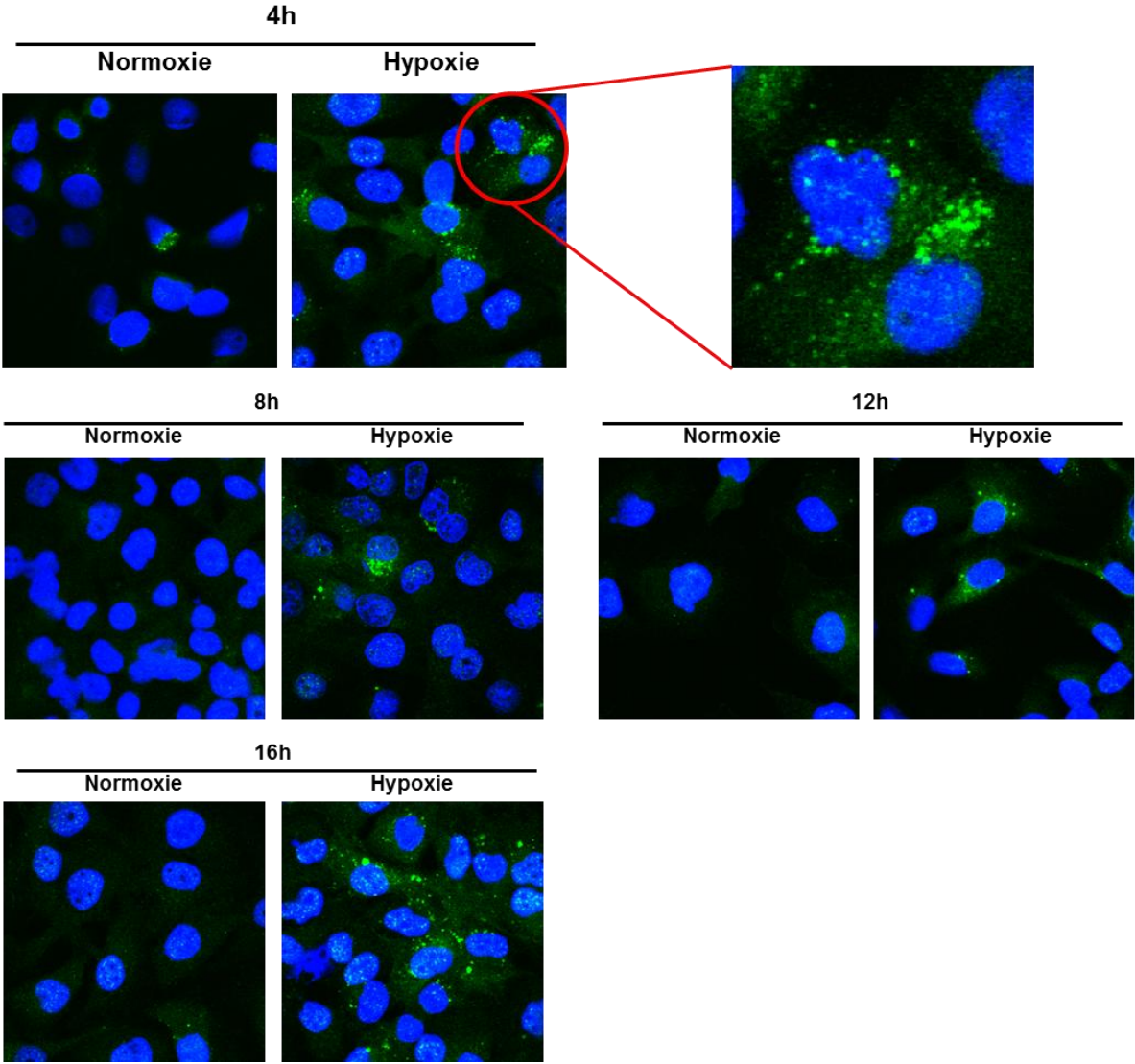


Figure 18 : Détection par microscopie confocale des vacuoles autophagiques dans les cellules U87MG.

Ces cellules ont été transfectées de manière stable avec le vecteur lentiviral pGFF-autophago-LC3, puis triées par cytométrie en flux. Elles ont été ensuite cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant une cinétique allant de 4 à 16h, puis incubées avec l'anti-GFP (autophagosomes, fluorescence verte) ; les noyaux ont été contre-colorés au DAPI. La présence d'organisation punctiforme de la MAP-LC3 fusionnée à la GFP (A) a été analysée par microscopie confocale (Grossissement x 62). Les rapports cellules autophagiques sur la totalité des cellules dans 10 champs pris au hasard a été calculé (B). La quantité d'autophagosomes présents dans chaque cellule autophagique a été évaluée (C). Les analyses statistiques ont été réalisées par un test PLSD de Fisher, où une comparaison entre les conditions normoxiques et hypoxiques a été effectuée pour chaque temps. La valeur de p est indiquée.

A.



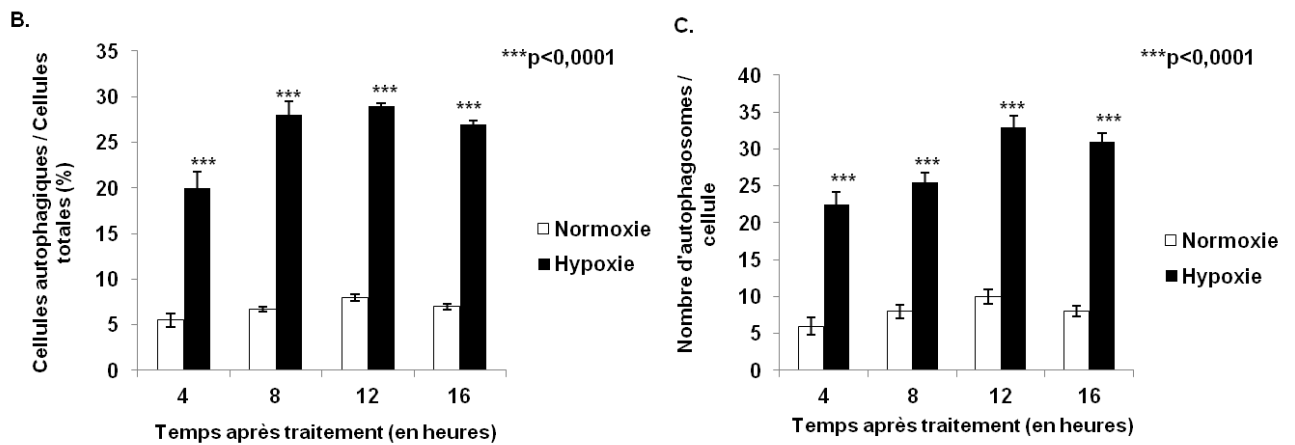
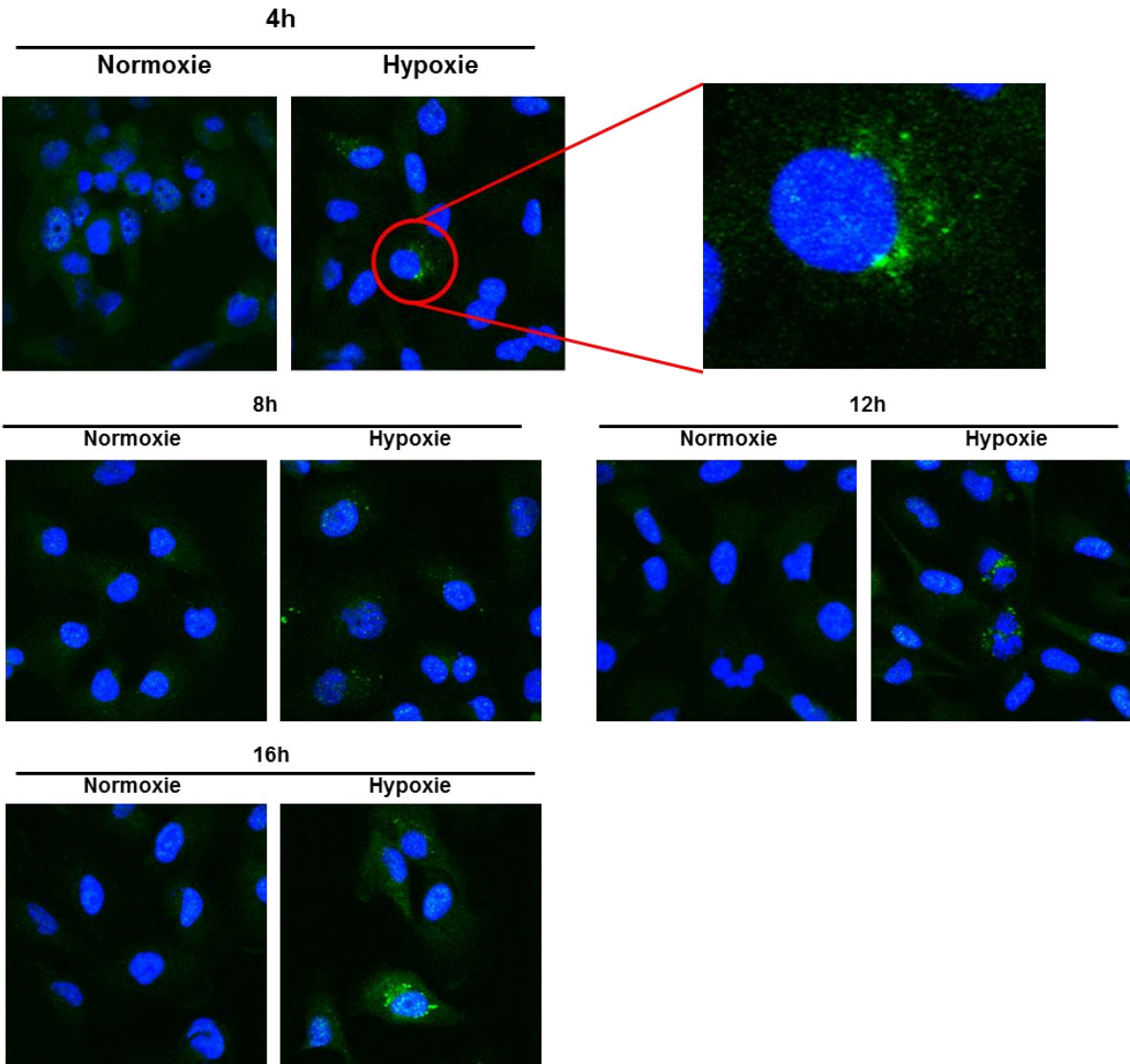


Figure 19 : Détection par microscopie confocale des vacuoles autophagiques dans les cellules M059K.

Les cellules M059K ont été transfectées de manière stable avec le vecteur lentiviral pGFF-autophago-LC3, puis triées par cytométrie en flux. Elles ont été ensuite cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant une cinétique allant de 4 à 16h, puis incubées avec l'anti-GFP (autophagosomes, fluorescence verte) ; les noyaux ont été contre-colorés au DAPI. Les cellules ont été analysées par microscopie confocale pour détecter la présence d'organisation punctiforme de la MAP-LC3 fusionnée à la GFP (A) (Grossissement x 62). Ensuite, les rapports nombre de cellules autophagiques sur la totalité des cellules dans 10 champs pris au hasard a été calculé (B). La quantité d'autophagosomes présents dans chaque cellule autophagique a été évaluée (C). Les analyses statistiques ont été réalisées par un test PLSD de Fisher, où une comparaison entre les conditions normoxiques et hypoxiques a été effectuée pour chaque temps. La valeur de p est indiquée.

A.



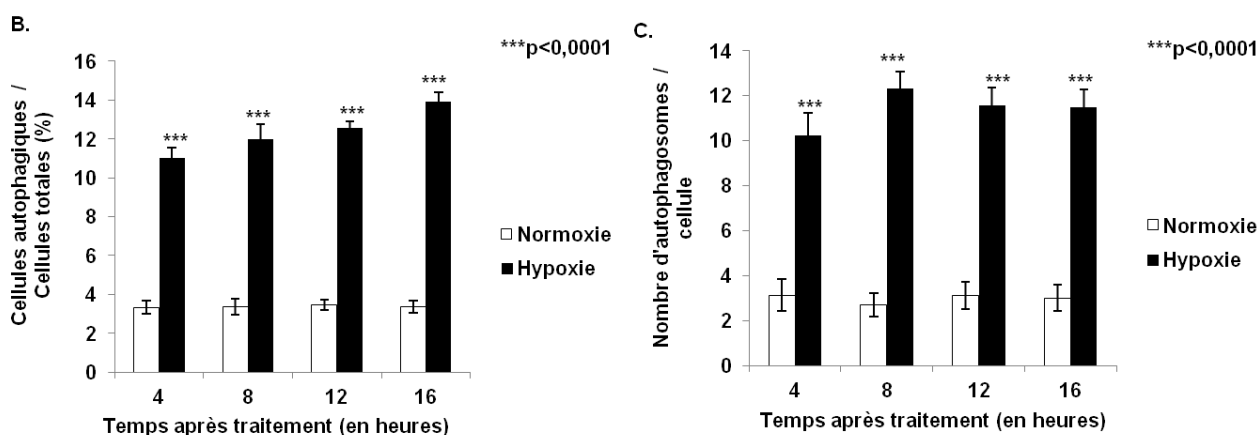


Figure 20 : Détection par microscopie confocale des vacuoles autophagiques dans les cellules M059J.

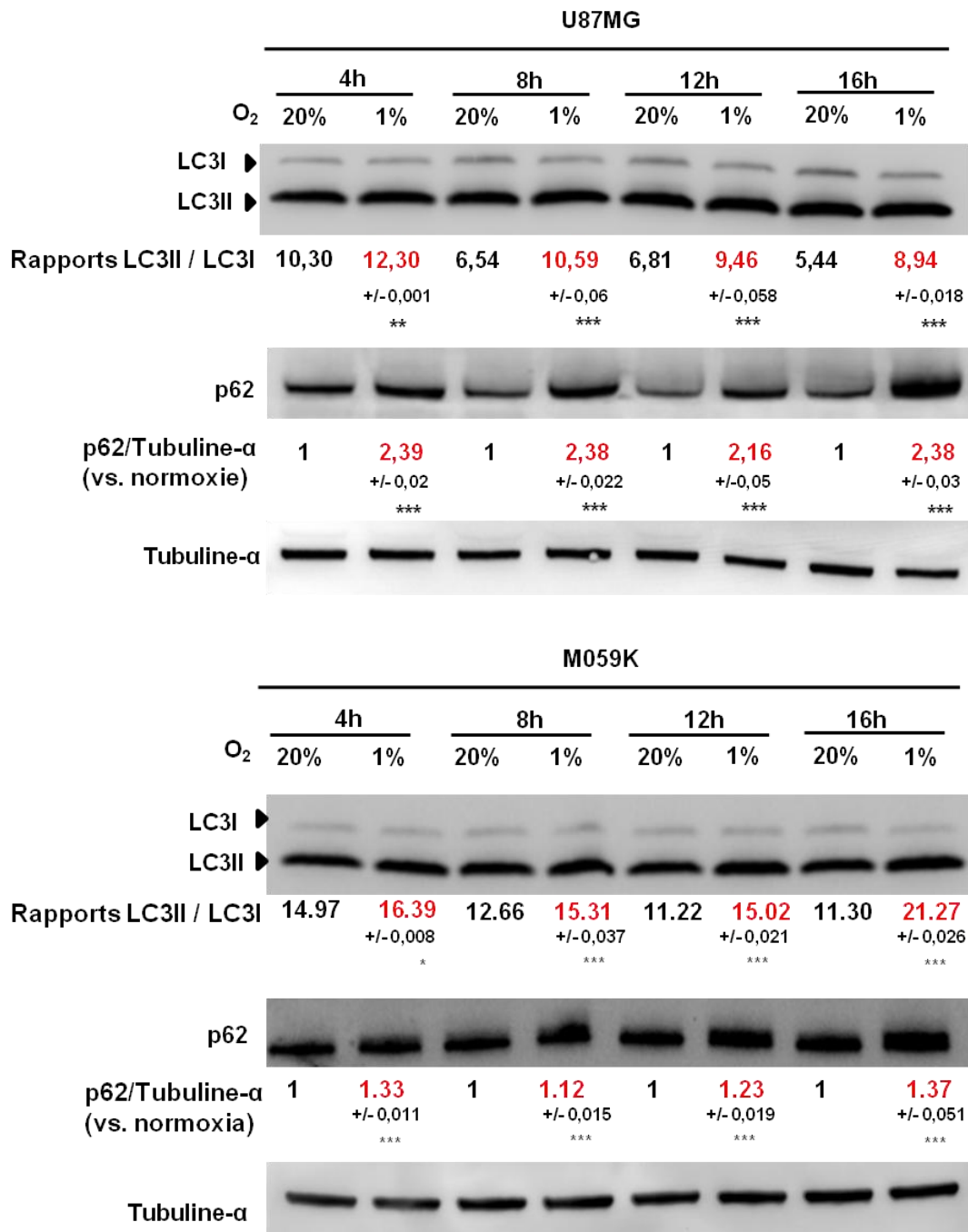
Les cellules M059J ont été transfectées de manière stable avec le vecteur lentiviral pGFF-autophago-LC3, puis triées par cytométrie en flux. Elles ont été ensuite placées en normoxie ou en hypoxie pendant une cinétique allant de 4 à 16h, puis incubées avec l'anti-GFP (autophagosomes, fluorescence verte) ; les noyaux ont été contre-colorés au DAPI. La présence d'organisation punctiforme de la MAP-LC3 fusionnée à la GFP a été analysée par microscopie confocale (A) (Grossissement x 62). Ensuite, les rapports cellules autophagiques sur la totalité des cellules dans 10 champs pris au hasard a été calculé (B). La quantité d'autophagosomes présents dans chaque cellule autophagique a été évaluée (C). Les analyses statistiques ont été réalisées par un test PLSD de Fisher, où une comparaison entre les conditions normoxiques et hypoxiques a été effectuée pour chaque temps. La valeur de p est indiquée.

Dans les cellules cultivées en normoxie (U87MG, M059K et M059J), le marquage GFP-LC3 est diffus et très peu de structures vacuolaires sont visibles (Figures 18, 19 et 20, A). En revanche, lorsque les cellules sont cultivées en hypoxie, le marquage devient punctiforme et le nombre de vacuoles GFP-LC3 positives augmente (Figures 18, 19 et 20, B). De plus, le nombre d'autophagosomes par cellule augmente en condition hypoxique par rapport à la normoxie dans les 3 lignées cellulaires (Figures 18, 19 et 20, C).

V. Conséquences de l'inhibition de l'autophagie

V.1. Inhibition pharmacologique : blocage du flux autophagique par la Chloroquine

Nous avons bloqué l'autophagie par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique, la Chloroquine (CQ), dans le but d'en vérifier la fonctionnalité. En effet, lorsque le processus est fonctionnel et va jusqu'à la fusion des autophagosomes avec les lysosomes, le blocage du flux induit l'accumulation des vésicules. Nous avons recherché par western blot et immunofluorescence la modification d'expression de deux substrats de l'autophagie la p62 et la LC3II dans les 3 lignées cellulaires traitées à la chloroquine (Figures 21 et 22).



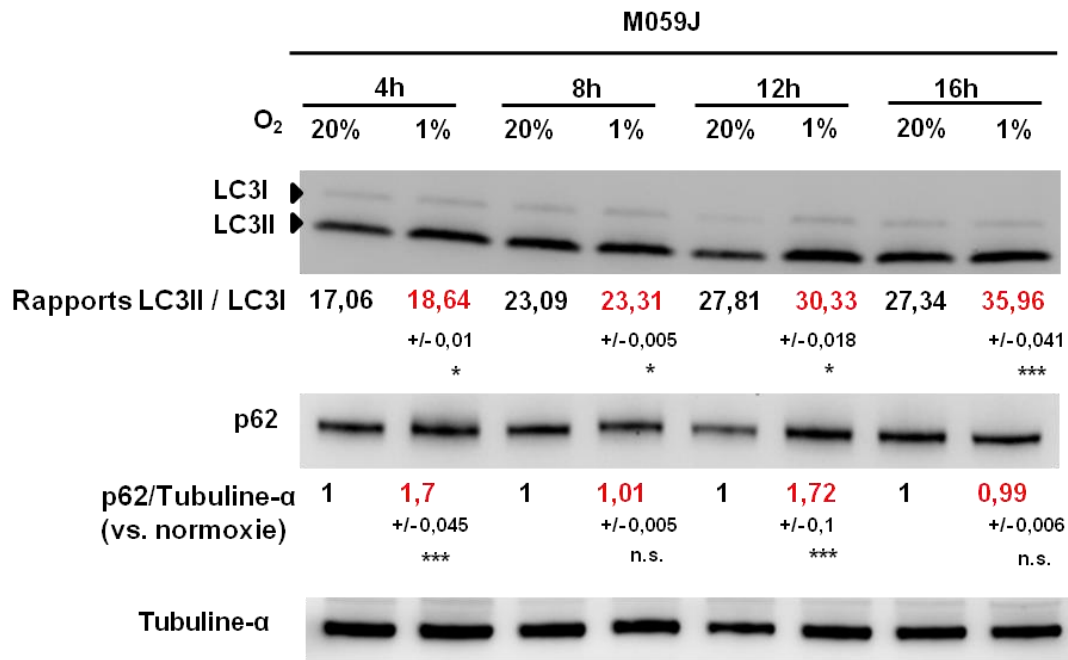
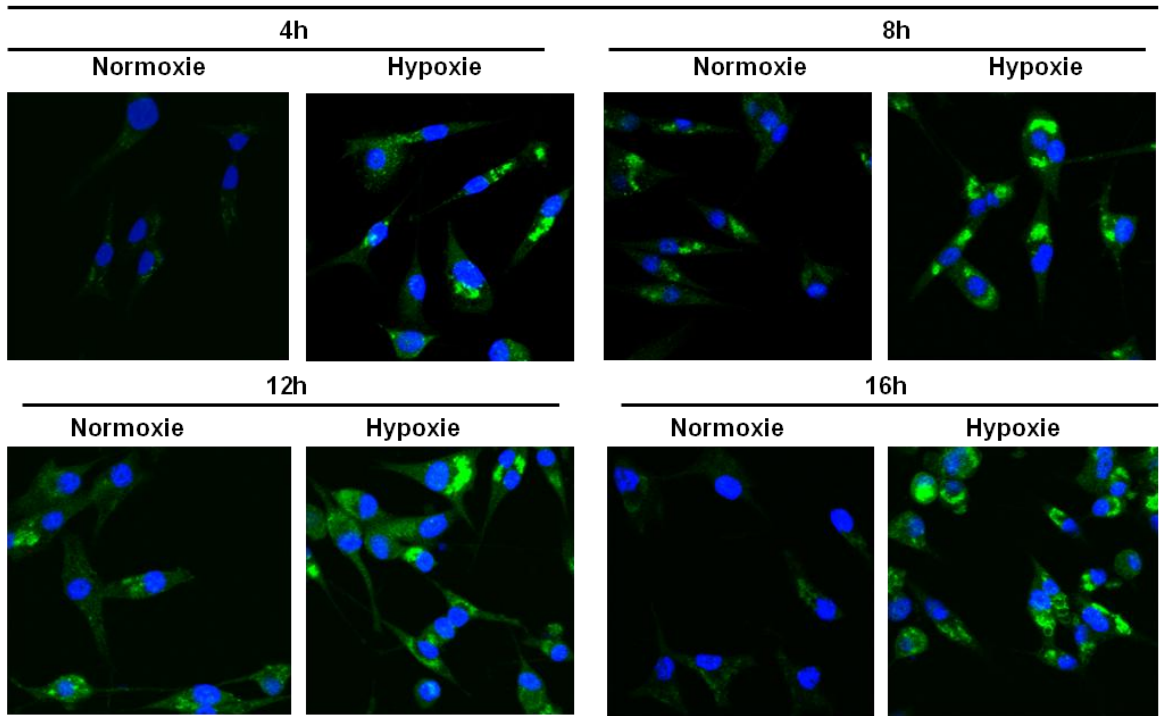


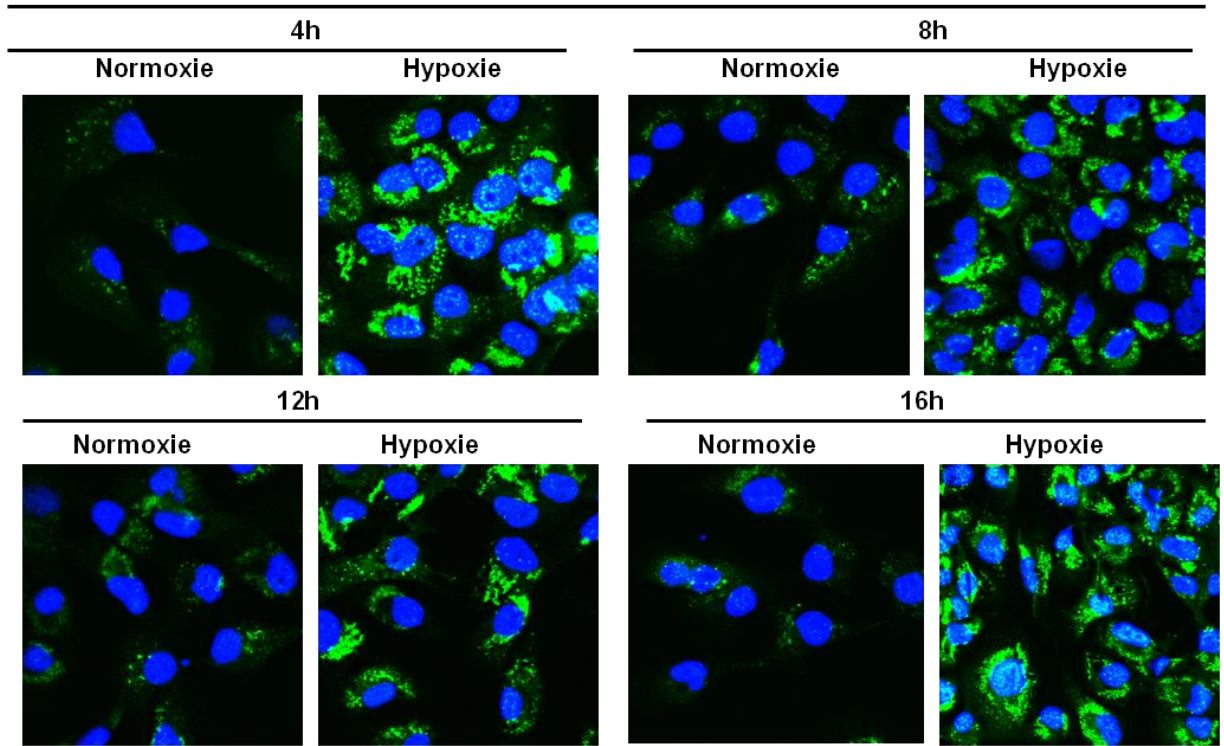
Figure 21 : Effet de l'inhibition du flux autophagique sur l'autophagie induite par l'hypoxie.

Les cellules des lignées U87MG, M059K et M059J sont cultivées en normoxie ou en hypoxie en présence de 40 μ M de chloroquine pendant une cinétique allant de 4 à 16h. Puis l'expression des protéines p62 et LC3 est analysée par western blot, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$, n.s. = non significatif.

En présence de la chloroquine (qui bloque le flux autophagique), les cellules, accumulent les protéines p62 et LC3II, qui ne sont plus dégradées par autophagie. Cette accumulation est plus importante en hypoxie qu'en normoxie et ceci est vrai pour les trois lignées cellulaires (Figure 21).

U87MG





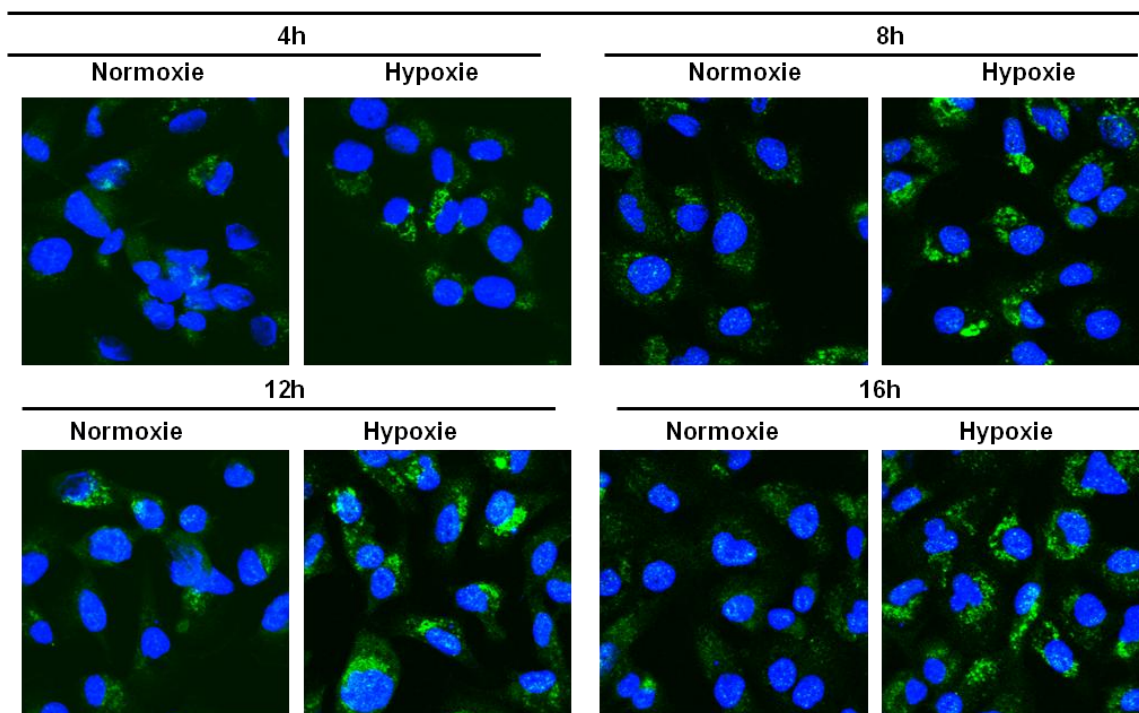


Figure 22 : Effet de la Chloroquine sur la formation d'autophagosomes dans les cellules U87MG et M059K transfectées de manière stable avec le plasmide pGFP-autophago-LC3.

Les cellules ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie en présence de 40 μ M de CQ. Puis les cellules ont été incubées avec l'anti-GFP (autophagosomes, fluorescence verte) et analysées par microscopie confocale pour détecter la présence d'organisation punctiforme de la MAP-LC3 fusionnée à la GFP ; les noyaux ont été contre-colorés au DAPI. Grossissement x 62 (3 expériences indépendantes).

La CQ bloquant l'étape finale de fusion des autophagosomes avec les lysosomes (et non leur formation), ils s'accumulent de manière importante dans le cytosol cellulaire. Cette accumulation est bien plus importante dans les cellules U87MG et les M059K cultivées en hypoxie que dans celles cultivées en normoxie (Figure 22). Cela confirme la fonctionnalité de l'autophagie induite par l'hypoxie.

Ensuite, nous avons étudié les conséquences de l'inhibition pharmacologique de l'autophagie sur le devenir cellulaire. Pour cela, nous avons effectué un test XTT et une numération/viabilité en présence ou non de la CQ (Figure 23).

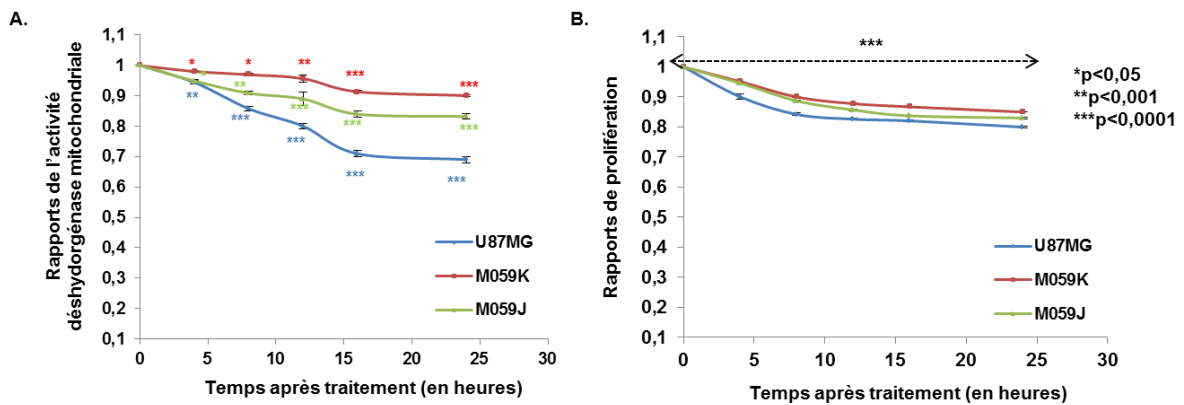


Figure 23 : Effet de l'inhibition de l'autophagie par la CQ sur le devenir cellulaire des lignées U87MG, M059K et M059J.

Les cellules ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie avec une cinétique allant de 4 à 24h, puis l'activité déshydrogénase mitochondriale a été évaluée par un test XTT (A) et la viabilité cellulaire a été déterminée par une numération / viabilité en présence du bleu trypan (B). Les rapports moyens Hypoxie/Normoxie de trois expériences indépendantes sont représentés. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test PLSD de Fisher, où une comparaison entre les conditions normoxiques et hypoxiques a été effectuée pour chaque temps. Les valeurs de p sont indiquées.

On observe une diminution significative de l'activité déshydrogénase mitochondriale et de la croissance cellulaire dans les trois lignées étudiées, cette diminution était plus importante en conditions hypoxiques. Ce retard de croissance demeure jusqu'à 24h (Figure 23), ce qui n'est pas le cas quand l'autophagie est active (figure 15). Cela suggère un rôle bénéfique de cette signalisation dans l'adaptation des cellules au stress

Pour évaluer les effets de l'inhibition de l'autophagie sur la mort apoptotique, le clivage de la PARP a été analysé par western blot (Figure 24).

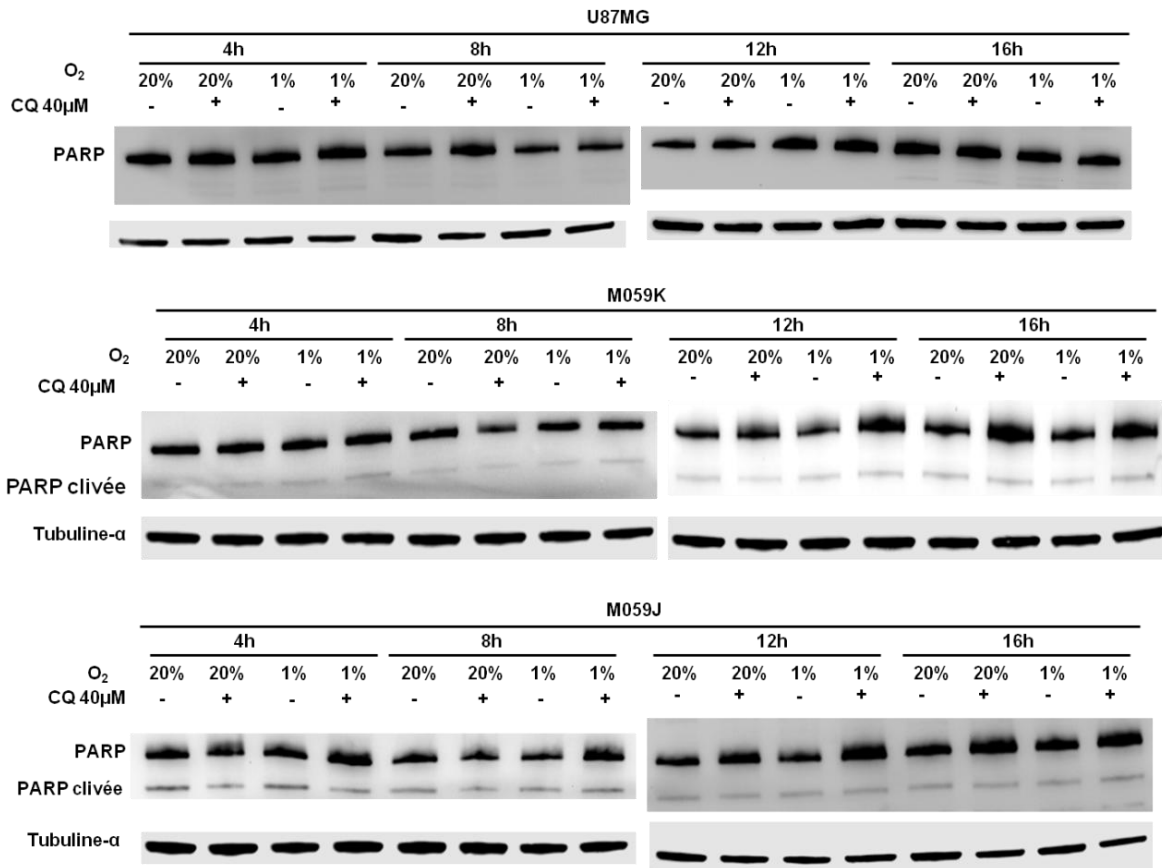


Figure 24 : Conséquences de l'inhibition du flux autophagique sur la mort apoptotique dépendante des caspases.

Les cellules des lignées U87MG, M059K et M059J ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie en présence ou non de chloroquine, avec une cinétique allant de 4 à 16h. Les protéines ont été extraites et le clivage de la PARP a été analysé par western blot (3 expériences indépendantes).

L'inhibition du flux autophagique par la CQ, n'induit pas de clivage de la PARP dans les 3 lignées cellulaires, que ce soit en normoxie ou en hypoxie. Dans ce cas, il n'y aurait pas activation de mort apoptotique dépendante des caspases (Figure 24). Cependant, une autre signalisation de mort ne peut être exclue.

V.2. Inhibition de l'autophagie: siRNA spécifiques des transcrits de Beclin1 et d'Atg5

V.2.a. Validation des siRNA

La transfection des cellules par siRNA a été réalisée sur cellules adhérentes en utilisant l'interféline comme agent transfectant. Un contrôle avec un siRNA « vide » a été effectué. Les résultats présentés sont obtenus uniquement sur les cellules des lignées U87MG et M059K (Figure 25). Les M059J sont sensibles à l'interféline qui cause leur mort directement après transfection. Des essais ont été réalisés avec une technique d'électroporation

n'utilisant pas d'agent chimique de transfection (AMAXA, LONZA). Bien que cette technique ne soit pas toxique pour ces cellules, elle n'a pas permis de bloquer les transcrits et par conséquent leur traduction.

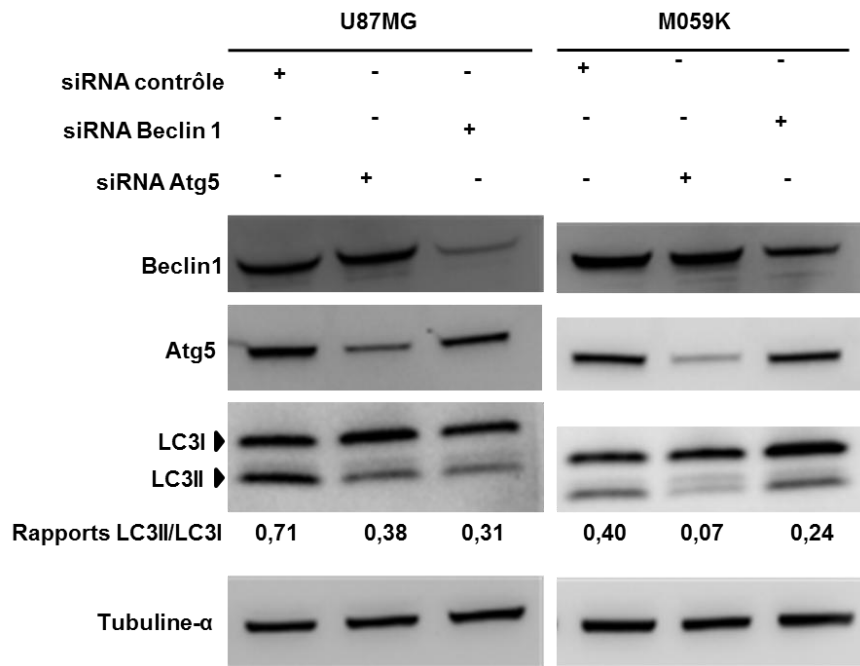


Figure 25 : Extinction des transcrits de Beclin1 et Atg5 par siRNA.

Les cellules des lignées U87MG et M059K ont été transfectées par des siRNA spécifiques dirigés contre les transcrits de Beclin1 ou Atg5. Après 48h, l'expression des protéines Beclin1 et Atg5 a été analysée par western blot. Un siRNA vide a été utilisé comme contrôle.

L'utilisation de siRNA dirigés spécifiquement contre les ARNm de Beclin1 et Atg5, induit une diminution de production des protéines Beclin1 et Atg5 de plus de 80% par rapport aux cellules transfectées avec un siRNA contrôle (Figure 25). Cette transfection bloque efficacement l'autophagie puisque les rapports LC3II/LC3I sont plus faibles dans les cellules transfectées par les siRNA d'intérêt que dans les cellules transfectées avec le siRNA contrôle (Figure 25).

V.2.b. Effets de l'inhibition de l'autophagie par siRNA

Nous avons évalué l'inhibition de l'autophagie par siRNA sur le devenir cellulaire. Pour cela, un test XTT a été effectué à 16h de culture en normoxie ou en hypoxie, sur les cellules des lignées U87MG et M059K transfectées ou non avec des siRNA ciblant les transcrits de Beclin1 et Atg5 (Figure 26). La viabilité cellulaire a également été évaluée dans les mêmes conditions par un test de numération/viabilité en présence de bleu trypan (Figure 27).

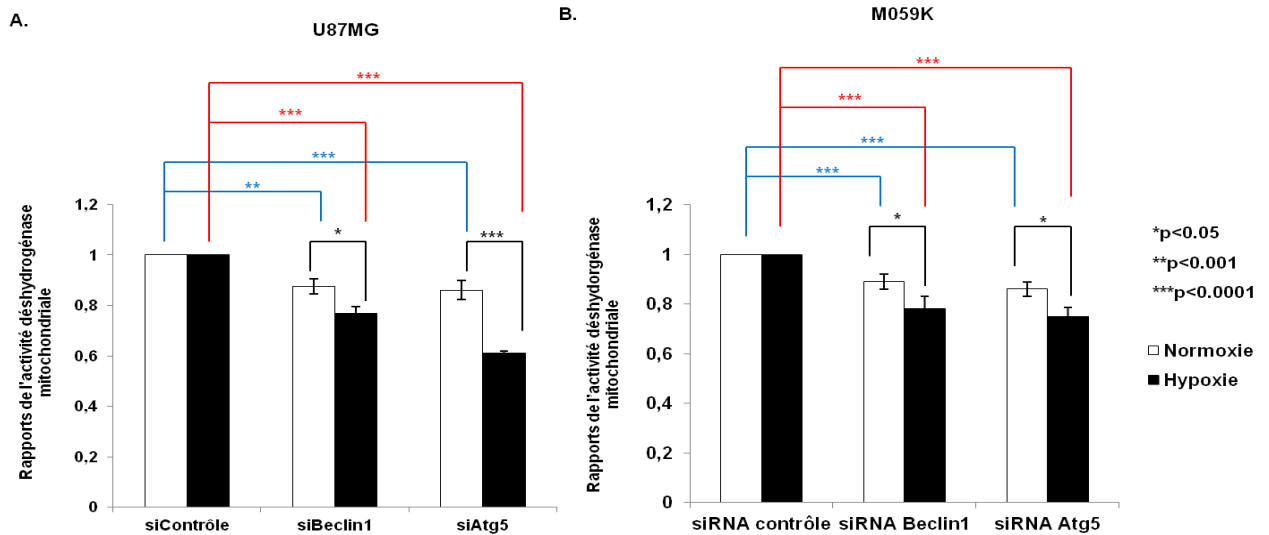


Figure 26 : Effet de l'inhibition de l'autophagie par siRNA sur l'activité déshydrogénase mitochondriale.

Les cellules des lignées U87MG (A) et M059K (B) ont été transfectées avec des siRNA contrôles ou spécifiques des transcrits de Beclin1 et Atg5. 48h plus tard, les cellules ont été cultivées en normoxie ou hypoxie pendant 16h, puis l'activité déshydrogénase mitochondriale a été évaluée par un test XTT. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test PLSD de Fisher, les valeurs de p sont indiquées. siContrôle : siRNA Contrôle, siBeclin1 : siRNA Beclin1, siAtg5 : siRNA Atg5.

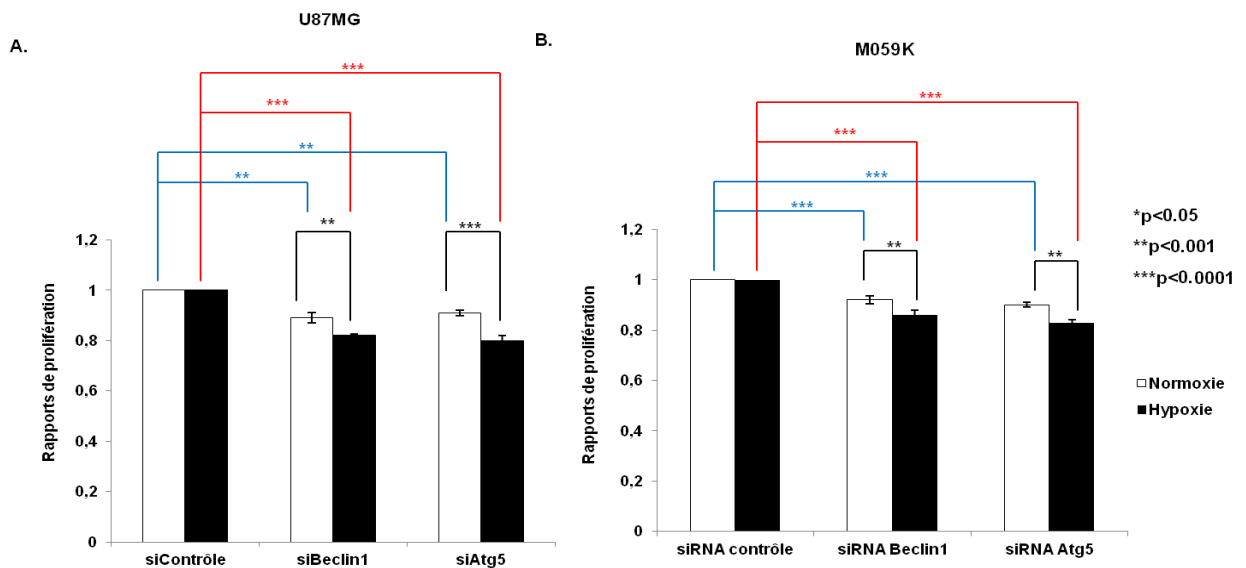


Figure 27 : Effet de l'inhibition de l'autophagie par siRNA sur la prolifération cellulaire.

Les cellules des lignées U87MG (A) et M059K (B) ont été transfectées avec des siRNA contrôles ou spécifiques des transcrits de Beclin1 et Atg5. 48h plus tard, les cellules ont été cultivées en normoxie ou hypoxie pendant 16h, puis énumérées en présence de bleu trypan. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test PLSD de Fisher. Les valeurs de p sont indiquées. siContrôle : siRNA Contrôle, siBeclin1 : siRNA Beclin1, siAtg5 : siRNA Atg5.

Après 16h de culture en normoxie ou hypoxie, nous observons, dans les deux lignées cellulaires, une diminution significative de l'activité déshydrogénase mitochondriale en présence d'ARN interférants (siRNA) bloquant l'induction de l'autophagie. Cette baisse

d'activité est plus importante en hypoxie qu'en normoxie (Figure 26). Des résultats similaires, mais de moins grande ampleur, ont été obtenus par numération cellulaire (Figure 27). En effet, le nombre de cellules a significativement diminué, suite à l'utilisation d'ARN interférants avec les ARNm de Beclin1 et d'Atg5. Cette diminution est plus importante en hypoxie qu'en normoxie. Cependant, cette perte cellulaire reste limitée puisqu'elle ne dépasse pas 20% (cas des U87MG transfectées avec le siAtg5).

Afin de savoir si cette cytotoxicité est accompagnée d'une mort cellulaire, nous avons recherché le clivage de la PARP par western blot, dans des cellules transfectées avec les siRNA spécifiques des ARNm de Beclin1 ou d'Atg5 en comparaison au siRNA contrôle (Figure 28).

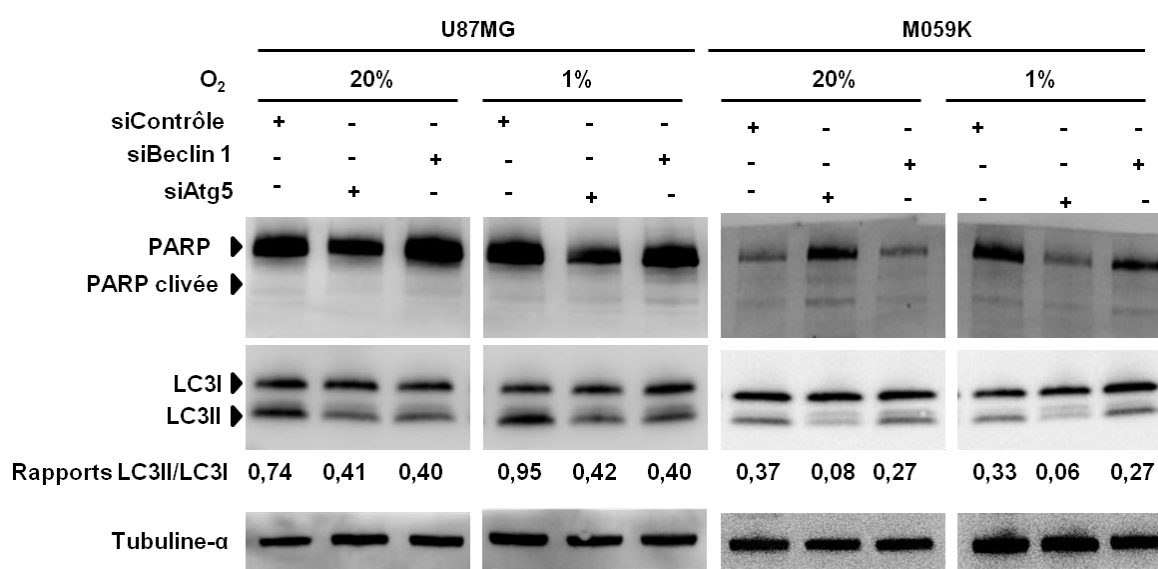


Figure 28 : Effet de l'inhibition de l'autophagie par siRNA sur la mort apoptotique.

Les cellules des lignées U87MG et M059K ont été transfectées par des siRNA contrôle ou ciblant les transcrits de Beclin1 et Atg5. 48h plus tard, les protéines ont été extraites et le clivage de la PARP a été analysé par western blot. L'expression de LC3 sous ses 2 formes, libre et liée, a également été recherchée en normoxie et en hypoxie, elle permet de valider les effets des siRNA sur l'initiation de l'autophagie (3 expériences indépendantes).

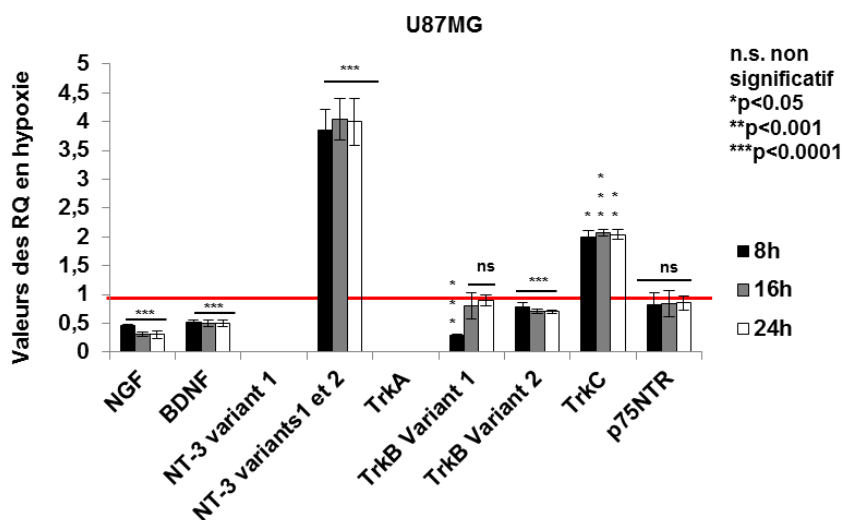
L'inhibition de l'induction (siBeclin1) ou de l'élongation (siAtg5) des autophagosomes dans les cellules U87MG et les M059K n'a pas provoqué de mort apoptotique dépendante des caspases (Figure 28). La même expérience réalisée à un temps plus prolongé (24h) a donné le même résultat. Cela laisse supposer que la diminution de l'activité déshydrogénase mitochondriale après transfection serait plutôt due à un retard de croissance cellulaire. Cependant, nous ne pouvons pas exclure une mort cellulaire par un autre mécanisme, que nous n'avons pas exploré et qui pourrait expliquer la perte cellulaire discrète, observée lors de la numération en présence de bleu trypan.

En résumé, le stress hypoxique conduit à l'activation d'une autophagie fonctionnelle dans les cellules de GBM. Celle-ci permet principalement la survie des cellules et contribue en partie à la résistance à l'apoptose. Cependant, son inhibition, ralentit transitoirement la croissance cellulaire mais n'induit pas de mort dépendante des caspases. Cela suggère l'existence d'une autre voie de survie, par laquelle les cellules de GBM résistent à l'hypoxie et à l'inhibition de l'autophagie. Nous nous sommes intéressés à l'implication de la famille des neurotrophines, qui regroupe des facteurs de croissance neuronaux et leurs récepteurs. L'objectif était de déterminer, suite à des analyses transcriptomiques et protéomiques, d'éventuelles variations dans l'expression et la signalisation des membres de cette famille avec le stress hypoxique.

2^{ème} partie : Analyse de l'expression et de la signalisation des Neurotrophines en réponse à un stress hypoxique dans des cellules de glioblastome

I. Etude transcriptomique des neurotrophines et de leurs récepteurs en condition hypoxique

Dans un premier temps, nous avons recherché par RT-PCR quantitative, l'expression des transcrits des neurotrophines ainsi que de leurs récepteurs en réponse à un stress hypoxique. Les trois lignées cellulaires ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant 8, 16 et 24h. Ensuite, les ARN totaux ont été extraits et « rétro-transcrits » en ADN complémentaire sur lesquels différentes PCR quantitatives ont été réalisées. L'eau dans laquelle les oligonucléotides et les sondes ont été repris a été utilisée comme contrôle négatif, alors que des cellules de la lignée de neuroblastome humain SHSY5Y ont été utilisées comme contrôle positif. Les valeurs de Ct ont été normalisées par rapport à celles obtenues pour les transcrits de la HPRT1, utilisés comme référence et chaque condition hypoxique a été normalisée par rapport à la normoxie pour obtenir les différents RQ (Relative Quantities) hypoxie (Figure 29).



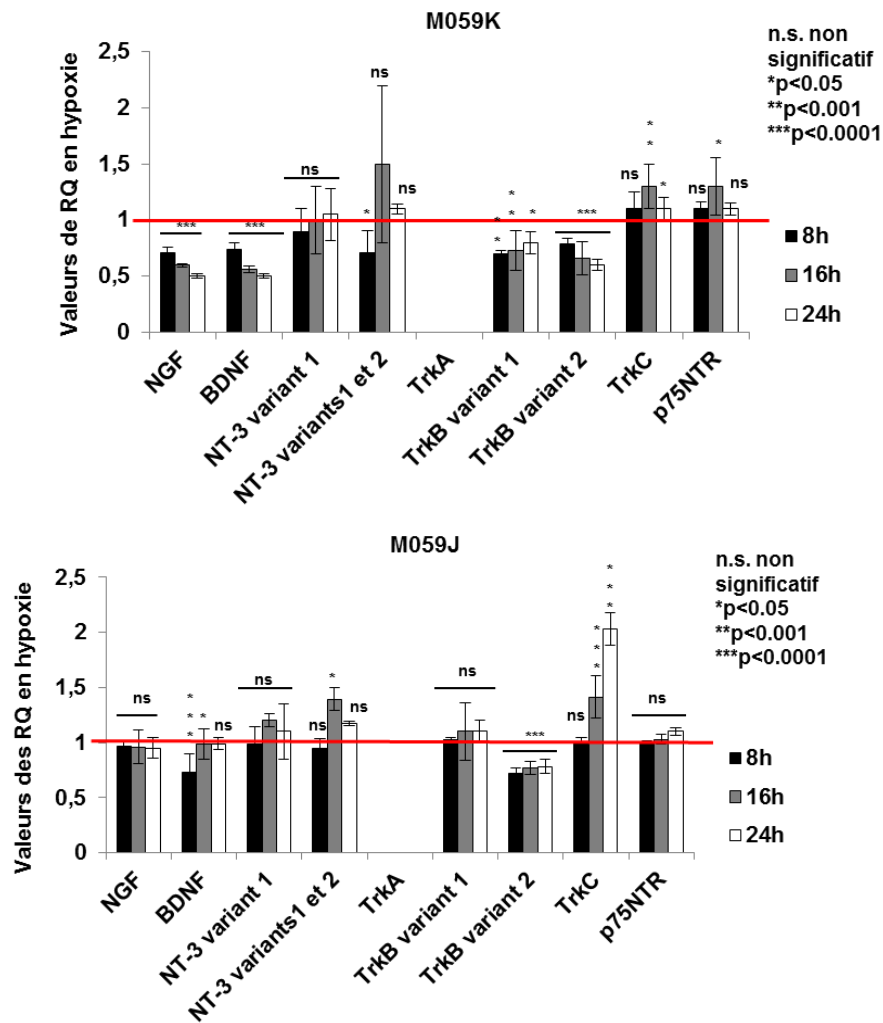


Figure 29 : Quantification par qPCR des transcrits des neurotrophines et de leurs récepteurs dans les lignées U87MG, M059K et M059J.

Les RQ reflètent le niveau de transcription des différents gènes étudiés, normalisé par rapport à l'expression de la HPRT1. La barre rouge représente les RQ des différents transcrits en normoxie (RQ = 1). La figure est représentative de 3 expériences indépendantes et les valeurs de p sont indiquées.

Les transcrits de NGF et BDNF ont significativement diminué en hypoxie dans les cellules U87MG et M059K. Dans les cellules M059J, les transcrits du NGF n'ont pas varié en hypoxie de façon significative alors que ceux du BDNF ont significativement diminué après 8 et 16h de ce traitement. Le variant 1 de la NT-3 était absent dans les cellules U87MG, alors qu'il était fortement exprimé dans les cellules M059, sans variation significative entre les conditions de normoxie et d'hypoxie. Seul le variant 2 de la NT-3 était présent dans les cellules U87MG et il a significativement augmenté en hypoxie. Ce même variant a significativement diminué à 8h d'hypoxie dans les M059K et a significativement augmenté à 16h d'hypoxie dans les M059J. Le récepteur au NGF, le TrkA, n'a été détecté dans aucune des trois lignées cellulaires. Le variant 1 des transcrits du TrkB (permettant de produire le TrkB de 145 KDa), a diminué de façon significative dans les cellules U87MG (uniquement à

8h après hypoxie) et dans les cellules M059K cultivées en hypoxie, et n'a pas été affecté dans les cellules M059J. Le variant 2 des transcrits du TrkB (permettant de produire le TrkB de 95 KDa) a significativement diminué en hypoxie dans les trois lignées cellulaires. Les valeurs de RQ des transcrits du TrkC dans les cellules U87MG, étaient doublées à chaque temps d'hypoxie par rapport à la normoxie. Dans les cellules M059, ces valeurs étaient plus faibles, et ont significativement augmenté uniquement à 16 et 24h d'hypoxie. Les transcrits du récepteur p75^{NTR} n'ont pas été affectés par l'hypoxie dans les différentes lignées cellulaires sauf pour les M059K où une augmentation significative et transitoire a été observée à 16h d'hypoxie (Figure 29).

Ainsi, même si de petites variations d'expression des transcrits sont visibles avec le stress hypoxique, la modification la plus importante concerne l'augmentation des transcrits de TrkC et du variant 2 de la NT-3 dans les cellules U87MG (Figure 29). C'est la raison pour laquelle nous avons focalisé la suite de notre travail sur cette neurotrophine et son récepteur dans les cellules U87MG cultivées en normoxie ou en hypoxie.

II. Effet de l'hypoxie sur la production du TrkC et de la NT-3 dans les cellules U87MG

Pour confirmer et préciser les résultats obtenus par la PCR quantitative, nous avons recherché par western blot l'expression totale des protéines TrkC et NT-3 (Figure 30). Il existe plusieurs isoformes du récepteur TrkC : la forme entière (TrkC FL) et la forme tronquée (TrkC-T1). L'anticorps utilisé se fixe sur la partie extracellulaire du récepteur, permettant la reconnaissance des deux formes. De même, l'anticorps utilisé pour détecter la NT-3, reconnaît les 2 formes immature (pro-NT-3) et mature (la NT-3 à proprement dit) (Figure 30).

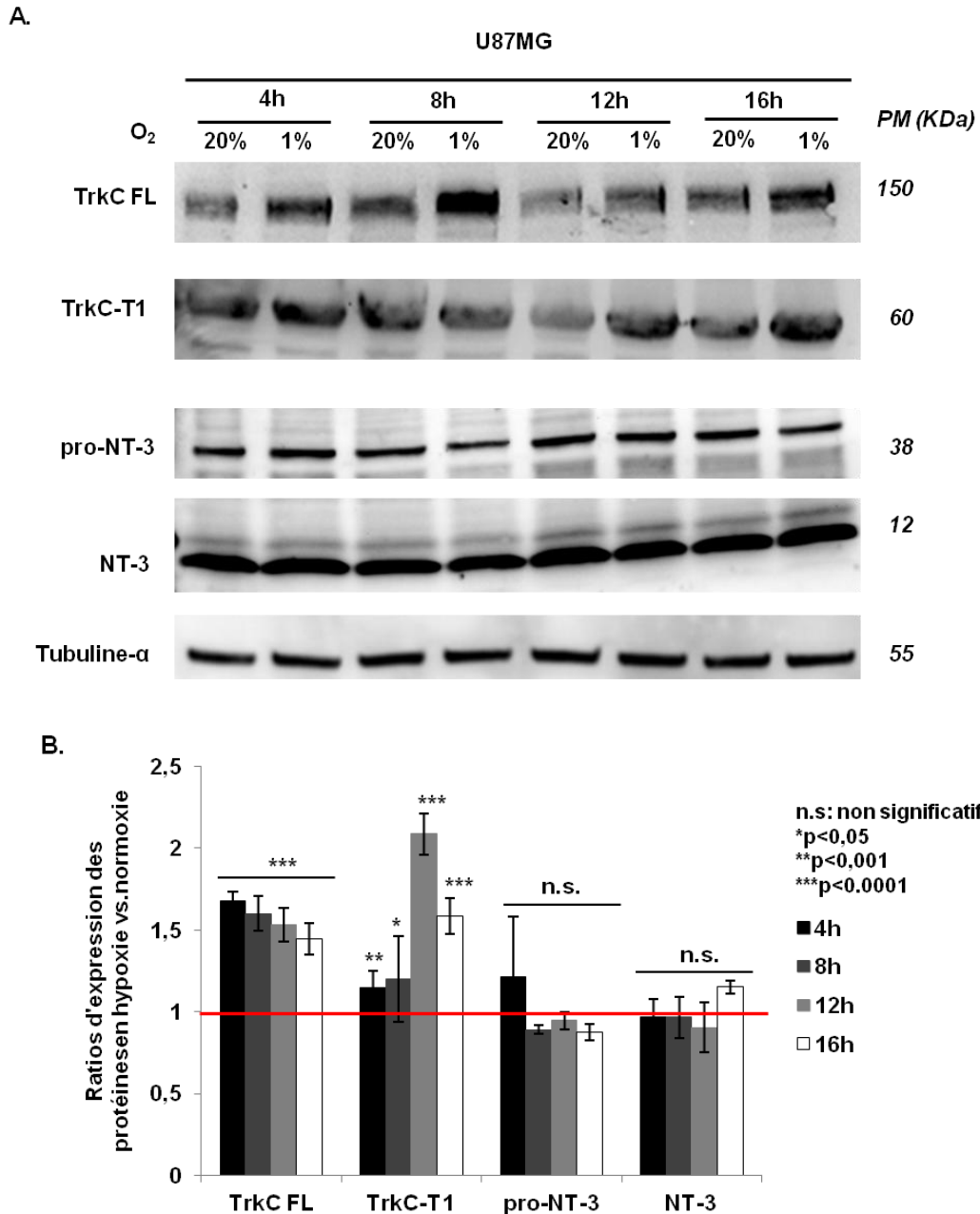


Figure 30 : Effet de l'hypoxie sur la production du TrkC et de la NT-3 intracellulaire.

Après culture de la lignée U87MG en normoxie ou en hypoxie pendant 4 à 16h, les protéines ont été extraites et l'expression de TrkC et de la NT-3 a été évalué par western blot (A), puis quantifiée par ImageJ (B). La barre rouge correspond à la valeur des protéines analysées en normoxie (valeur de référence = 1), PM : poids moléculaire (3 expériences indépendantes).

La production des 2 formes de la NT-3 (mature et immature) n'est pas affectée par l'hypoxie. Le western blot est réalisé sur l'extrait protéique des cellules, il ne peut refléter la quantité sécrétée de la NT-3, disponible pour se fixer sur les récepteurs TrkC FL et TrkC-T1 (TrkC tronqué) (Figure 30). En revanche, l'hypoxie augmente significativement l'expression de la forme totale du TrkC (150 KDa), observable à chaque temps de la cinétique. La forme tronquée du récepteur (60 KDa) s'accroît également en condition du stress hypoxique.

La détection de la forme tronquée de TrkC et son changement d'expression en hypoxie nous a incité à déterminer des oligonucléotides et des sondes spécifiques du transcrite de cette isoforme, le variant 3 de *NTRK3* (le gène du TrkC), pour quantifier son transcrite par RT-qPCR (Figure 31).

III. Effet de l'hypoxie sur la transcription du TrkC tronqué dans les U87MG

Nous avons analysé par RT-qPCR l'expression spécifique du variant 3 de *NTRK3* permettant l'expression du TrkC tronqué ou TrkC-T1 (Figure 31).

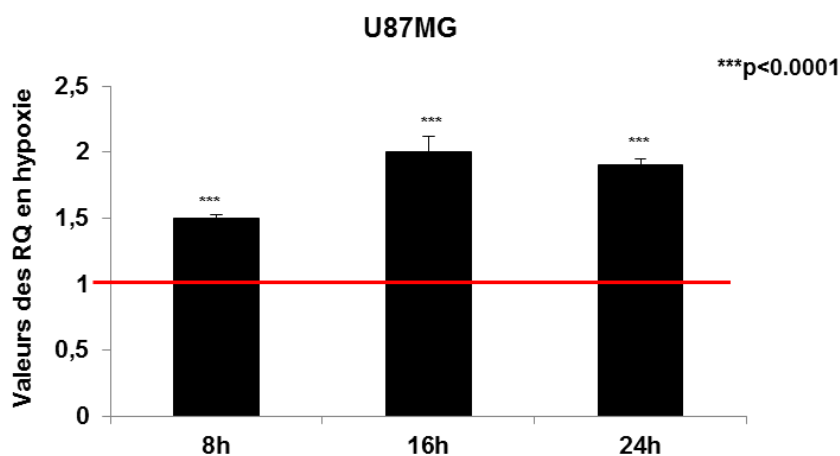


Figure 31 : Effet de l'hypoxie sur la production du variant 3 de *NTRK3* (permettant d'obtenir le TrkC tronqué).

Des cellules de la lignée U87MG ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant une cinétique allant de 8 à 24h. Les ARN totaux ont été extraits et une qPCR amplifiant spécifiquement le variant 3 de *NTRK3* (TrkC tronqué ou TrkC-T1) a été réalisée. Les valeurs de Ct obtenues en hypoxie ont été normalisées par rapport à celles obtenues en normoxie et à la HPRT1, puis les valeurs des RQ sont représentées. La barre rouge représente les RQ obtenus en normoxie. La valeur de p est indiquée (3 expériences indépendantes).

La quantité des transcrits correspondant au TrkC tronqué (TrkC-T1), a significativement augmenté dans les cellules U87MG cultivées en hypoxie par rapport à celles cultivées en normoxie. Ainsi, l'hypoxie, augmente non seulement les transcrits de TrkC FL mais également ceux correspondant au TrkC-T1 (Figure 31).

IV. Visualisation du TrkC par microscopie à fluorescence

Les cellules de la lignée U87MG ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant 16h. Ensuite, un immunomarquage spécifique du TrkC (avec un anticorps reconnaissant la partie extracellulaire donc les 2 isoformes du récepteurs) a été réalisé. Le marquage a été analysé à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Figure 32).

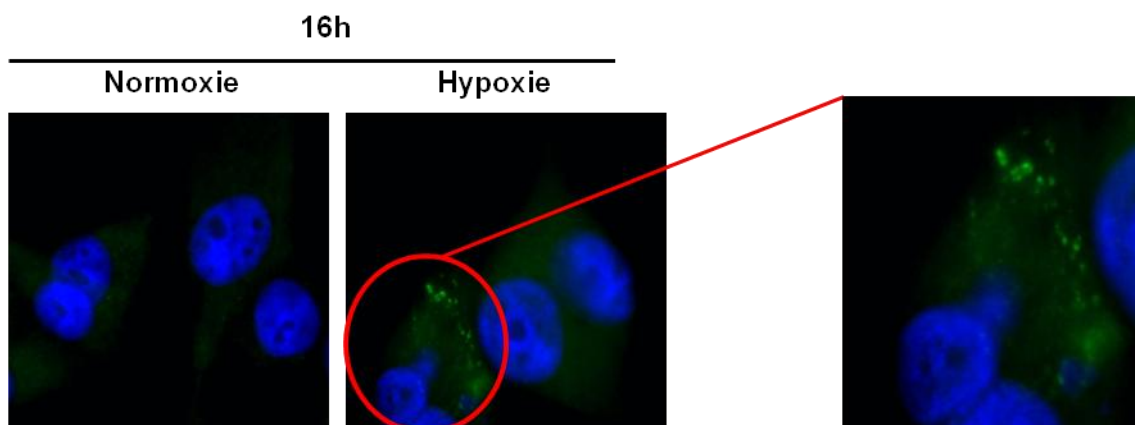


Figure 32 : Détection du TrkC par microscopie à fluorescence.

Les cellules de la lignée U87MG ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant 16h. Après fixation, les cellules ont été incubées avec l'anti-TrkC reconnaissant les 2 isoformes FL et T1 (fluorescence verte) ; les noyaux ont été contre-colorés au DAPI. Grossissement x 60.

L'augmentation de l'expression du TrkC dans les cellules U87MG cultivées en hypoxie (Figure 32), visible par la fluorescence verte, confirme le résultat obtenu par western blot (Figure 30). L'expression du récepteur TrkC augmente en conditions hypoxiques. Comme les cellules produisent également son ligand, la NT-3, notre hypothèse est que le couple TrkC/NT-3 pourrait activer une boucle de survie, intervenant dans la résistance des cellules de GBM au stress hypoxique.

Dans la suite du travail, nous avons analysé les signalisations en aval, pouvant être impliquées dans la survie cellulaire, en commençant par l'état de phosphorylation du TrkC.

V. Effet de l'hypoxie sur la phosphorylation du TrkC

Le TrkC est un récepteur à activité tyrosine kinase, capable de s'autophosphoryler après fixation du ligand. Cette étape est la première permettant d'enclencher les cascades de signalisation conduisant à la prolifération et la survie cellulaire. Afin de savoir si le TrkC FL est activé suite à l'hypoxie dans les cellules U87MG, nous avons recherché par western blot sa phosphorylation au niveau du domaine intracellulaire et plus particulièrement au niveau de la tyrosine 820 (Figure 33).

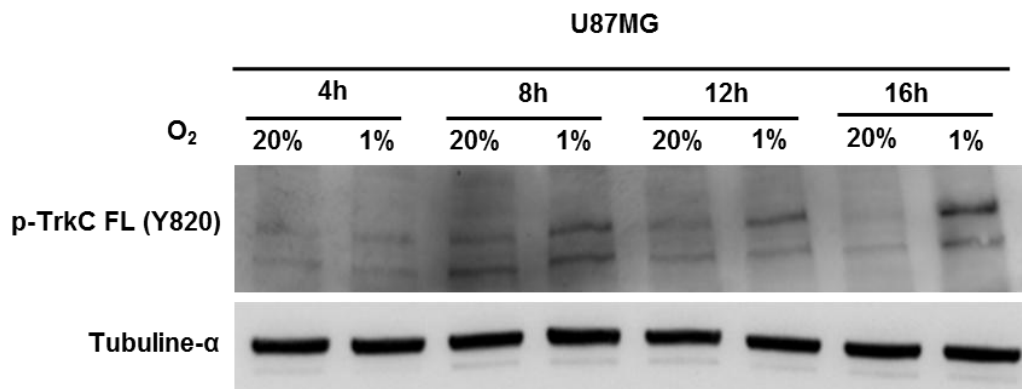


Figure 33 : Effet de l'hypoxie sur la phosphorylation du TrkC.

Les cellules de la lignée U87MG ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant une durée de 4 à 16h. Les protéines ont été extraites et la phosphorylation sur résidu tyrosine 820 a été cherchée par western blot.

Après révélation du western blot, nous remarquons une bande à la taille du TrkC FL (150 KDa), correspondant à la forme phosphorylée du récepteur (Figure 33). Aucune bande n'a été obtenue au niveau de la taille correspondant au TrkC-T1 (60 KDa), confirmant ainsi la nature tronquée du TrkC déjà détecté (Figure 30). En effet, celui-ci ne possédant pas la partie intracellulaire concernée par l'activité tyrosine kinase, il ne peut pas être phosphorylé.

VI. Etude de la signalisation du TrkC FL

Il semble donc que la forme entière (FL) du TrkC soit activée et capable de transmettre des signaux, nous nous sommes alors intéressés aux 2 voies de signalisation majeures activées par ce récepteur : la voie PI3K/Akt et celle des MAPK.

VI.1. Voie PI3K/Akt

Nous avons recherché par western blot l'expression des formes totales (*pan*) et phosphorylées d'Akt et mTOR (Figure 34).

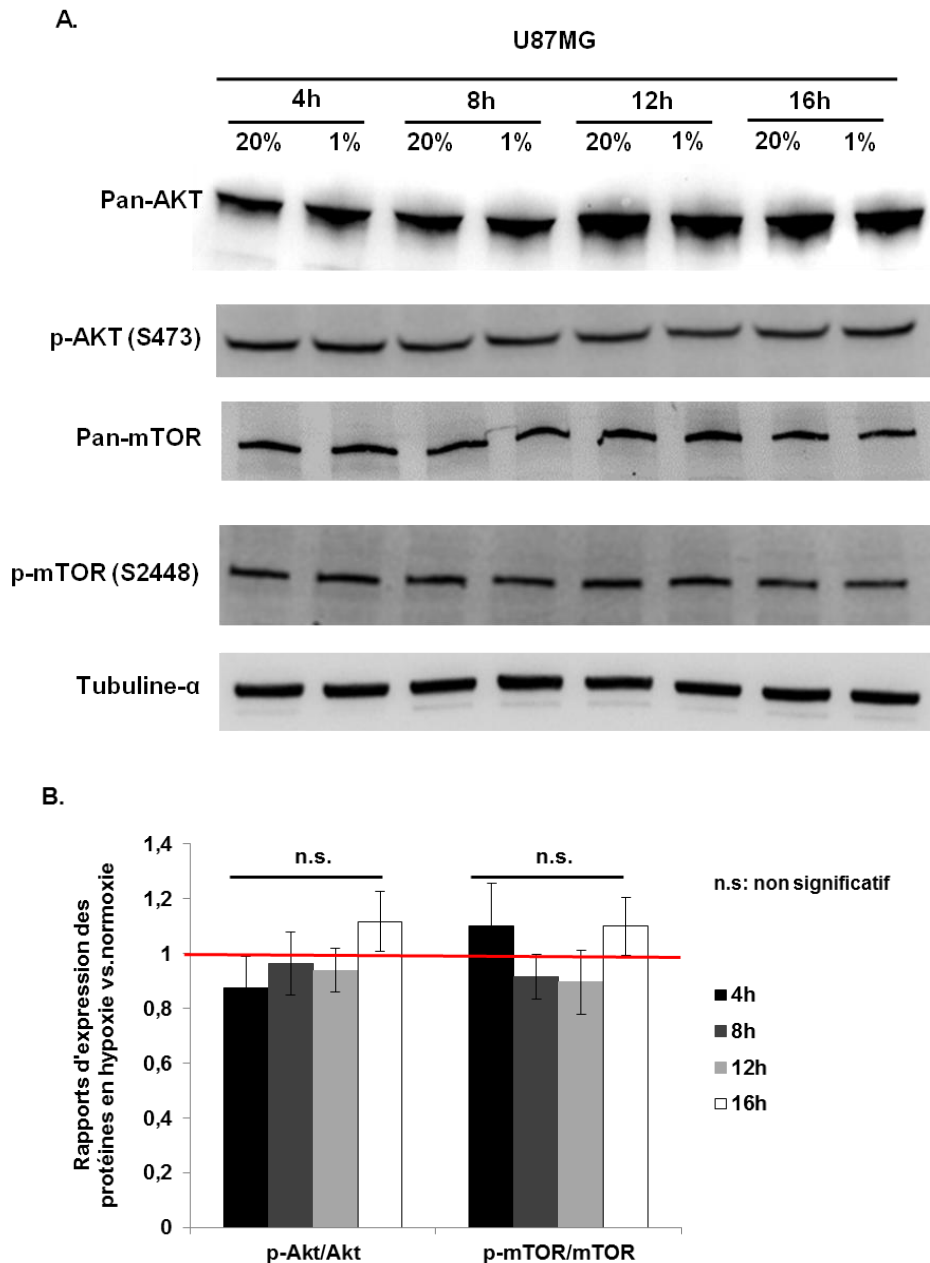


Figure 34 : Effet de l'hypoxie sur des membres de la voie PI3K/Akt.

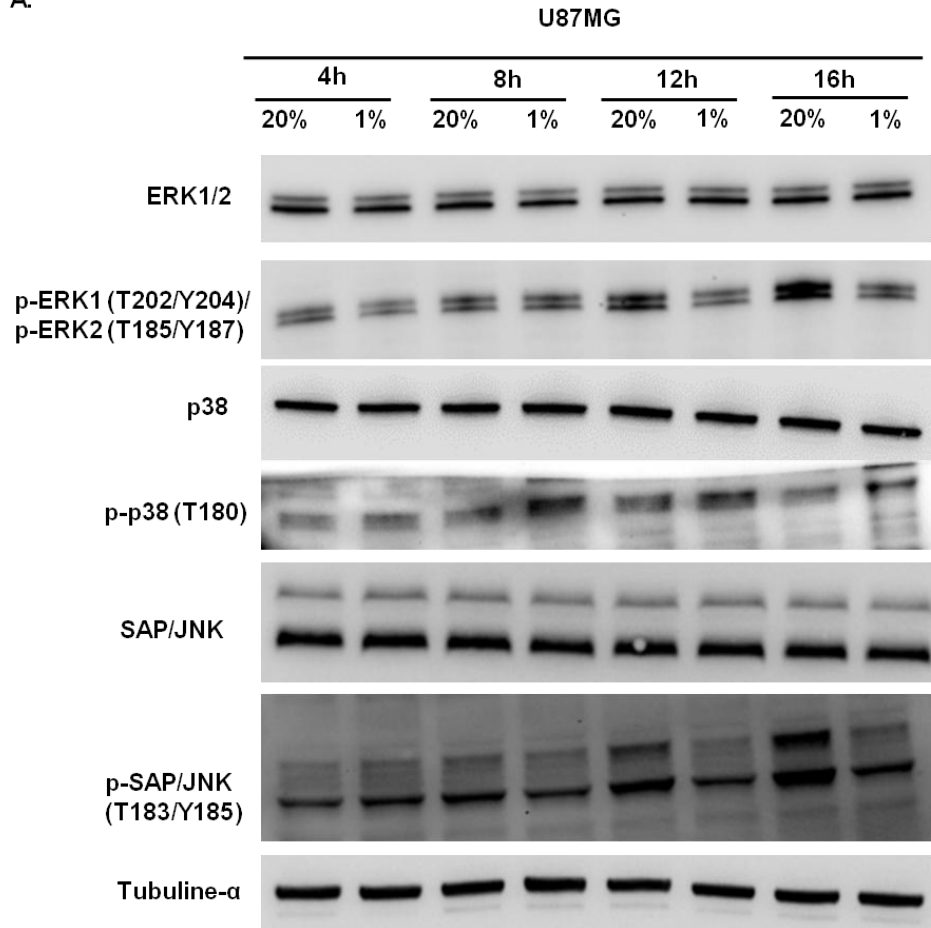
Après culture des cellules U87MG en normoxie ou en hypoxie et extraction des protéines, le niveau de production d'Akt et de mTOR et de leur phosphorylation a été analysé par western blot en utilisant des anticorps reconnaissant soit la forme totale de ces protéines, soit la phosphorylation des résidus S473 (Akt) et S2448 (mTOR), respectivement (A). Puis une quantification a été réalisée par ImageJ (B). La barre rouge correspond à la valeur des protéines analysées en normoxie (valeur de référence = 1). L'image est représentative de 3 expériences indépendantes.

Nous ne remarquons pas de variation significative dans le niveau de phosphorylation d'Akt et de mTOR en hypoxie par rapport à la normoxie (Figure 34). Nous avons donc cherché l'activation de la voie des MAPK.

VI.2. Voie des MAPK

Nous avons analysé par western blot l'expression et la phosphorylation de 3 acteurs principaux de la voie des MAPK : ERK1/2, p38 MAPK et JNK (ou SAPK) dans les cellules U87MG, cultivées en normoxie ou en hypoxie (Figure 35).

A.



B.

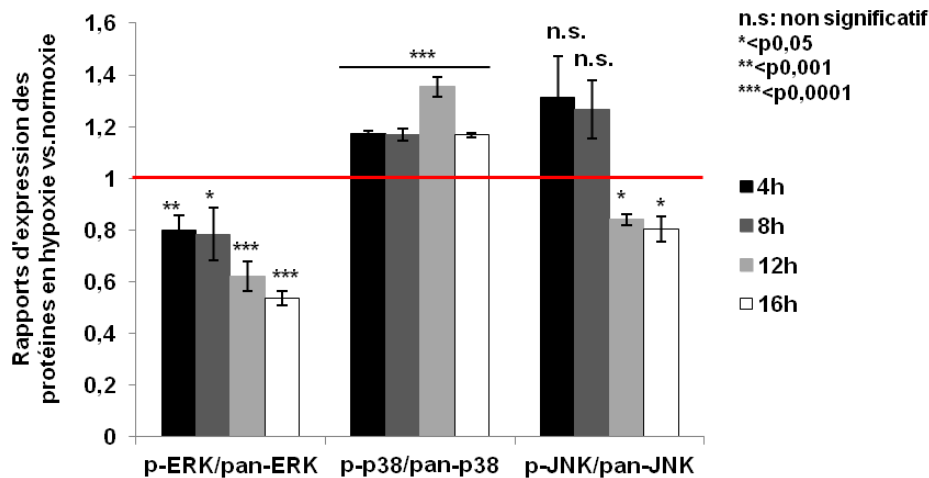


Figure 35 : Effet de l'hypoxie sur des acteurs de la voie des MAPK.

Après culture des cellules de la lignée U87MG en normoxie ou en hypoxie et extraction des protéines, le niveau de production d'ERK1/2, de p38 et de JNK ou SAPK ainsi que de leur phosphorylation a été analysé par western blot, en utilisant soit un anticorps dirigé contre la forme totale de ces protéines soit un anticorps reconnaissant la phosphorylation de résidus particuliers (A), puis leur quantification a été réalisée par ImageJ (B). La barre rouge correspond à la valeur des protéines analysées en normoxie (valeur de référence = 1). L'image est représentative de 3 expériences indépendantes.

En réponse au stress hypoxique, le niveau de phosphorylation d'ERK1/2 a diminué significativement tout au long de la cinétique, alors que celui de JNK a diminué significativement uniquement à 12 et 16h d'hypoxie. Seul le niveau de phosphorylation de la p38 MAPK a augmenté en condition de stress, ce qui impliquerait l'activation de cette voie en aval du TrkC FL, pour favoriser la survie cellulaire (Figure 35).

VII. Etude d'un partenaire du TrkC-T1 (tronqué) : Arf6

Bien que la forme tronquée du récepteur TrkC soit dépourvue du domaine catalytique intracellulaire, il a été décrit précédemment que la fixation de la NT-3 active des protéines de signalisation intracellulaire. Parmi elles, se trouve Arf6, membre de la famille des petites protéines G, impliquée dans le trafic intracellulaire, mais également dans la biogenèse et le trafic des autophagosomes (Esteban et al., 2006; Moreau et al., 2012). Nous nous sommes intéressés à l'expression d'Arf6 en normoxie et en hypoxie dans la lignée U87MG (Figure 36).

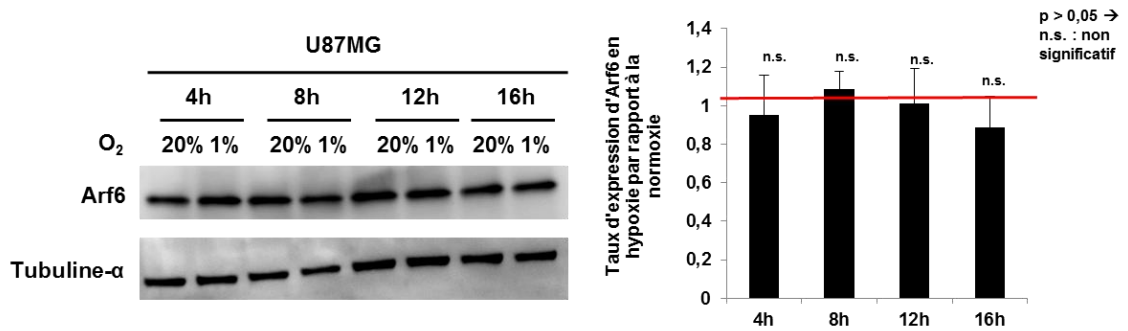


Figure 36 : Effet de l'hypoxie sur l'expression d'Arf6.

Les cellules de la lignée U87MG, ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant 16h, les protéines sont ensuite extraites, et un western blot cherchant la protéine Arf6 a été réalisé. L'histogramme représente une quantification de ce western, montrant le taux d'expression d'Arf6 en hypoxie par rapport à la normoxie (la barre rouge) (moyenne de 3 expériences indépendantes).

Après quantification du signal d'Arf6 avec le logiciel « ImageJ », aucune variation significative n'apparaît dans l'expression d'Arf6 dans les cellules cultivées en hypoxie (Figure 36). Néanmoins, nous n'avons pas analysé sa translocation à la membrane plasmique, qui pourrait être en liaison avec une association au TrkC-T1. Cet aspect devra être étudié dans une étude complémentaire.

En résumé, l'hypoxie à laquelle les cellules de GBM sont soumises, active une boucle de survie impliquant le TrkC et probablement la NT-3. L'expression des deux formes, catalytique et tronquée, du récepteur est amplifiée lors du stress, le TrkC FL activant en aval la p38 MAPK. Cette voie compléterait l'autophagie pour assurer la résistance des cellules à la faible disponibilité en dioxygène.

3^{ème} partie : Effet des inhibitions respectives de l'autophagie et/ou des signalisations de TrkC

Dans la suite du travail, nous avons cherché à déterminer comment ces deux voies de survie, autophagie et TrkC/NT-3 sont connectées. Pour cela, l'expression et le statut du TrkC ont été analysées suite à l'inhibition de l'autophagie.

I. Inhibition de l'autophagie

I.1. Effet de la CQ sur l'expression des TrkC FL et T1

Nous avons recherché par western blot (Figure 37) et par microscopie confocale (Figure 38) l'effet de l'inhibition pharmacologique de l'autophagie sur l'expression des TrkC FL et T1 à 16h de normoxie ou d'hypoxie dans les cellules U87MG.

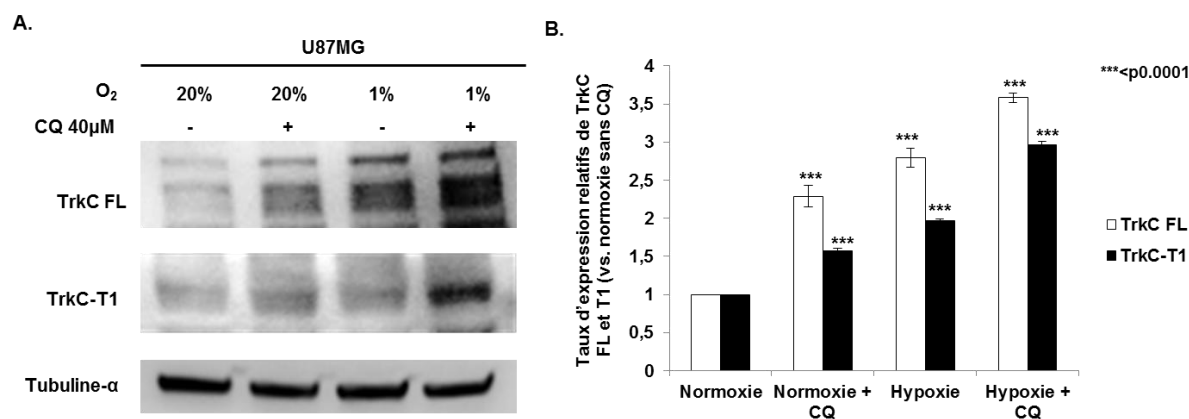


Figure 37 : Effet de la CQ sur les TrkC FL et T1 dans la lignée U87MG.

Les cellules de la lignée U87MG ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie en présence ou non de la CQ. Après 16h, les protéines ont été extraites et l'expression des TrkC FL et TrkC T1 a été analysée par western blot (A) puis quantifiée par ImageJ (B) (image représentative de 3 expériences indépendantes). La valeur de p est indiquée.

La CQ a significativement augmenté l'expression du TrkC FL et celle du TrkC-T1 dans les cellules U87MG. Ceci était nettement plus important en hypoxie qu'en normoxie (Figure 37) et a été confirmé par immunofluorescence (Figure 38).

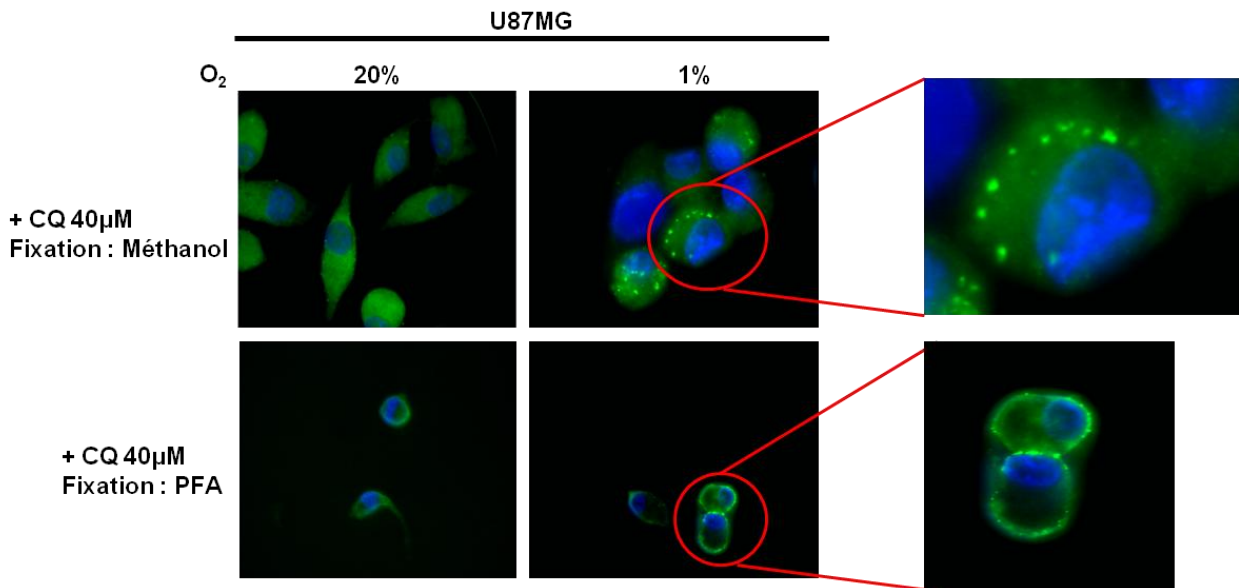


Figure 38 : Effet de la CQ sur l'expression du TrkC.

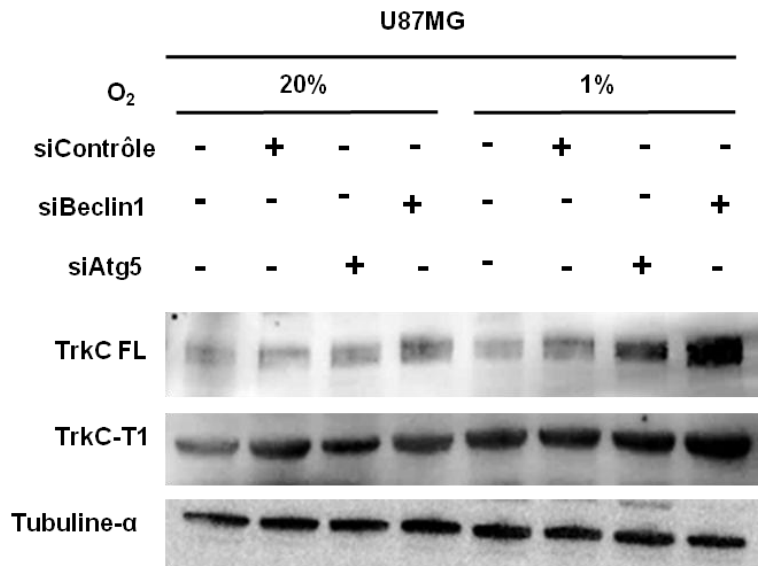
Les cellules de la lignée U87MG ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie en présence ou non de la CQ. Après 16h, les cellules ont été fixées avec du méthanol ou de la PFA, incubées avec un anticorps reconnaissant les 2 isoformes (FL et T1) de TrkC (révélé par une fluorescence verte) ; les noyaux ont été contre-colorés au DAPI. Grossissement x 60 (3 expériences indépendantes).

Lorsque les cellules sont fixées et perméabilisées avec du méthanol (l'anticorps anti TrkC peut pénétrer), un marquage intracellulaire localisé en périphérie et diffus au niveau cytoplasmique a été visualisé. En revanche, suite à la fixation avec la PFA ne permettant pas cette incorporation, le marquage en immunofluorescence a également augmenté mais a été restreint à la membrane plasmique (Figure 38).

I.2. Effet des siRNA de Beclin1 et d'Atg5 sur l'expression des TrkC FL et T1

Pour compléter les résultats obtenus avec l'approche pharmacologique, nous avons inhibé l'autophagie par des siRNA spécifiques de Beclin1 et d'Atg5, puis nous avons analysé l'expression des deux isoformes de TrkC par western blot (Figure 39).

A.



B.

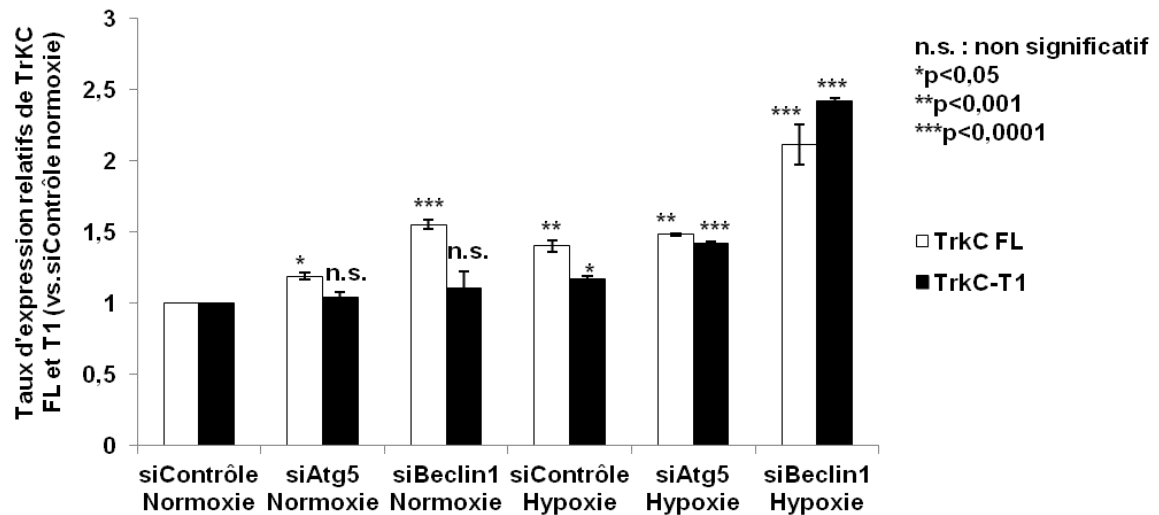
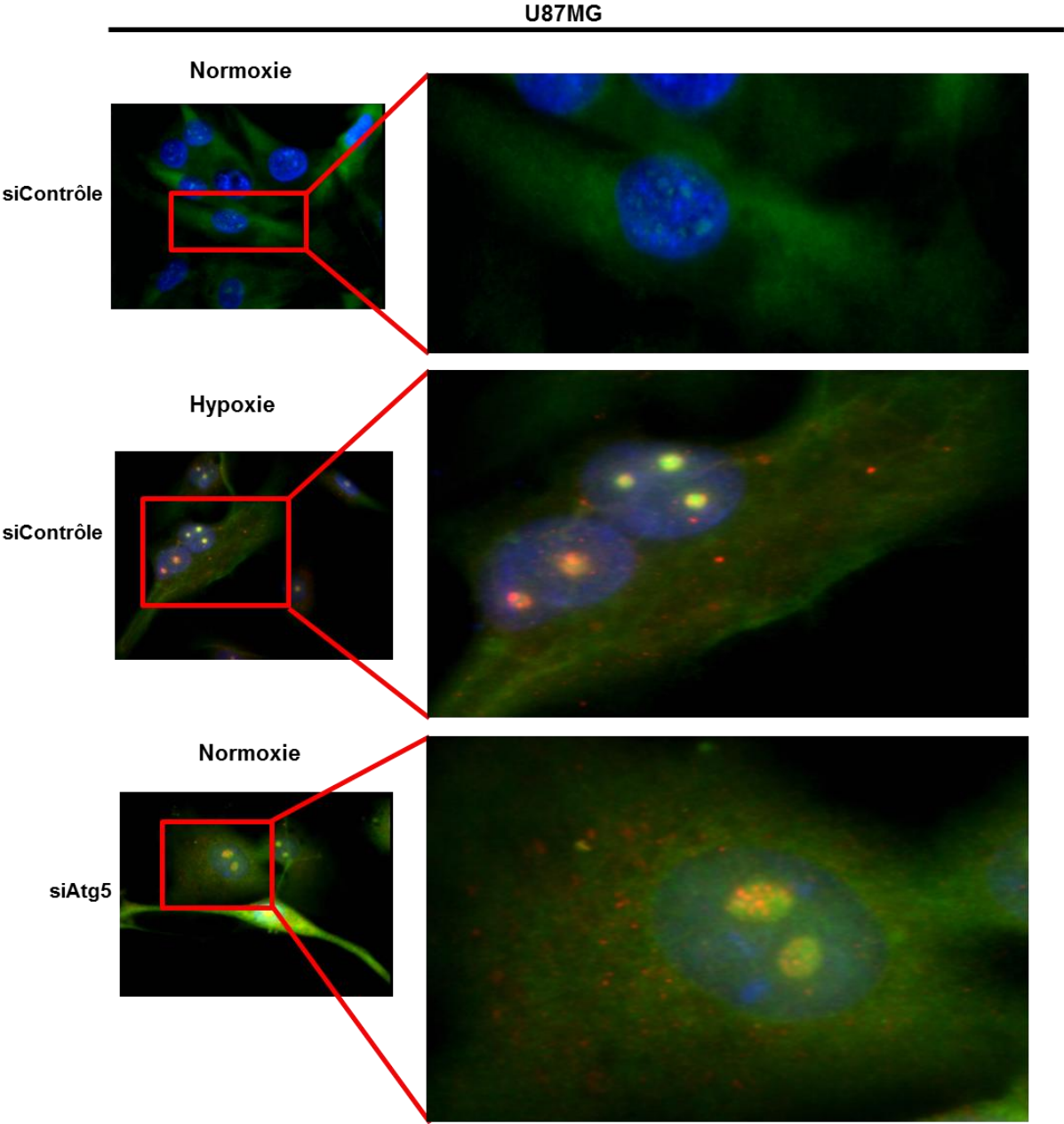


Figure 39 : Effet de l'inhibition de l'autophagie par siRNA des transcrits de Beclin1 et d'Atg5 sur l'expression des TrkC FL et T1.

Les cellules de la lignée U87MG ont été transfectées par des siRNA contrôle ou spécifiques des transcrits de Beclin1 et d'Atg5. Après 48h, les cellules ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant 16h. Après extraction des protéines, l'expression des TrkC FL et T1 a été analysée par western blot (A) puis quantifiée par ImageJ (B) (image représentative de 3 expériences indépendantes).

Suite à l'inhibition de l'autophagie par siRNA, une augmentation significative d'expression du TrkC FL a été visible. Cette expression était encore plus importante en hypoxie qu'en normoxie. Pour le TrkC-T1, l'effet de l'inhibition de l'autophagie a été significatif en condition hypoxique (Figure 39).

Ces résultats ont été confirmés par immunofluorescence (Figure 40) avec les cellules U87MG exprimant la protéine de fusion GFP-LC3, transfectées avec les siRNA spécifiques des transcrits de Beclin1 et d'Atg5.



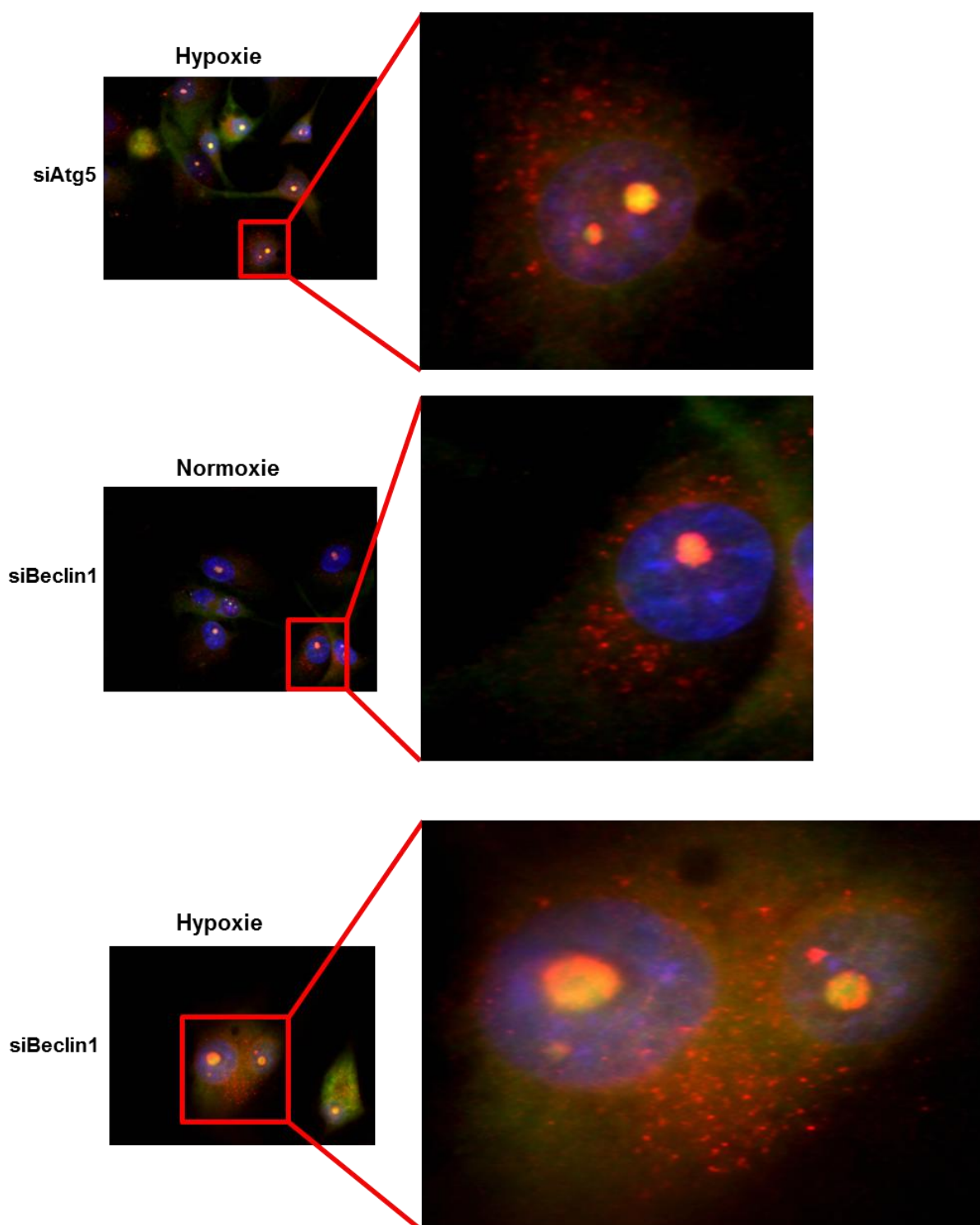


Figure 40 : Effet des siRNA de l'autophagie sur l'expression du TrkC.

Les cellules de la lignée U87MG-GFP-LC3, ont été transfectées par un siRNA contrôle ou un siRNA spécifique des transcrits de Beclin1 et d'Atg5. Après 48h, elles ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant 16h, puis incubées avec l'anti-GFP (autophagosomes, fluorescence verte) et l'anti-TrkC (fluorescence rouge) ; les noyaux ont été contre-colorés au DAPI. Grossissement x 60 (représentatif de 3 expériences indépendantes).

Suite à l'inhibition de l'autophagie par siRNA, l'expression de TrkC a augmenté surtout lorsque l'expression de Beclin1 est réduite. L'augmentation du TrkC était plus importante en hypoxie qu'en normoxie (Figure 40). Ces résultats ont confirmé ceux obtenus avec l'inhibiteur pharmacologique (la CQ).

L'augmentation d'expression des deux isoformes de TrkC en hypoxie et en absence d'autophagie nous a conduit aux 2 hypothèses suivantes :

- 1) Le TrkC serait dégradé par autophagie,
- 2) Le TrkC, par son augmentation, compenserait l'absence de l'autophagie.

Afin de tester ces hypothèses, nous avons bloqué le flux autophagique avec la chloroquine et recherché une éventuelle colocalisation du TrkC avec les autophagosomes accumulés.

I.3. Le TrkC serait-il dégradé par autophagie ?

Les cellules de la lignée U87MG transfectées pour exprimer la protéine de fusion GFP-LC3, ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie en présence ou non de la CQ. Un marquage du TrkC a été réalisé et visualisé en fluorescence rouge (Figure 41). Ainsi, une colocalisation entre le TrkC et les autophagosomes correspond à une fluorescence jaune.

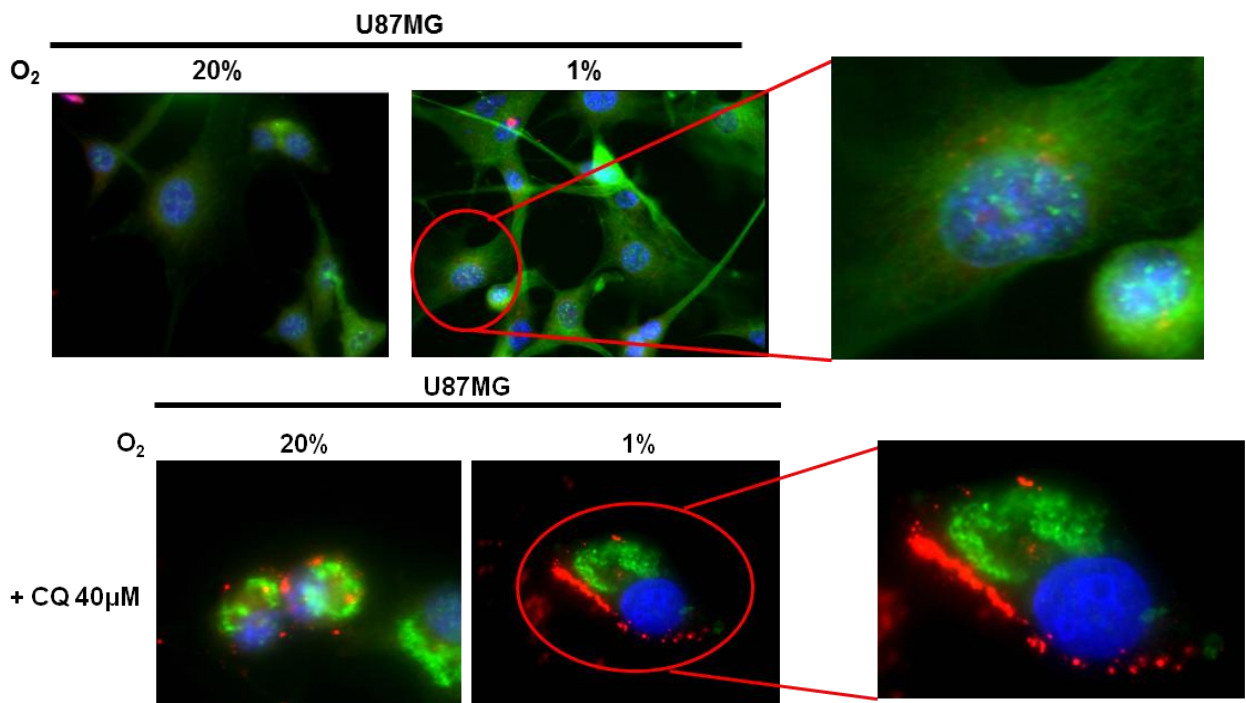


Figure 41 : Effet de la CQ sur l'expression du TrkC.

Les cellules de la lignée U87MG transfectées pour exprimer la protéine de fusion GFP-LC3, traitées ou non avec 40 μ M de CQ, ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant 16h, puis incubées avec l'anti-GFP (autophagosomes, fluorescence verte) et l'anti-TrkC (fluorescence rouge) ; les noyaux ont été contre-colorés au DAPI. Grossissement x 60 (3 expériences indépendantes).

En inhibant le flux autophagique avec la chloroquine, le TrkC a été accumulé (Figure 41), ce qui a confirmé les résultats obtenus par western blot (figure 39). Cependant, nous n'avons pas observé de colocalisation avec les autophagosomes, ce qui semble indiquer que le TrkC ne serait pas dégradé par autophagie.

Ces données étayent l'hypothèse selon laquelle les cellules en condition de stress hypoxique potentialisent la signalisation neurotrophique pour compenser l'absence d'une autophagie fonctionnelle.

I.4. Effet de l'inhibition de l'autophagie sur la phosphorylation du TrkC FL

Nous avons ensuite recherché par western blot si cette augmentation du TrkC FL suite à l'inhibition de l'autophagie, est également accompagnée d'une augmentation de son activation. Pour cela, nous avons inhibé l'autophagie par la CQ pendant 16h et regardé la phosphorylation du TrkC FL par western blot (Figure 42).

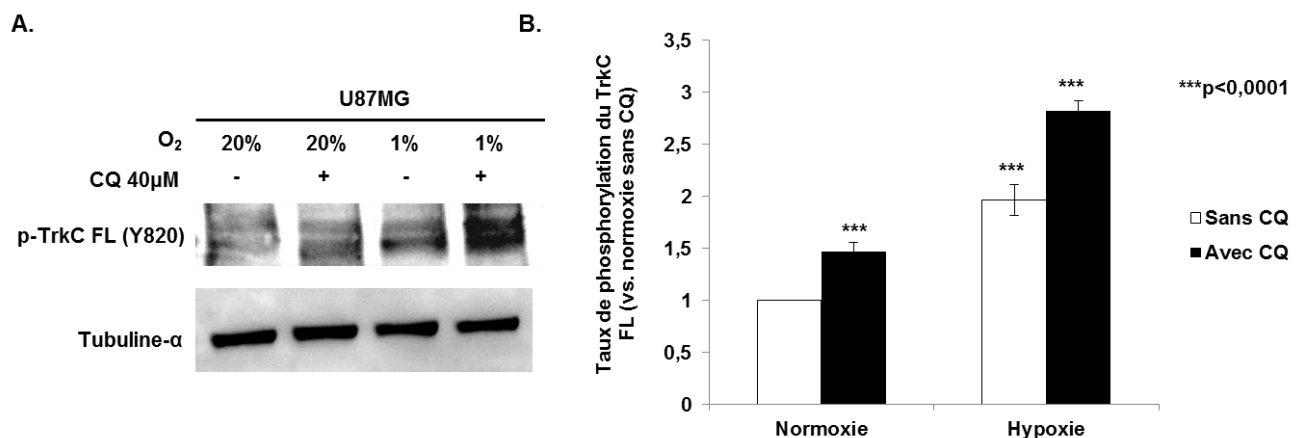


Figure 42 : Effet de l'inhibition de l'autophagie par la CQ sur la phosphorylation du TrkC FL.

Les cellules de la lignée U87MG ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie en présence ou non de la CQ. Après 16h, les protéines ont été extraites et la phosphorylation du TrkC FL a été analysée par western blot (A) puis quantifiée par ImageJ (B) (image représentative de 3 expériences indépendantes).

Suite à l'inhibition de l'autophagie par la CQ, nous avons remarqué une augmentation significative de la phosphorylation du TrkC FL correspondant à son activation (Figure 42). Cela implique qu'en absence de l'autophagie, l'expression et l'activation de TrkC FL augmentent.

I.5. Effet de l'inhibition de l'autophagie par la CQ sur l'expression et l'activation de la p38 MAPK

Nous avons cherché par western blot, les conséquences de l'inhibition pharmacologique de l'autophagie sur l'expression de la p38 MAPK, ainsi que sur sa phosphorylation/activation à 16h de normoxie ou d'hypoxie dans les cellules U87MG (Figure 43).

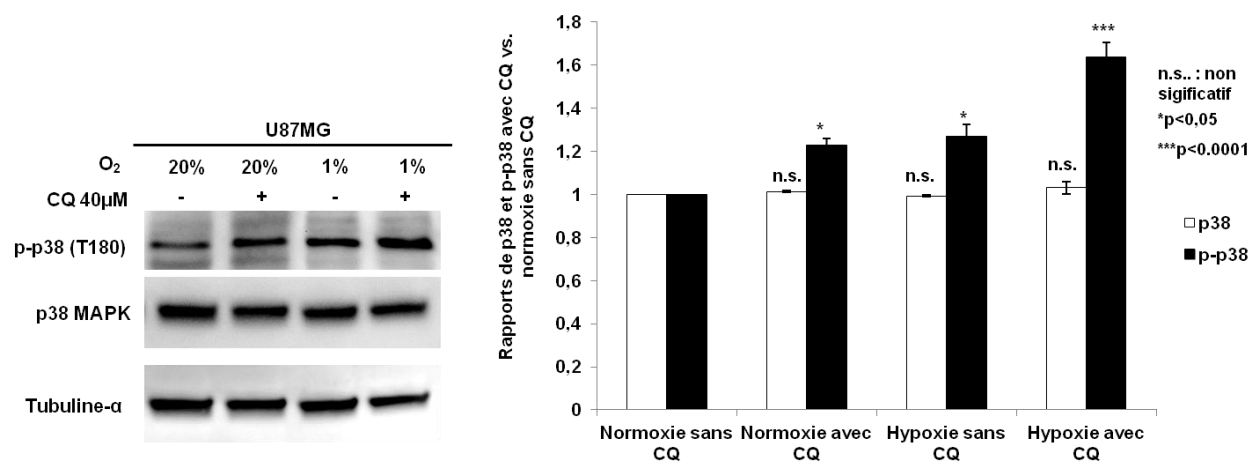


Figure 43 : Effet de l'inhibition de l'autophagie par la CQ sur la l'expression et la phosphorylation de la p38 MAPK.

Les cellules de la lignée U87MG ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie en présence ou non de la CQ. Après 16h, les protéines ont été extraites puis l'expression et la phosphorylation de la p38 MAPK ont été analysées par western blot puis quantifiées par ImageJ (image représentative de 3 expériences indépendantes).

Suite à l'inhibition de l'autophagie par la CQ, l'expression de la p38 MAPK est restée invariable, alors que le taux de phosphorylation de cette protéine a significativement augmenté. Cette augmentation était encore plus importante quand les cellules ont été cultivées en hypoxie (Figure 43). Ces données sont bien en faveur d'une potentialisation de la signalisation de TrkC lorsque l'autophagie est inhibée, pour aider les cellules à faire face au stress hypoxique.

I.6. Effet de l'inhibition de l'autophagie par la CQ sur l'expression d'Arf6

Bien que le taux d'Arf6 ne semble pas affecté par l'hypoxie, son rôle ne peut se résumer à des variations d'expression. C'est pourquoi, nous avons cherché par western blot, les conséquences de l'inhibition pharmacologique de l'autophagie sur l'expression d'Arf6 à 16h de normoxie ou d'hypoxie dans les cellules U87MG (Figure 44).

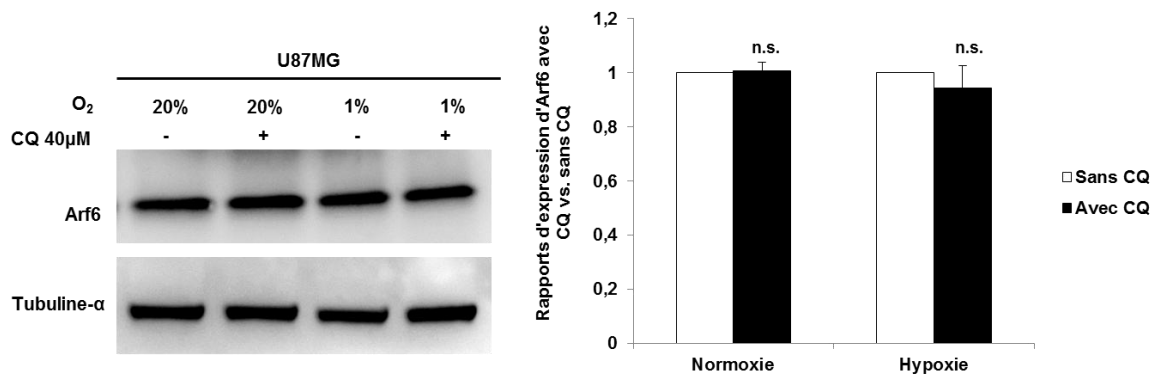


Figure 44 : Effet de la CQ sur l'expression d'Arf6 dans la lignée U87MG.

Les cellules de la lignée U87MG ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie en présence ou non de la CQ. Après 16h, les protéines ont été extraites et l'expression d'Arf6 a été analysée par western blot (3 expériences indépendantes).

L'utilisation de la CQ dans les cellules U87MG, n'a pas fait varier l'expression d'Arf6 de manière significative. Ceci était vrai en normoxie et en hypoxie (Figure 44). D'autres analyses seront nécessaires pour élucider sa place dans la signalisation du TrkC-T1 et éventuellement dans l'autophagie observée dans ces cellules.

II. Inhibition des signalisations de TrkC

II.1. Inhibition de la p38 MAPK

Plusieurs tentatives d'extinction de l'expression de TrkC FL ou TrkC-T1 ont été tentées par différents siRNA, sans succès. Nous avons donc essayé d'inhiber une cible du TrkC FL, la p38 MAPK, dont la phosphorylation augmente en hypoxie.

II.1.a. Validation du siRNA des transcrits de la p38 MAPK

Les cellules U87MG ont été transfectées par des siRNA spécifiquement dirigés contre les transcrits de la p38 MAPK. 48h plus tard, la validation de l'extinction de ces transcrits a été vérifiée par western blot (Figure 45).

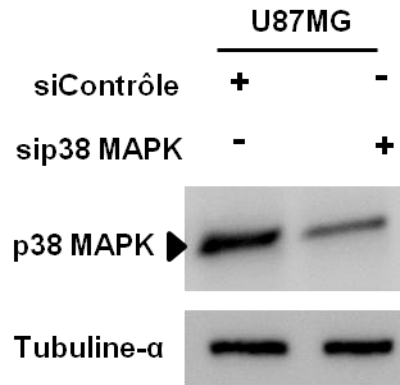


Figure 45 : Extinction des transcrits de la p38 MAPK par siRNA.

Les cellules des lignées U87MG ont été transfectées par un siRNA spécifique dirigé contre les transcrits de la p38 MAPK. Après 48h, l'expression de la protéine p38 MAPK a été analysée par western blot. Un siRNA vide a été utilisé comme contrôle.

Après avoir validé le siRNA de la p38 par western blot (Figure 45), nous avons cherché ses éventuels effets sur les cellules U87MG.

II.1.b. Effet du siRNA des transcrits de la p38 MAPK sur l'autophagie

Comme déjà mentionné dans l'introduction de cette thèse, certaines données de la littérature ont donné à la p38 MAPK un rôle négatif dans le processus autophagique, d'autres un rôle positif. Pour savoir ce qu'il en est dans les cellules U87MG, nous avons analysé le statut de la protéine LC3 en présence ou non de siRNA dirigés contre les transcrits de la p38 MAPK (Figure 46).

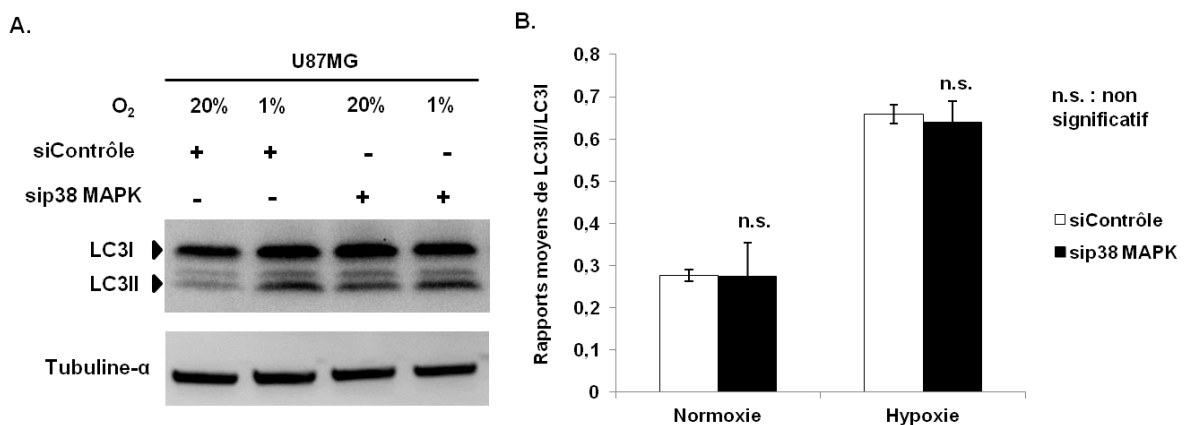


Figure 46 : Effet de l'inhibition de la p38 MAPK par siRNA sur le processus autophagique dans les cellules U87MG.

Les cellules de la lignée U87MG transfectées par des siRNA contrôle ou ciblant les transcrits de la p38 MAPK, ont été placées 48h plus tard en normoxie ou en hypoxie pendant 16h. Puis, les protéines ont été extraites et l'expression de la LC3 sous ses 2 formes, libre et liée, a été recherchée (A), ensuite les rapports LC3II/LC3I ont été calculés (B) (image représentative de 3 expériences indépendantes).

Suite à la transfection des cellules U87MG avec des siRNA dirigés contre les transcrits de la p38 MAPK, nous n'avons pas détecté de variations significatives dans la conversion de la LC3I en LC3II, ceci était vrai pour l'autophagie basale et celle induite par l'hypoxie (Figure 46), ce qui suggère que la p38 MAPK ne serait pas impliquée dans la régulation de l'autophagie des cellules U87MG.

II.1.c. Effet du siRNA des transcrits de la p38 MAPK et/ou de l'inhibition de l'autophagie sur le devenir des cellules U87MG

Comme l'expression et la signalisation du TrkC ont augmenté avec le stress hypoxique, nous avons supposé que cette voie pourrait favoriser la survie des cellules exposées à des conditions environnementales défavorables. Pour tester cette hypothèse, nous avons évalué l'influence de l'inhibition de la p38 par siRNA sur le devenir cellulaire. Pour cela, un test XTT et une numération cellulaire ont été effectués après 16h de culture en normoxie ou en hypoxie, sur les cellules des lignées U87MG transfectées ou non avec un siRNA ciblant les transcrits de la p38 MAPK (Figure 47).

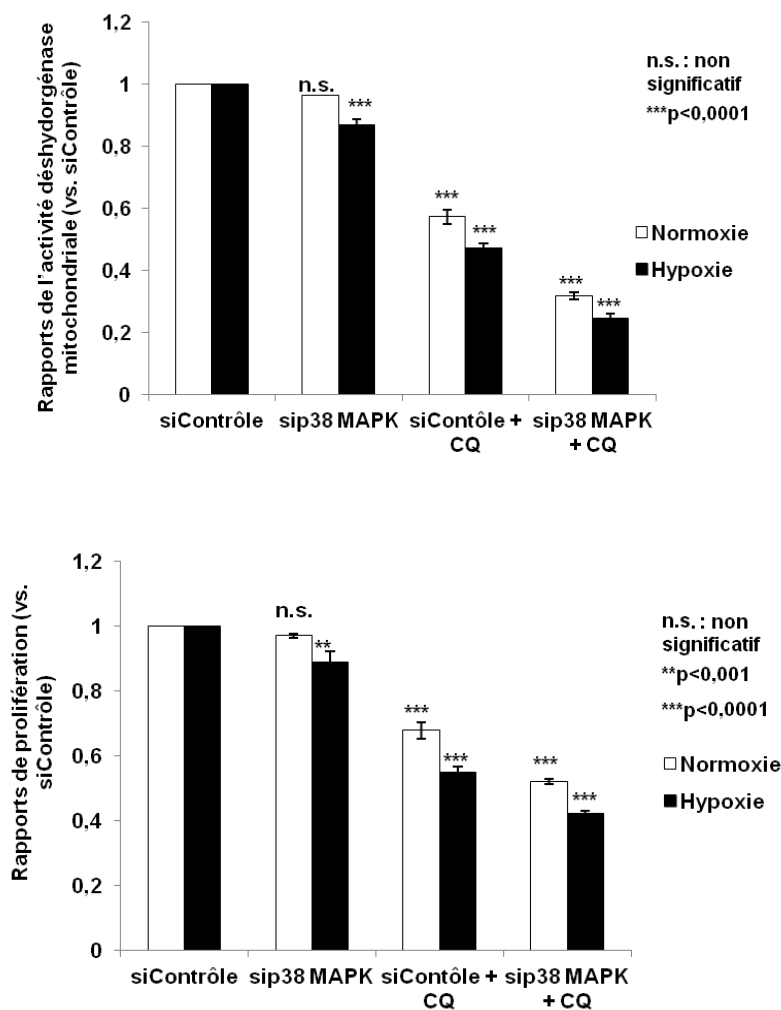


Figure 47 : Effet de l'inhibition de la p38 MAPK par siRNA sur l'activité déshydrogénase mitochondriale et la prolifération cellulaire.

Les cellules de la lignée U87MG ont été transfectées avec des siRNA contrôle ou spécifique des transcrits de la p38 MAPK. Puis, 48h plus tard, les cellules ont été cultivées en normoxie ou hypoxie pendant 16h. L'activité déshydrogénase mitochondriale et la prolifération cellulaire ont ensuite été évaluées. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test PLSD de Fisher, les valeurs de p sont indiquées, n.s. : non significatif.

Suite à l'inhibition de la p38 MAPK par siRNA, l'activité déshydrogénase mitochondriale des cellules U87MG ont significativement diminué uniquement en hypoxie. La co-inhibition de la p38 MAPK par siRNA et de l'autophagie par la CQ, a significativement réduit l'activité déshydrogénase mitochondriale des cellules cultivées en normoxie et en hypoxie (Figure 47). Suite à la numération cellulaire, des résultats similaires, mais de moins en moins grande ampleur, ont été observés (Figure 47).

Afin de savoir si cette cytotoxicité est accompagnée d'une mort cellulaire, nous avons recherché le clivage de la PARP par western blot, dans des cellules transfectées avec les mêmes siRNA en présence ou non de la CQ. (Figure 48).

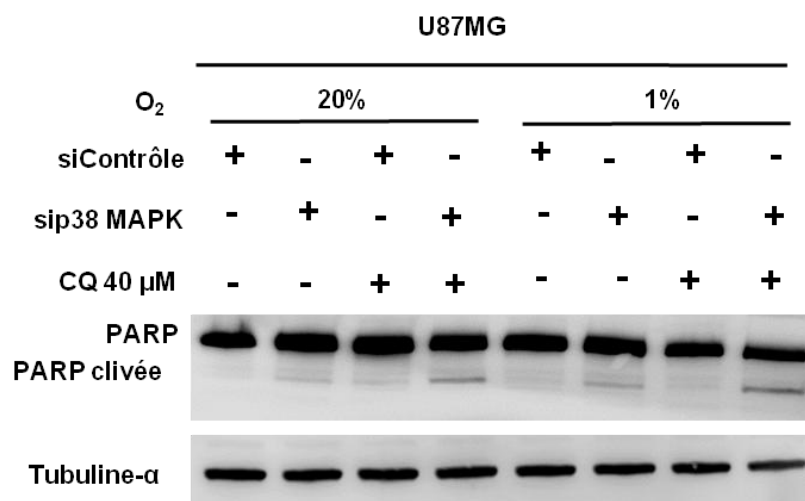


Figure 48 : Effet de l'inhibition de la p38 MAPK par siRNA sur la mort apoptotique dépendante des caspases.

Les cellules de la lignée U87MG ont été transfectées par des siRNA contrôle ou ciblant les transcrits de la p38 MAPK. 48h plus tard, les protéines ont été extraites et le clivage de la PARP a été analysé par western blot (3 expériences indépendantes).

En condition de normoxie, l'inhibition de la p38 MAPK par siRNA a induit un faible clivage de la PARP par rapport aux cellules transfectées avec le siRNA contrôle. La co-inhibition de la p38 MAPK par siRNA et de l'autophagie par la CQ, a augmenté ce clivage, qui était encore plus important quand les cellules ont été cultivées en hypoxie (Figure 48).

II.2. Effet de l'inhibition d'Arf6

II.2.a. Validation du siRNA des transcrits d'Arf6 et effet sur l'autophagie basale

Des cellules de la lignée U87MG ont été transfectées par un siRNA dirigés contre les transcrits d'Arf6. Puis, 48h plus tard, l'extinction de ces transcrits a été vérifiée en western blot. Comme il a déjà été démontré que la protéine Arf6 est impliquée dans la formation des autophagosomes (Moreau et al., 2012), la protéine LC3 a également été analysée dans ce western blot (Figure 49).

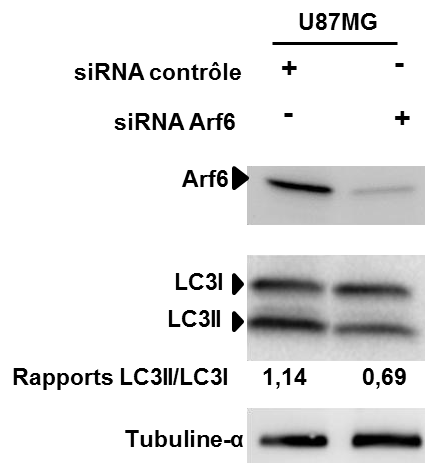


Figure 49 : Extinction des transcrits d'Arf6 par siRNA et effet sur l'autophagie basale.

Les cellules de la lignée U87MG ont été transfectées par un siRNA spécifique dirigé contre les transcrits d'Arf6, à l'aide de l'interféline. Puis après 48h, l'expression de la protéine Arf6 a été analysée par western blot, ainsi que la protéine LC3 sous ses 2 formes libre et liée. Un siRNA non ciblant a été utilisé comme contrôle.

L'extinction des transcrits d'Arf6 par siRNA a été presque totale (Figure 49). De plus, Arf6 serait impliqué dans l'autophagie des cellules U87MG. En effet, l'utilisation de siRNA spécifiques diminue la forme « lipidée » de la protéine LC3 (Figure 49). Nous avons alors recherché l'incidence de l'extinction d'Arf6 sur l'autophagie induite par l'hypoxie dans ces mêmes cellules.

II.2.b. Effet du siRNA des transcrits d'Arf6 sur l'autophagie induite par l'hypoxie

Des cellules de la lignée U87MG ont été transfectées par un siRNA dirigé contre les transcrits d'Arf6. Puis après 48h les cellules ont été placées en normoxie ou en hypoxie pendant 16h. Ensuite, un western blot de la protéine LC3 a été réalisé afin de d'évaluer l'implication d'Arf6 dans l'autophagie induite par l'hypoxie (Figure 50).

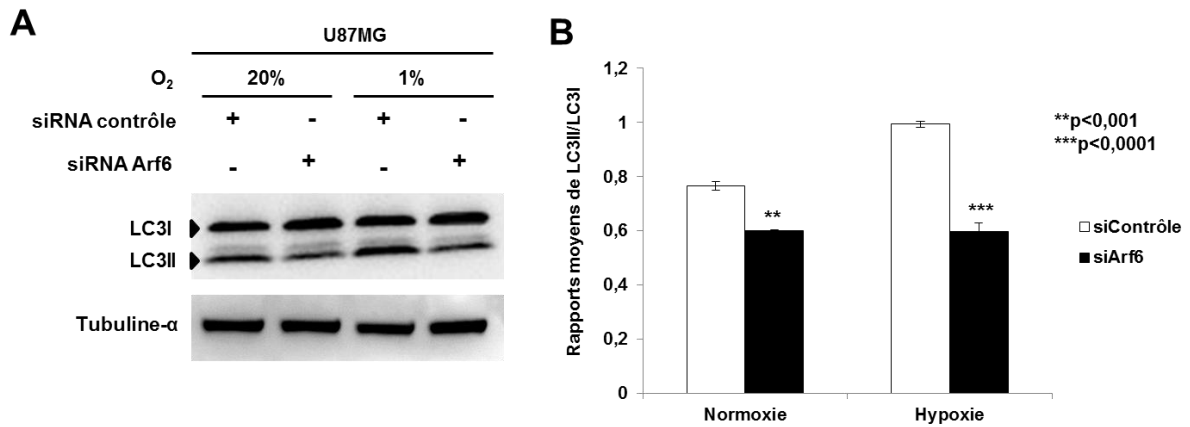


Figure 50 : Effet de l'inhibition d'Arf6 par siRNA sur le processus autophagique dans les cellules U87MG.

Les cellules de la lignée U87MG transfectées par des siRNA contrôle ou ciblant les transcrits d'Arf6, ont été placées 48h plus tard en normoxie ou en hypoxie pendant 16h. Puis, les protéines ont été extraites et l'expression de la LC3 sous ses 2 formes, libre et liée, a été recherchée (A), ensuite les rapports LC3II/LC3I ont été calculés (B) (image représentative d'au moins 3 expériences indépendantes). Les valeurs de p sont indiquées.

Suite à l'inhibition de la production d'Arf6 par un siRNA spécifique dirigé contre ses transcrits, la conversion de la LC3I en LC3II a significativement diminué en normoxie, mais plus encore en hypoxie. Ceci suggère un rôle d'Arf6 dans la mise en place du processus autophagique dans la lignée U87MG cultivée en normoxie et dans l'amplification de cette autophagie par l'hypoxie (Figure 50). Cette forme de LC3 (lipidée) a également été analysée par immunofluorescence afin d'infirmier ou de confirmer le résultat obtenu par western blot (Figure 51).

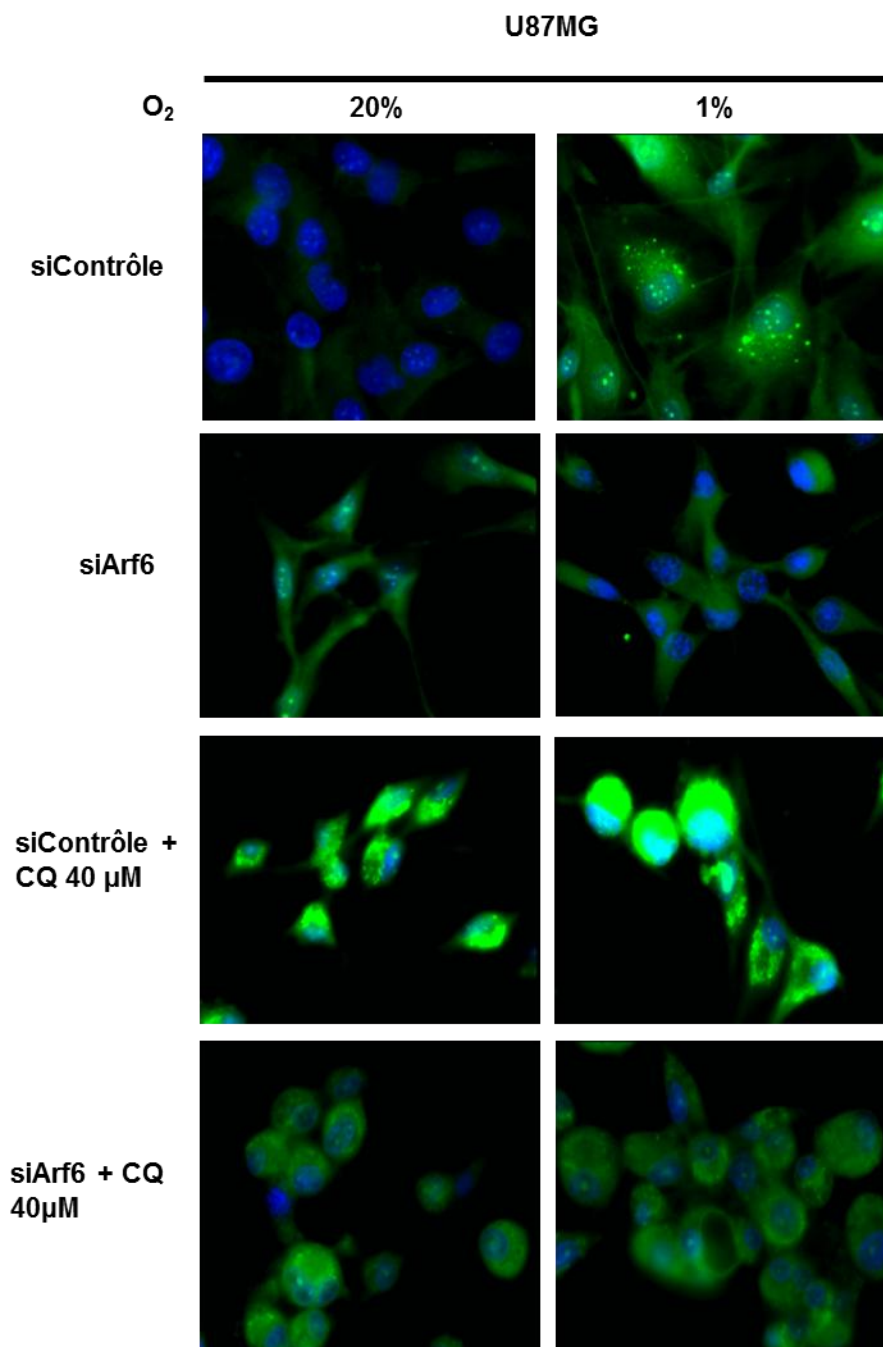


Figure 51 : Effet de l'extinction d'Arf6 sur l'autophagie dans la lignée U87MG.

Les cellules de la lignée U87MG-GFP-LC3, ont été transfectées par un siRNA contrôle ou un siRNA spécifique des transcrits d'Arf6. Puis après 48h, elles ont été placées en normoxie ou en hypoxie pendant 16h, en présence ou non de la CQ et incubées avec l'anti-GFP (autophagosomes, fluorescence verte) ; les noyaux ont été contre-colorés au DAPI. Grossissement x 60 (3 expériences indépendantes).

L'inhibition d'Arf6 par siRNA, a induit une diminution importante dans la formation d'autophagosomes en normoxie et en hypoxie. De plus, l'utilisation de la CQ avec le siArf6, n'a pas provoqué d'accumulation importante d'autophagosomes, comme c'était le cas avec le siContrôle (Figure 51). Cela semble confirmer l'implication d'Arf6 dans le processus autophagique des cellules U87MG.

II.2.c. Effet de l'inhibition d'Arf6 sur le devenir des cellules U87MG

Nous avons évalué l'influence de l'inhibition d'Arf6 par siRNA sur le devenir cellulaire. Pour cela, un test XTT et une numération cellulaire ont été effectués après 16h de culture en normoxie ou en hypoxie, sur les cellules U87MG transfectées ou non avec un siRNA ciblant les transcrits d'Arf6 (Figure 52).

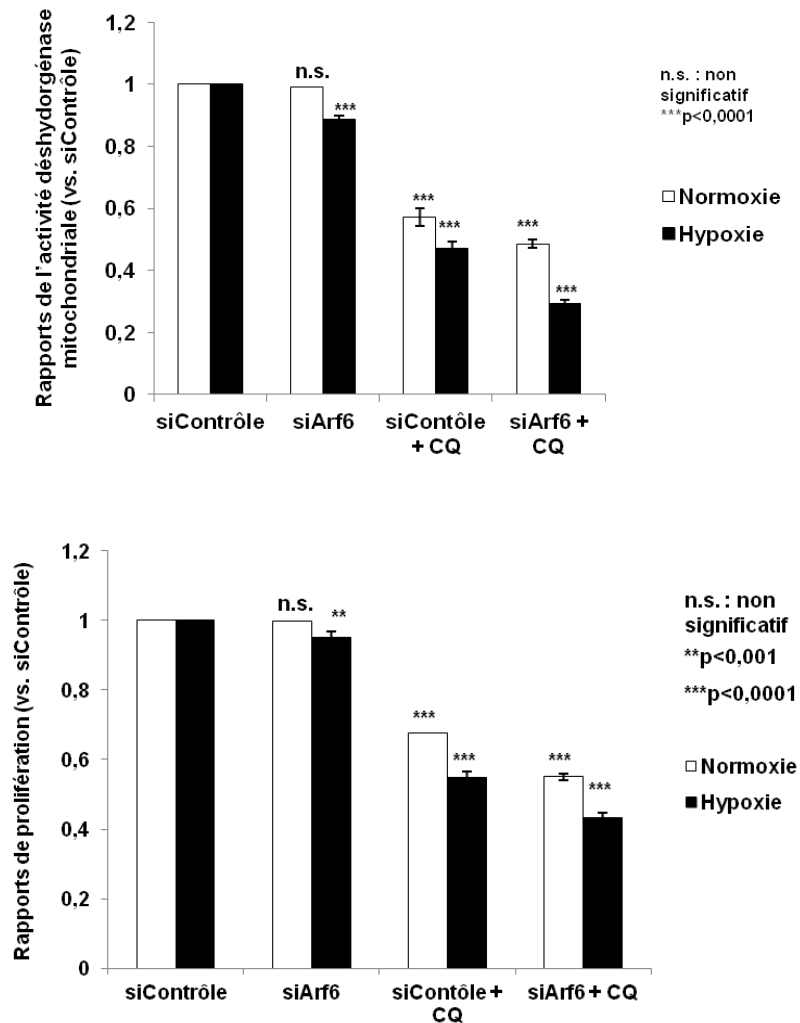


Figure 52 : Effet de l'inhibition d'Arf6 par siRNA sur l'activité déshydrogénase mitochondriale et la prolifération cellulaire.

Les cellules de la lignée U87MG ont été transfectées avec des siRNA contrôle ou spécifique des transcrits d'Arf6. Les cellules ont été cultivées en normoxie ou hypoxie pendant 16h. L'activité déshydrogénase mitochondriale et la prolifération cellulaire ont ensuite été évaluées. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test PLSD de Fisher, les valeurs de p sont indiquées, n.s. : non significatif.

Suite à l'inhibition d'Arf6 par siRNA, l'activité déshydrogénase mitochondriale des cellules U87MG a significativement diminué uniquement en hypoxie. La co-inhibition d'Arf6 par siRNA et de l'autophagie par la CQ, a significativement réduit l'activité déshydrogénase

mitochondriale des cellules cultivées en normoxie et en hypoxie (Figure 52). Suite à la numération cellulaire, les mêmes résultats ont été observés (Figure 52).

Afin de déterminer si cette cytotoxicité est accompagnée d'une mort apoptotique, nous avons recherché le clivage de la PARP par western blot, dans des cellules transfectées avec les mêmes siRNA en présence ou non de la CQ. (Figure 53) et pourrait constituer une piste pour une association thérapeutique.

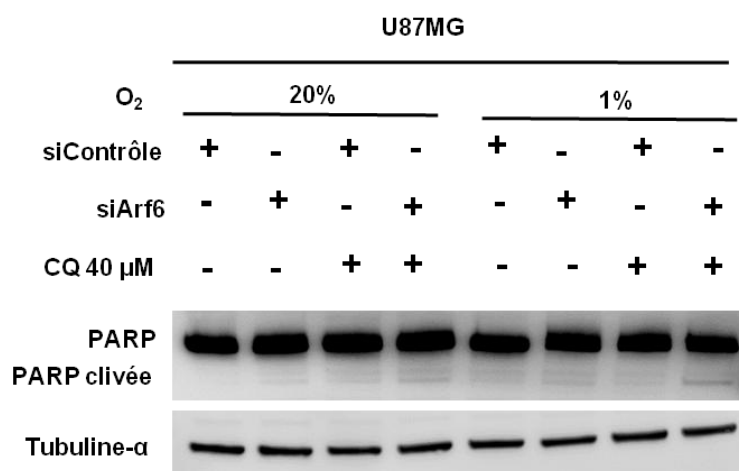


Figure 53 : Effet de l'inhibition d'Arf6 par siRNA sur la mort apoptotique dépendante des caspases.

Les cellules de la lignée U87MG ont été transfectées par des siRNA contrôle ou ciblant les transcrits d'Arf6. 48h plus tard, les protéines ont été extraites et le clivage de la PARP a été analysé par western blot (3 expériences indépendantes).

L'inhibition d'Arf6 par siRNA n'a pas induit de clivage significatif de la PARP, seule la co-inhibition d'Arf6 et de l'autophagie par la CQ, a faiblement induit une PARP clivée détectable au niveau des cellules cultivées en hypoxie (Figure 53).

Ainsi l'inhibition conjointe de l'autophagie et des signalisations associées au TrkC catalytique (passant par la p38 MAPK) ou TrkC tronqué (impliquant Arf6) a réduit de façon significative l'activité métabolique et la survie cellulaire. Cependant le double blocage de l'autophagie et de la signalisation du TrkC FL semble être plus efficace pour induire une mort apoptotique (Figure 53).

4^{ème} partie : Etudes ex-vivo : Recherche de marqueurs d'hypoxie, d'autophagie et du couple TrkC/NT-3 au niveau de prélèvements de patients atteints de GBM

Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* suggèrent une augmentation des signalisations autophagique et neurotrophique en réponse à l'hypoxie dans des cellules de GBM. Celles-ci semblent être coordonnées pour favoriser la survie des cellules tumorales en condition de stress hypoxique. Nous avons cherché si certains de ces résultats étaient retrouvés sur des prélèvements de patients atteints de GBM, en référence à une tumeur cérébrale bénigne, le cavernome. Il s'agit d'une malformation vasculaire, caractérisée par des regroupements de vaisseaux sanguins, riches en cellules endothéliales. Différents types d'analyses ont été réalisés. Sur des coupes de tumeurs de GBM incluses en paraffine, nous avons recherché la présence de zones d'hypoxie via l'immunomarquage de BNIP3, ainsi que certains marqueurs de l'autophagie (LC3) et des neurotrophines (TrkC et NT-3). Nous avons également évalué par RT-qPCR l'expression des récepteurs TrkC FL et TrkC-T1 ainsi que leur ligand, la NT-3, dans des tumeurs de patients.

I. Mise en évidence de zones d'hypoxie dans le cavernome et le GBM

Sur des coupes en paraffine de tumeurs issues de 5 patients atteints de cavernome et 15 patients atteints de GBM, un marquage de BNIP3 (marqueur d'hypoxie) a été réalisé (Figure 54).

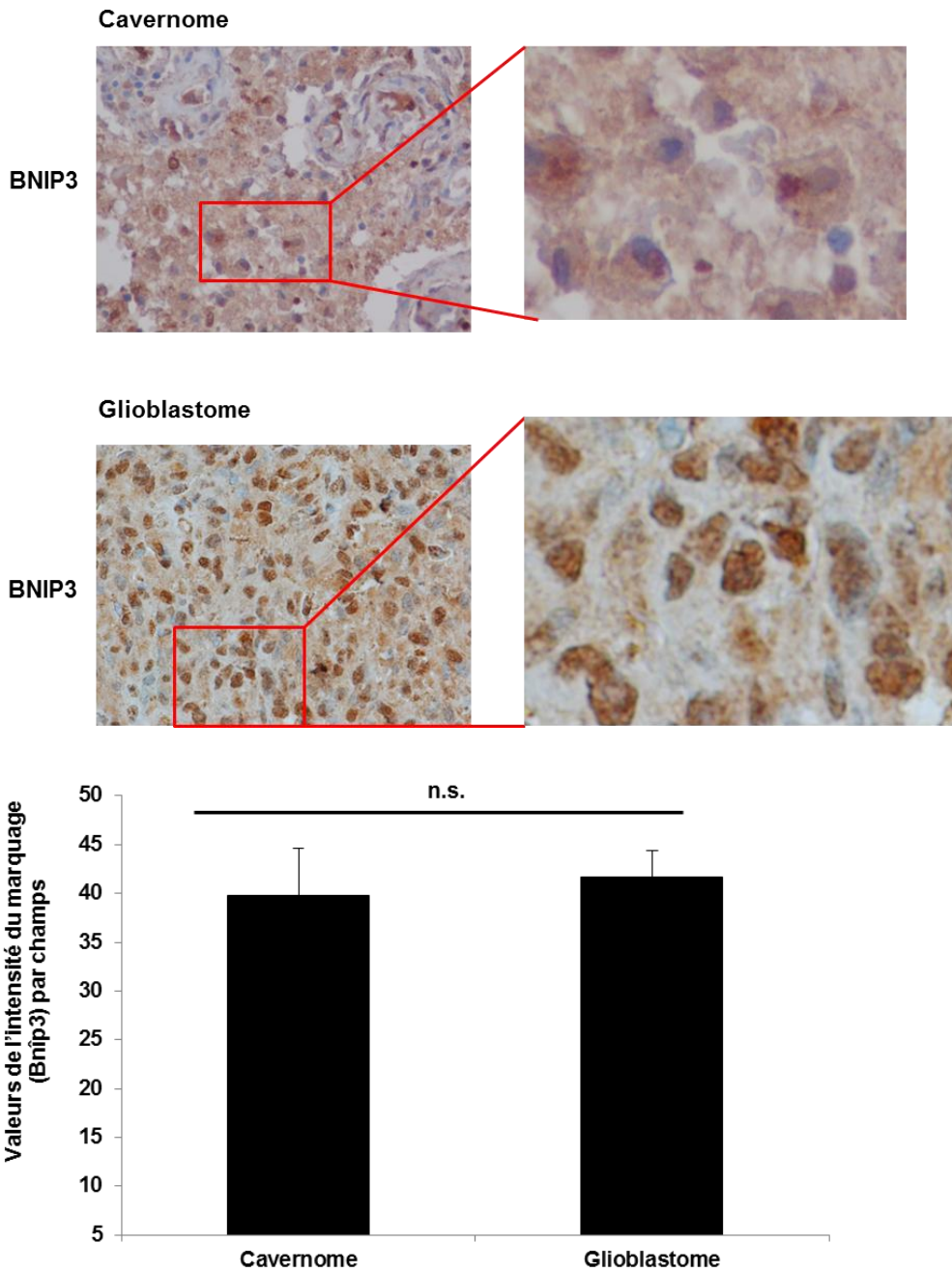


Figure 54 : Mise en évidence de zones d'hypoxie dans des tumeurs issues de patients atteints de cavernome et de GBM.

Un marquage par immunohistochimie de BNIP3, caractérisant l'hypoxie, a été réalisé sur les coupes de tumeurs. Il est visualisé en marron par la di-amino benzidine (DAB) et les noyaux sont colorés en bleu par l'hématoxyline : images représentatives de 5 patients (cavernome) et 15 patients (GBM). La quantification de l'intensité du marquage marron de 10 champs par tumeur a également été effectuée.

Les 2 types de prélèvements (cavernome et GBM) ont présenté des zones d'hypoxie. Cependant, le marquage BNIP3 dans le cavernome (tumeur cérébrale bénigne) semble être plutôt cytoplasmique, tandis que celui dans les GBM est plutôt nucléaire (Figure 54).

II. Mise en évidence de l'autophagie dans le cavernome et le GBM

Nous avons recherché un marqueur autophagique, la protéine LC3 dans le GBM (en référence au cavernome). En effet, son marquage punctiforme reflète la formation d'autophagosomes et ainsi l'induction du processus (Figure 55).

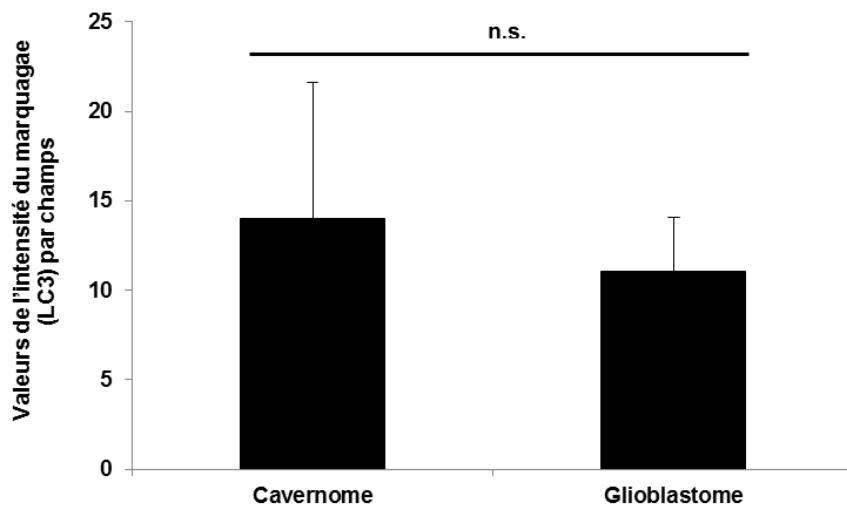
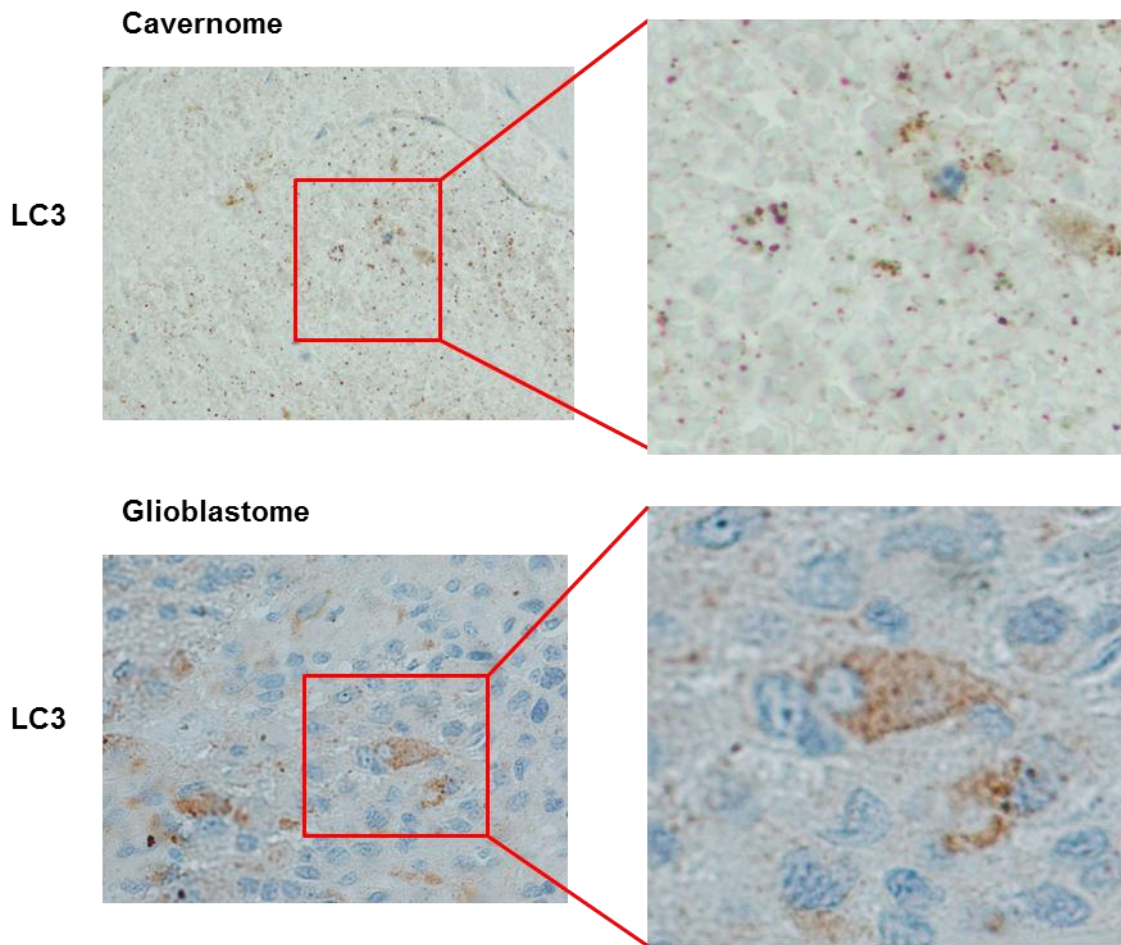


Figure 55 : Mise en évidence de l'autophagie dans des tumeurs issues de patients atteints de cavernome et de GBM.

Un marquage par immunohistochimie de la protéine LC3, caractérisant l'autophagie, a été réalisé sur les coupes de tumeurs. Il est visualisé en marron par la di-amino benzidine (DAB) et les noyaux sont colorés en bleu par l'hématoxyline (images représentatives de 5 patients (cavernome) et 15 patients (GBM)). La quantification de l'intensité du marquage marron de 10 champs par tumeur a également été effectuée.

La présence d'autophagosomes a été détectée dans les coupes des deux types de tumeurs (Figure 55). L'activation du processus peut s'expliquer par la présence de zones hypoxiques dans les deux catégories de prélèvements. En effet, le cavernome est caractérisé par la malformation de vaisseaux sanguins, à l'origine de faibles apports en O₂ et en nutriments et par conséquent de fortes zones hypoxiques. De plus, étant riche en macrophages et sidérophages résorptifs, les autophagosomes pourraient refléter un processus autophagique amplifié dans ces cellules.

III. Etude de l'expression du couple TrkC/NT-3 dans le GBM

III.1. Détection et quantification des transcrits de TrkC FL, TrkC-T1 et NT-3 par RT-qPCR

Les ARN totaux ont été extraits de tumeurs de GBM et les transcrits des récepteurs TrkC FL et TrkC-T1 ainsi que de leur ligand NT-3, ont été quantifiés par qPCR (Tableau 15). Les données ont été comparées à celles obtenues avec les lignées de GBM.

	Patients (n=10)	U87MG Normoxie	U87MG Hypoxie	M059K Normoxie	M059K Hypoxie	M059J Normoxie	M059J Hypoxie
TrkC FL	27,2	29,6	28,5	35,8	34,9	32,01	31,6
TrkC-T1	24,4	26,1	25,2	33,4	33,0	28,5	27,7
NT-3 Variant 1	0	0	0	24,8	24,8	27,3	27,2
NT-3 Variants 1 et 2	31,5	33,5	31,5	25,1	24,9	26,7	27,1

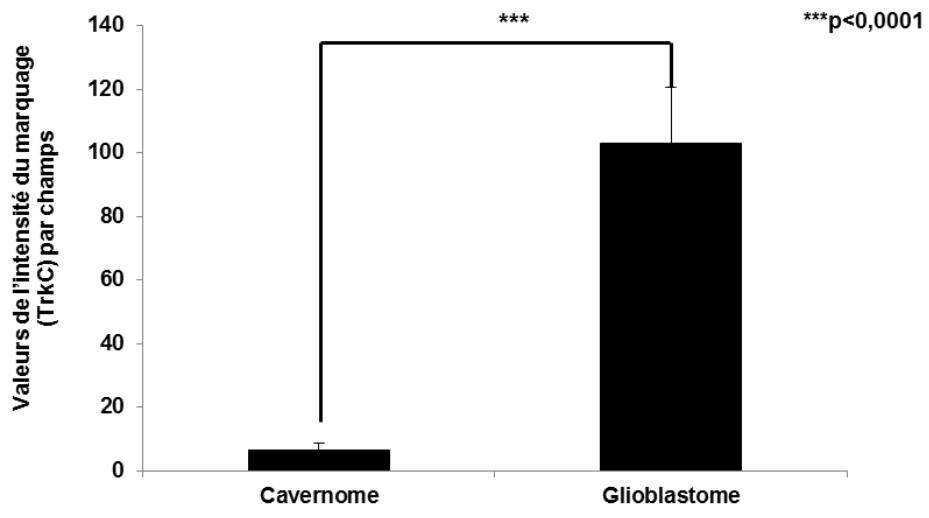
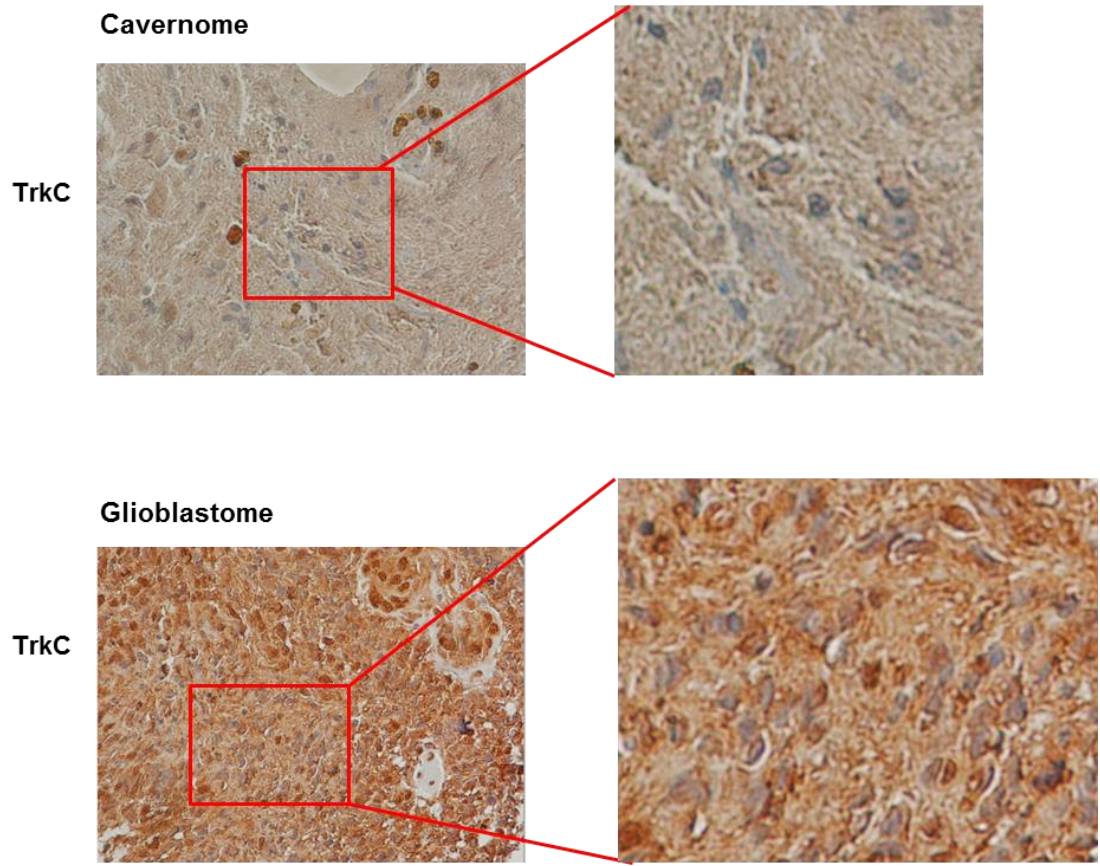
Tableau 15 : Expression du TrkC FL, TrkC-T1 et de la NT-3 dans les tumeurs de patients atteints de GBM et les lignées cellulaires.

L'analyse de l'expression des différents variants du TrkC codants le TrkC FL et le TrkC-T1 a présenté de grandes similitudes entre les prélèvements provenant de patients et la lignée cellulaire U87MG cultivée en hypoxie. De plus, l'absence d'expression du variant 1 de la NT-3 a également été observée dans les deux types d'extraits, alors qu'il était exprimé dans les lignées M059. Chez les patients atteints de GBM, comme dans la lignée U87MG, seul le variant 2 de la NT-3 était présent, à un taux similaire (Tableau 15). Ces données confortent l'utilisation de la lignée U87MG comme modèle d'étude *in-vitro* des GBM.

III.2. Détection du TrkC et NT-3 par immunohistochimie

Sur des coupes en paraffine de tumeurs issues de 5 patients atteints de cavernome et 15 patients atteints de GBM, un marquage de TrkC et de son ligand, la NT-3 a été réalisé (Figure 56).

A.



B.

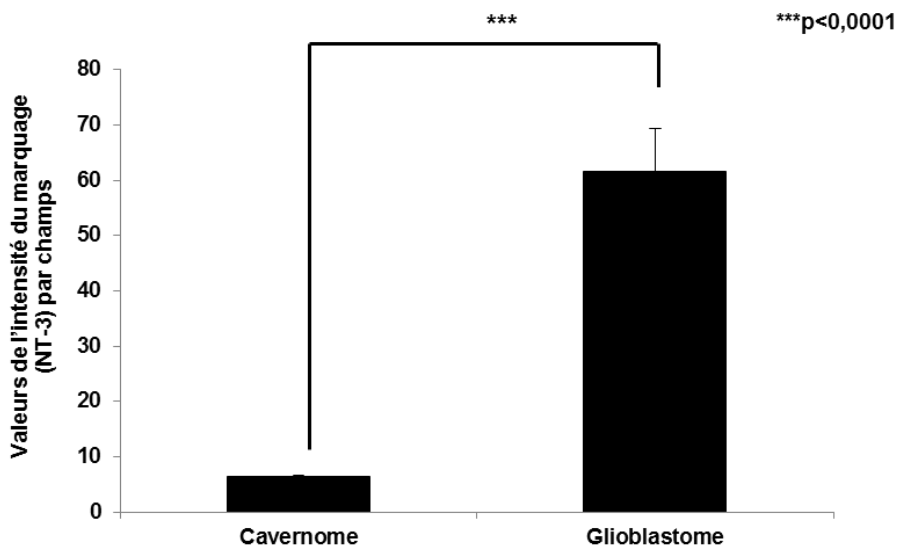
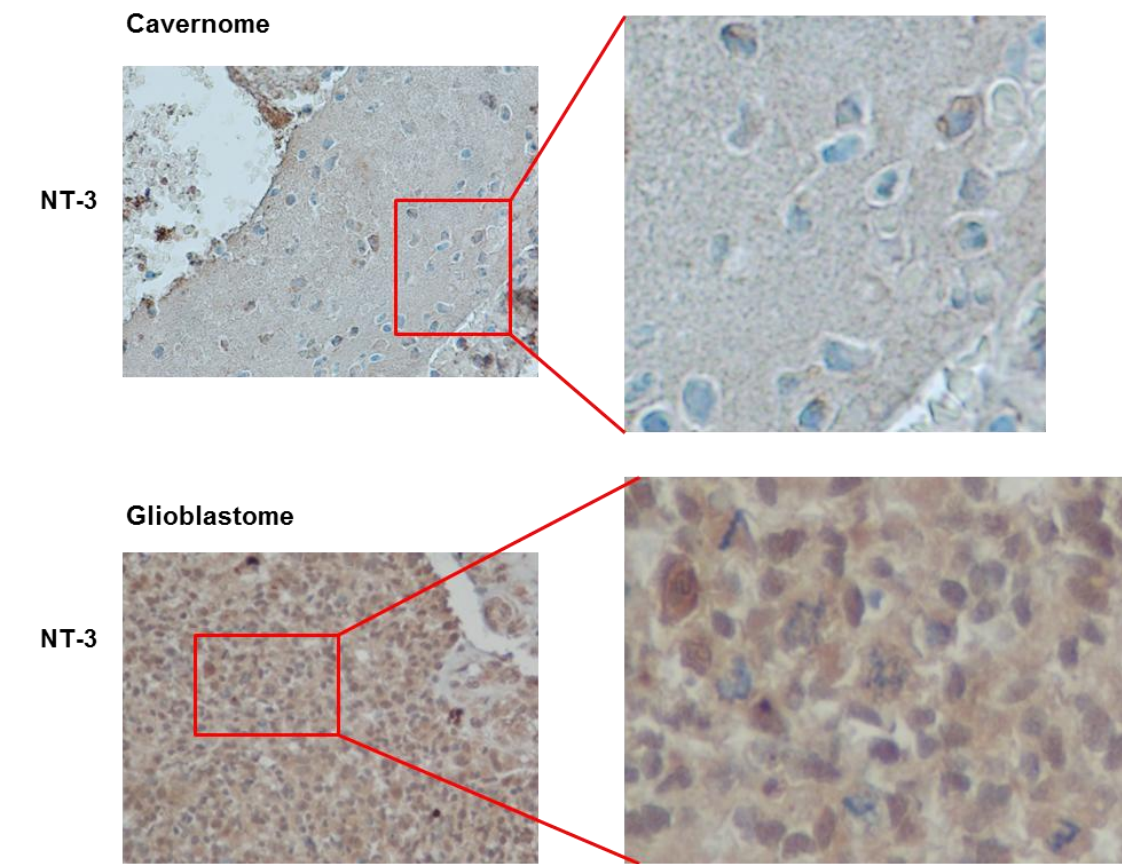


Figure 56 : Détection du TrkC et de la NT-3 dans des tumeurs issues de patients atteints de cavernome et de GBM.

Un marquage par immunohistochimie du TrkC (A), ainsi que de son ligand, la NT-3 (B), a été réalisé sur les coupes de tumeurs. Le TrkC et la NT-3 sont visualisés en marron par la di-amino benzidine (DAB) et les noyaux sont colorés en bleu par l'hématoxyline (images représentatives de 5 patients (cavernome) et 15 patients (GBM)). La quantification de l'intensité du marquage marron de 10 champs par tumeur a également été effectuée.

L'expression du TrkC et de la NT-3 dans les coupes issues de patients atteints de cavernome a été quasi absente. Alors que ces deux protéines ont été bien exprimées dans les coupes issues de patients atteints de GBM (Figure 56), la forte expression de TrkC dans les GBM et la présence de la NT-3, ont confirmé les données obtenues par RT-qPCR (Tableau 15).

Les expériences réalisées *ex-vivo*, confirment le caractère hypoxique des GBM et mettent en évidence l'induction du processus autophagique dans ces tumeurs. Par ailleurs, il existe une grande similitude d'expression du TrkC et de la NT-3 entre les patients atteints de GBM et la lignée U87MG cultivée en hypoxie.

Discussion

La formation de zones hypoxiques accompagne généralement le développement des tumeurs solides. Alors que pour des cellules normales, ce stress induit la mort, pour des cellules cancéreuses, il va conduire à une résistance et une agressivité accrue. Cette résistance est due à des mécanismes d'adaptation développés par les cellules tumorales, aboutissant à leur survie. Le GBM constitue un bon modèle d'étude de ces mécanismes car il est particulièrement résistant aux traitements, ce qui en fait la tumeur cérébrale la plus agressive. Le but de ce travail est de chercher les voies de signalisation de survie activées par des lignées de GBM humain en réponse à l'hypoxie. L'objectif à terme est de mettre en évidence de nouveaux acteurs impliqués dans l'agressivité tumorale, afin de les inhiber pour provoquer la mort cellulaire.

Au cours de ce travail nous avons exploré les voies de signalisation autophagique et neurotrophique, déclenchées par un stress de type oxydant / hypoxique, dans des cellules de GBM humain. L'hypoxie a été réalisée à l'aide d'un incubateur alimenté en diazote, afin de diminuer la pO_2 à 1%. Trois lignées cellulaires de GBM humain ont été utilisées, la lignée U87MG qui est la mieux caractérisée des GBM, et les lignées M059K et M059J. Bien que celles-ci soient issues du même patient, les cellules M059J ne sont pas capables de produire la sous-unité catalytique de l'enzyme de réparation de l'ADN, la DNA-PK (Allalunis-Turner et al., 1995; Hoppe et al., 2000). En effet, elles sont mutées pour le gène codant cette enzyme, le *PRKDC*, présent sur le chromosome 8. En revanche, la lignée M059K, sous-exprime cette protéine mais en produit suffisamment pour réparer les dommages à l'ADN (Anderson et al., 2001). De ce fait, les cellules M059J sont radiosensibles, alors que les cellules M059K sont radiorésistantes.

D'autres altérations génétiques ont été cherchées dans les trois lignées cellulaires, avec l'aide du service d'anatomo-pathologie du CHU de Limoges. En effet, par la technique MLPA Holland, nous avons détecté une mutation R172K du gène codant l'isocitrate déshydrogénase 1 *IDH1* dans la lignée U87MG, alors qu'une amplification dans les exons 2 et 10 d'*IDH2* a été détectée dans l'exon 8 de la lignée M059J. Dans cette même lignée, des altérations génétiques ont été identifiées dans 3 gènes différents : l'exon 8 de *TP53* (amplification de l'exon 8 du gène codant la p53), l'exon 2 d'*EGFR* (amplification) et l'exon 6 de *PTEN* (amplification). Il serait important de refaire ces expériences qui n'ont été faites qu'une seule fois pour confirmer l'existence de ces altérations. Celles-ci intervenant dans des gènes suppresseurs de tumeur (*TP53* et *PTEN*) et dans l'*EGFR*, bien connu pour son rôle pro-tumoral, elles impactent vraisemblablement le comportement des cellules de GBM et pourraient, au moins en partie expliquer l'agressivité de ces tumeurs.

Après cette analyse, nous avons procédé à une étude du devenir cellulaire en réponse à l'hypoxie, et ce en effectuant des tests XTT (mesure de l'activité déshydrogénase

mitochondriale) et de numération/viabilité à l'aide du bleu de trypan. Nous avons détecté une petite diminution de l'activité déshydrogénase mitochondriale et du nombre de cellules, dans les 3 lignées cellulaires, après 8h d'hypoxie, mais cette réduction n'était pas accompagnée de mort cellulaire. On peut supposer qu'il s'agit d'un retard de croissance cellulaire (pouvant correspondre à de la quiescence transitoire et de l'autophagie). Cette hypothèse est vérifiée par la reprise de la viabilité et de l'activité déshydrogénase à 16h, tout en restant moins élevées que celles obtenues avec les cellules cultivées en normoxie. L'hypoxie correspond à l'environnement physiologique normal des tumeurs solides (Adam et al., 1999), conduisant à la mise en place des mécanismes d'adaptation au niveau des cellules cancéreuses. Cette légère décroissance de la viabilité et de l'activité déshydrogénase en hypoxie, correspondrait au temps nécessaire pour l'adaptation cellulaire à l'environnement défavorable. Parmi les mécanismes connus, l'autophagie tient une place de plus en plus évidente. En effet, l'induction de celle-ci en réponse à l'hypoxie a été rapportée dans plusieurs types de cancers dont le GBM (Hu et al., 2012; Zou et al., 2014b). De plus, ce processus a contribué à la résistance des cellules cancéreuses aux traitements de chimiothérapie (Hu et al., 2012) et de radiothérapie (Zou et al., 2014b). Dans un premier temps, nous avons cherché les principaux acteurs, impliqués dans chaque étape de ce processus catabolique : la nucléation, l'élongation et la dégradation de l'autophagosome. Durant la phase de nucléation, il y a association d'une molécule PI3K de classe III avec une molécule Beclin1 ; celle-ci a été cherchée par western blot, dans les 3 lignées cellulaires cultivées en normoxie ou en hypoxie, pendant une cinétique allant de 4 à 16h. Nous n'avons pas détecté de variations significatives dans l'expression de cette protéine. Cependant, il a été montré dans d'autres études (Fu et al., 2013) que l'activité de cet inducteur d'autophagie est régulée par les interactions qu'il peut réaliser avec d'autres membres de la famille Bcl-2 par exemple. Pour compléter ce travail, il serait donc intéressant d'analyser les éventuelles interférences de Beclin1 pouvant influencer sa fonction. Suite à la nucléation, intervient l'élongation de l'autophagosome, qui implique l'expression de plusieurs gènes de la famille ATG (Autophagy related Genes) et des protéines Atg (Klionsky et al., 2003). Parmi celles-ci, l'Atg5 forme un complexe avec l'Atg12 pour s'associer à la membrane autophagosomale. Nous avons cherché par western blot, l'expression d'Atg5 dans les trois lignées cellulaires, mais nous n'avons pas détecté sa forme libre. Elle était de manière constante associée à l'Atg12 et le complexe Atg5/Atg12 n'a pas significativement varié dans les trois lignées cellulaires. Ensuite, l'expression d'une autre protéine d'élongation la MAP-LC3 utilisée comme marqueur d'autophagie a été analysée. Il s'agit d'une molécule associée aux microtubules du cytosquelette, présente dans le cytosol, lorsque l'autophagie est induite et que la membrane pré-autophagosomale se forme. La protéine LC3 initialement libre, vient s'associer à de la phosphatidyléthanolamine (PE), un lipide lui permettant de s'ancrer à la

membrane de l'autophagosome en formation. En effet, la LC3 passe d'une forme libre appelée LC3I, à une forme lipidée et liée à l'autophagosome appelée LC3II. La conversion de la LC3I en LC3II a été cherchée par western blot, ces deux formes ayant des tailles différentes. Bien que la molécule LC3II soit plus lourde, elle migre plus vite du fait de sa lipidation; ainsi, elle apparaît après migration à environ 14 KDa. La LC3I qui est plus légère, est détectée à un poids moléculaire apparent de 16 KDa après migration. Nous avons décelé une augmentation significative de la conversion de la LC3I en LC3II, en condition d'hypoxie, correspondant à une activité autophagique accrue, dans les trois lignées cellulaires, par rapport à celles cultivées en normoxie. Ceci est en cohérence avec les données de la littérature (Hu et al., 2012). Afin de confirmer cette autophagie induite par l'hypoxie, des cellules des trois lignées cellulaires ont été transfectées par le vecteur GFP-Autophago-LC3, ce qui a permis de produire la protéine de fusion GFP-LC3. Ainsi le niveau de la fluorescence verte reflète celui de la LC3 exprimée. Suite à l'hypoxie, une augmentation significative du marquage punctiforme de la GFP-LC3, est détectée dans les trois lignées cellulaires, correspondant à la formation d'autophagosomes auxquels la GFP-LC3 est associée. De plus, le nombre d'autophagosomes par cellule autophagique, s'est significativement accru dans les trois lignées cellulaires cultivées en hypoxie, confirmant l'activation du processus de recyclage.

Il est maintenant admis qu'il existe un lien entre le protéasome et l'autophagosome, qui ont été longtemps considérés comme des systèmes indépendants. Ces voies de dégradation partagent des substrats et des molécules régulatrices, et possèdent des fonctions coordonnées et compensatoires (Lippai and Löw, 2014). En effet, des récepteurs autophagiques ont été découverts tels que la p62/SQSTM1. Celle-ci a la capacité de reconnaître les protéines ubiquitinylées à éliminer, et de les adresser à l'autophagosome, en se liant à de petites protéines autophagiques de type ubiquitin-like, appartenant à la famille de la MAP-LC3. Par conséquent, la p62 est séquestrée par l'autophagosome qui, suite à sa fusion avec le lysosome, aboutit à la dégradation de la p62 avec le matériel déjà séquestré. Dans les trois lignées cellulaires étudiées, nous avons observé, par western blot, une diminution significative de l'intensité de la bande correspondant à la p62, impliquant une augmentation de sa dégradation.

Pour vérifier l'efficacité et la fonctionnalité de l'autophagie, « ce flux » a été inhibé par la chloroquine (CQ). Il s'agit d'une molécule antipaludique de la famille des amino-4-quinoléines (Wiesner et al., 2003). La CQ présente le double avantage d'être peu onéreuse et de ne pas présenter de forte toxicité pour l'homme (Breckenridge and Winstanley, 1997). Dans sa forme "non protonée", la CQ diffuse au travers les membranes cellulaires, pour devenir "protonée", et s'accumule dans les organites acides tels que les endosomes et les

lysosomes. Cette accumulation empêche la fusion des endosomes avec les lysosomes en inhibant les enzymes de cet organite, dont le fonctionnement requière un pH acide (Steinman et al., 1983). Comme la CQ augmente le pH lysosomal, elle inhibe l'autophagie, en bloquant à la fois la fusion des autophagosomes avec les lysosomes et l'activité lysosomale (Shintani and Klionsky, 2004).

Suite à l'utilisation de la CQ, nous avons détecté, par western blot, une accumulation de la LC3II et de la p62. Dans les trois lignées cellulaires en immunofluorescence, on observe un accroissement, plus important en hypoxie qu'en normoxie, du marquage punctiforme de la GFP-LC3 ; ceci correspondant à un plus grand nombre d'autophagosomes non dégradés par les lysosomes.

Par la suite, nous avons cherché si cette autophagie induite en hypoxie, impactait le devenir cellulaire suite au stress oxydant. Lorsque nous avons effectué des tests XTT et de numération cellulaire, en présence de CQ, dans les cellules cultivées en normoxie ou en hypoxie, il est apparu à nouveau un retard de croissance déjà observé dans cette dernière condition. Cependant, quand la CQ est utilisée, le délai de retour à « la normale » de la progression de la prolifération (tests XTT et numération cellulaire) n'apparaît pas, ceci pouvant correspondre aussi à une légère mort contrebalancée par une prolifération limitée. Cette seconde hypothèse a été infirmée par la recherche du clivage de la PARP par western blot. En effet, il n'y avait pas d'augmentation du clivage de la PARP dans toutes les conditions réalisées, ce qui signifie l'absence d'induction d'une apoptose dépendante des caspases, même après prolongation du temps de traitement jusqu'à 24h, laissant plutôt supposer une quiescence cellulaire. Cependant, nous ne pouvons pas formellement écarter l'hypothèse d'une autre voie de mort (indépendante des caspases ou nécrotique). Ainsi, l'autophagie participerait au moins dans un premier temps, à la protection cellulaire vis à vis du stress hypoxique en réduisant l'activité métabolique, compatible avec une entrée en quiescence. En cas de stress prolongé, ce mécanisme pourrait conduire ultimement à la mort, comme cela a été montré dans plusieurs modèles de cellules tumorales (Naves et al., 2013).

Les essais de CQ et de son analogue (l'hydroxycloquine) décrits actuellement, suggèrent des propriétés anti-cancéreuses (Solomon and Lee, 2009), quand elle est associée à d'autres molécules. En effet, du fait que les tumeurs solides développent un environnement extracellulaire acide (Boyer and Tannock, 1992; Newell et al., 1993), la combinaison d'un traitement avec l'étoposide et la CQ, ciblerait sélectivement les cellules cancéreuses, et protégerait les cellules normales (Jensen et al., 1994). De plus, la CQ pourrait sensibiliser de multiples cancers à la radiothérapie (Munshi et al., 2008) et à la chimiothérapie (Solomon and Lee, 2009). Parmi les études les plus récentes, il a été décrit

une induction d'apoptose dans des cellules du cancer du sein traitées à la fois par la CQ et le Trastuzumab (Cufí et al., 2013). De plus, cette association de traitement a réduit la croissance tumorale de plus de 90%, dans un modèle de xénogreffe d'une tumeur du sein initialement résistante au Trastuzumab, soulignant ainsi sa sensibilité à l'inhibition du flux autophagique (Cufí et al., 2013). Actuellement, il y a plus de 30 essais portant sur des combinaisons de l'hydroxychloroquine avec des agents anticancéreux (Lotze et al., 2013).

Dans notre modèle, sur les trois lignées de GBM cultivées en hypoxie, la CQ, utilisée seule n'a pas provoqué de mort cellulaire, laissant supposer que l'inhibition de l'autophagie n'est pas suffisante pour cette induction. Pour vérifier cela, nous avons transfecté les cellules avec des ARN interférants, dirigés spécifiquement contre les ARNm de deux protéines importantes de l'autophagie, Beclin1 et Atg5. Un siRNA ne ciblant pas d'ARNm spécifique, a été utilisé comme contrôle. Ces manipulations n'ont pu se faire que sur les lignées U87MG et M059K. En effet, la lignée M059J était trop sensible à l'agent transfectant, l'interféron et des essais de transfection par électroporation (Amaza), n'ont pas réduit l'expression des protéines Beclin1 et Atg5. L'efficacité des siRNA sur les cellules U87MG et M059K a d'abord été validée par western blot, par rapport à la réduction de production des protéines Beclin1 et Atg5, ainsi qu'à la diminution de la conversion de la LC3I en LC3II. Ensuite, des tests XTT et de numération cellulaire, ont été effectués sur des cellules transfectées avec l'un des trois siRNA et cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant 16h. Nous avons à nouveau obtenu une diminution de l'activité déshydrogénase mitochondriale et du nombre de cellules, en normoxie et en hypoxie, avec une diminution plus importante en hypoxie, ceci validant les résultats obtenus avec la chloroquine. Nous n'avons pas détecté de mort cellulaire pendant 24h, suggérant à nouveau un état de quiescence des cellules.

Ces résultats diffèrent de ceux que nous avons obtenus dans une étude précédente réalisée sur des cellules de neuroblastome, cultivées en présence d'un mimétique de l'hypoxie, le CoCl_2 (Naves et al., 2013). Dans ce modèle, seules les cellules exprimant une p53 mutée engageaient une signalisation autophagique face au stress, alors que les cellules ayant une p53 « sauvage » mouraient par apoptose mitochondriale classique. L'inhibition pharmacologique de l'autophagie (par la 3-MA ou la BAF1), dans la lignée p53 mutée, conduisait à une activation de l'apoptose caspase dépendante. Ces données suggéraient l'implication de p53 dans le devenir des cellules de neuroblastome, face au stress hypoxique généré par le mimétique.

Cette différence de comportement suite au blocage de l'autophagie (diminution de croissance non accompagnée d'apoptose dans les cellules de GBM), suggère qu'une autre voie de signalisation, serait à l'origine de la résistance de ces cellules cancéreuses. En effet,

comme nous l'avons vérifié, les lignées U87MG et M059K ne présentent pas de mutation dans le gène *TP53*, pouvant expliquer la résistance de ces cellules. Le savoir faire de l'équipe concernant les signalisations des neurotrophines, nous a incité à explorer l'état de transcription des gènes des neurotrophines ainsi que de leurs récepteurs, par RT-PCR quantitative (qPCR), dans les trois lignées cellulaires cultivées en normoxie ou en hypoxie.

En effet, la signalisation des neurotrophines (NTs) correspond essentiellement à une voie de prolifération et de survie cellulaire. Or, dans les cellules cancéreuses, certaines voies neurotrophiques sont considérées comme de bon pronostic et d'autres non. Pour les gliomes, le récepteur TrkA activé par le NGF, était considéré en 1999 comme étant de mauvais pronostic, pour sa capacité à augmenter la prolifération cellulaire dans des lignées de GBM humain (Singer et al., 1999). Cependant, en 2007, le TrkA était considéré par d'autres auteurs comme étant de bon pronostic, pour sa capacité à induire la mort autophagique dans le même type cellulaire (Hansen et al., 2007). Une autre étude suggère l'implication de TrkA et TrkB dans la pathogénèse tumorale et la progression des gliomes de bas grade vers un stade plus malin (Wadhwa et al., 2003). Le récepteur p75^{NTR} est décrit comme responsable de la grande capacité invasive des gliomes malins, et de leur résistance aux thérapies conventionnelles (Johnston et al., 2007). Cependant, il n'y a que peu de données sur le couple TrkC/NT-3 et les GBM. Une seule publication de 1997 décrivait la présence d'un TrkC non fonctionnel dans les cellules U87MG (Chin et al., 1997) et une plus récente (Lawn et al., 2015) rapportait l'importance de la signalisation de TrkB et TrkC dans la croissance des cellules initiatrices de tumeurs cérébrales.

Les neurotrophines ainsi que leurs récepteurs ont été étudiées dans les trois lignées cellulaires, cultivées en normoxie ou en hypoxie et ont permis de détecter un accroissement significatif de la transcription de TrkC et NT-3 en hypoxie, particulièrement dans la lignée U87MG. Dans cette dernière et avec ces conditions de culture, nous avons par la suite analysé le couple TrkC/NT-3 par western blot et avons observé en hypoxie un accroissement de l'expression du TrkC. De plus, en western blot une autre bande de TrkC à environ 60 KDa est également augmentée en hypoxie. Ce signal correspond à une isoforme du TrkC, issue de la traduction d'un variant tronqué de ce dernier, lui-même issu d'épissage alternatif (Brodeur et al., 2009). Nous avons redéfini une sonde oligonucléotidique reconnaissant spécifiquement le variant tronqué appelé TrkC-T1 ou TR-NTRK3 (Brodeur et al., 2009), tandis que l'autre variant déjà amplifié, correspondant à la forme non tronquée, est appelé TrkC-FL. Ainsi nous avons pu détecter un transcrit de ce dernier en plus grande quantité en hypoxie dans les trois lignées cellulaires et particulièrement dans les U87MG. L'absence d'augmentation du taux de NT-3 sur le western blot peut s'expliquer par le fait que l'analyse a été réalisée sur lysat cellulaire alors que la neurotrophine est sécrétée dans

le milieu. La recherche de NT-3 par ELISA dans le surnageant de culture a été infructueuse et ne nous a pas permis de conclure. Nous nous sommes ensuite intéressés à la signalisation du TrkC-FL d'une part, et à TrkC-T1 d'autre part dans cette lignée cellulaire.

Comme le TrkC-FL possède la partie intracellulaire à activité tyrosine kinase, il pourrait activer les voies de signalisation en aval de ce type de récepteur. Nous avons déterminé qu'il était phosphorylé, processus accru en hypoxie. Nous avons ensuite examiné les voies de signalisation dépendantes de la phosphorylation du récepteur. Suite à l'hypoxie, nous n'avons pas détecté de variations significatives dans le taux de phosphorylation d'Akt et de mTOR, acteurs de la voie de signalisation PI3K/Akt. En revanche, dans les mêmes conditions de privation de dioxygène, les formes phosphorylées d'ERK1/2 et de JNK ont significativement diminué, alors que seule la forme phosphorylée de p38 MAPK a faiblement augmenté. Ainsi on peut supposer que suite à son expression et activation accrue en hypoxie, le TrkC-FL jouerait sur une cible particulière qui est la p38 MAPK, déjà décrite comme activée en condition de stress dans les gliomes (Kim et al., 2014). La capacité restreinte du TrkC-FL à induire les voies classiques de signalisation (PI3K/Akt et ERK1/2) alors qu'il est plus exprimé et phosphorylé, pourrait être due à l'accroissement du TrkC-T1. En effet, la fonction de ce dernier a longtemps été associée à l'inhibition du récepteur catalytique (TrkC FL), via un mécanisme de dominant-négatif, ou de séquestration du ligand (NT-3) (Guidi et al., 2010).

Dans le but d'inhiber la signalisation du TrkC FL, nous avons utilisé plusieurs siRNA différents, or, ces tentatives ont été sans succès. Nous avons choisi d'inhiber sa signalisation, par des siRNA spécifiques dirigés contre la p38 MAPK, dont la phosphorylation augmente en hypoxie. Suite à la transfection des cellules U87MG par ces siRNA, leur activité métabolique étudiée par des tests XTT, a significativement diminué dans les cellules cultivées en hypoxie. De plus, les numérations cellulaires effectuées ont montré une diminution significative de la prolifération cellulaire. L'éventuelle induction d'un mécanisme apoptotique au niveau de ces cellules a été recherchée par un western blot de la PARP. Un clivage de cette dernière a été observé au niveau des cellules transfectées par les siRNA p38 cultivées en hypoxie. L'ajout de la CQ en plus des siRNA p38, a augmenté ce clivage de PARP surtout au niveau des cellules cultivées en hypoxie.

L'inhibition de la p38 MAPK par siRNA n'a pas significativement affecté l'autophagie, comme en atteste la conversion de la LC3I en LC3II visible sur western blot. Or, l'inhibition de l'autophagie par la CQ a significativement augmenté l'activation de la p38 (augmentation de sa forme phosphorylée). Cela laisse supposer que la signalisation du TrkC FL augmente en absence d'autophagie afin de compenser l'absence de ce mécanisme de survie

cellulaire. Cette augmentation pourrait également expliquer l'absence de mort que nous avons observée quand l'autophagie est inhibée.

Ces données ont été confirmées par l'observation de l'accumulation du TrkC en présence de CQ. Les 2 formes FL et tronquée du TrkC ont été accumulées, et cela de façon plus importante en hypoxie. Le même résultat a été observé suite à la réduction de l'autophagie par des siRNA spécifiques de Beclin1 et d'Atg5. Ces données ont été confirmées par immunofluorescence, où le marquage de TrkC total a fortement augmenté suite à l'utilisation de la CQ, surtout en hypoxie. Ces résultats laissent supposer que le TrkC pourrait être dégradé par autophagie. Cependant, l'augmentation de sa phosphorylation et de celle de p38, ainsi que l'absence de colocalisation avec les autophagosomes va à l'encontre de cette possibilité. Elle corrobore l'hypothèse d'une compensation de l'autophagie, lorsque celle-ci est inhibée, pour assurer la survie cellulaire.

Comme le récepteur TrkC-T1, est dépourvu du domaine à activité tyrosine kinase, nous avons cherché l'un de ses partenaires au niveau intracellulaire, Arf6. En effet, il a été démontré en 2006 que suite à la liaison de la NT-3 sur ce récepteur, il y a activation de diverses molécules impliquées dans le remodelage membranaire, la réorganisation du cytosquelette et le mouvement cellulaire, telles que Arf6 (Esteban et al., 2006). Dans une étude plus récente, Arf6 a été associé à la production de PIP₂ et l'activation de la phospholipase D (PLD) (Moreau et al., 2012). Le PIP₂ est important pour induire l'autophagie (Brown et al., 2001) et la PLD conduit à la formation de l'acide phosphatidique (PA), un lipide impliqué dans la biogenèse autophagosomale (Dall'Armi et al., 2010). Arf6 participe donc à l'activation de l'autophagie (Moreau et al., 2012).

Nous avons d'abord cherché l'expression d'Arf6 dans des cellules de la lignée U87MG, cultivées en normoxie ou en hypoxie, en présence ou non de CQ. Nous avons montré qu'Arf6 est bien exprimé en normoxie et en hypoxie, sans variation significative de son taux de production, qui n'est pas non plus affecté par la CQ. Dans la suite du travail, nous avons réduit son expression par un siRNA spécifique, et évalué l'impact sur le devenir cellulaire et sur l'autophagie. L'activité métabolique des cellules a significativement diminué suite à l'inhibition d'Arf6 par siRNA, cette diminution était d'autant plus importante suite à l'ajout concomitant de la CQ. Toutefois, nous n'avons pas détecté de mise en place d'un processus apoptotique dépendant des caspases, comme en atteste l'absence de clivage de la PARP. Dans ce cas, de façon similaire à ce que nous avons précédemment observé, nous supposons une entrée en quiescence des cellules (que nous n'avons pas pu vérifier expérimentalement). De plus, suite à la réduction de la synthèse d'Arf6 par siRNA, l'autophagie a été atténuée, que ce soit pour les cellules cultivées en normoxie ou en

hypoxie. L'autophagie induite dans nos conditions expérimentales, serait donc sous la régulation d'un des récepteurs aux NTs, le TrkC-T1, et ce via l'activation d'Arf6.

En dernier lieu, des marquages spécifiques de la signalisation autophagique et neurotrophique ont été réalisés sur des coupes de tumeurs issues de patients atteints de GBM ou de cavernome (tumeur cérébrale bénigne). Tout d'abord, le marquage punctiforme de la LC3 a montré la présence d'autophagosomes au niveau des patients atteints de GBM, ce qui confirme la capacité de ce type de cancer à induire le processus autophagique. Cependant, les patients atteints de cavernome avaient également des autophagosomes qui étaient ponctuellement plus nombreux que ceux observés au niveau des coupes de GBM. En effet, le cavernome correspond à une malformation de vaisseaux sanguins, réduisant le taux de nutriments disponibles pour les cellules, qui induisent alors l'autophagie. Ce type de tumeur est également hautement hypoxique, ce qui a été caractérisé par le marquage intense de la protéine BNIP3, un marqueur d'hypoxie cible de HIF-1 α . Celle-ci était également présente sur les prélèvements des patients atteints de GBM, avec un marquage de BNIP3 plus fort au niveau nucléaire. Cette localisation pourrait être liée à la forte agressivité de ce cancer. En effet, il a déjà été démontré qu'une fois dans le cytosol, BNIP3 induit la mort cellulaire, alors que dans les GBM, il reste séquestré dans le noyau, ceci rendant la tumeur plus résistante et agressive (Burton et al., 2006). Les marquages du TrkC et de NT-3 ont montré une expression beaucoup plus importante dans les GBM par rapport aux cavernomes. Cette forte expression est concordante avec les observations que nous avons obtenues *in vitro* et a déjà été rapportée sur des prélèvements issus de patients atteints de GBM (Lawn et al., 2015). Pour ces auteurs, cette signalisation serait importante pour le maintien des cellules initiatrices de tumeur.

Enfin, les ARN totaux ont été extraits à partir de tumeurs de patients atteints de GBM afin de quantifier par RT-PCR quantitative l'expression des transcrits de TrkC FL, TrkC-T1 et NT-3 (variants 1 et 2). Suite aux qPCR, nous avons comparé les Ct (Cycle threshold) obtenus au niveau de ces tumeurs, avec ceux déjà obtenus avec les lignées U87MG, M059K et M059J cultivées en normoxie ou en hypoxie. Nous avons remarqué une grande similitude d'expression de tous ces gènes entre les patients atteints de GBM et les cellules U87MG cultivées en hypoxie. De plus, le variant 1 de la NT-3 qui était absent uniquement dans la lignée U87MG, n'a pas été détecté au niveau des patients. Cela conforte l'utilisation de cette lignée comme modèle d'étude *in-vitro* des GBM.

Ainsi, nos travaux ont souligné l'induction d'une signalisation autophagique de survie dans des lignées de GBM humain en réponse à l'hypoxie. Cette autophagie était accompagnée d'une augmentation de l'expression de la signalisation du TrkC FL, qui conduit à l'activation d'une cible particulière, la p38. L'inhibition de cette MAPK induit un

clivage de la PARP dans les U87MG cultivées en hypoxie, qui est encore plus remarquable après inhibition de l'autophagie (traitement des cellules à la CQ). Ces données soulignent l'importance de la signalisation des neurotrophines dans le devenir des cellules tumorales de GBM. Cette voie pourrait alors représenter une cible thérapeutique, qu'il conviendrait d'inhiber en complément de l'autophagie. En effet, comme cela a déjà été évoqué, les thérapies actuelles visent à associer la CQ avec l'inhibition d'une autre cible. Nos travaux montrent que le couple TrkC/NT-3 pourrait être un bon candidat, complémentaire à l'autophagie, d'autant plus que les neurotrophines sont des facteurs de croissance particulièrement importants pour les cellules du système nerveux.

Conclusion et perspectives générales

Le travail effectué au cours de cette thèse est une contribution à la compréhension des mécanismes de résistance du GBM humain aux conditions environnementales défavorables telles que l'hypoxie, fréquemment rencontrée dans les tumeurs solides. Nos travaux ont montré une augmentation du processus autophagique en réponse à ce stress, contribuant ainsi à la survie cellulaire. Bien que son blocage diminue significativement la prolifération et l'activité métabolique des cellules, ceci n'était pas pour autant suffisant pour induire la mort cellulaire. Pour expliquer cette résistance, nous avons recherché l'implication de la signalisation des neurotrophines, facteurs de croissance du SNC, qui sont souvent dérégulés dans les gliomes (Hamel and Westphal, 2000). Nous avons démontré une augmentation de l'expression et de l'activation du récepteur à la NT-3, le TrkC FL, passant par la phosphorylation d'une cible particulière, p38 MAPK. Lorsque l'autophagie est inhibée, cette voie de signalisation est potentialisée, comme en atteste l'expression accrue du TrkC FL et de sa forme phosphorylée ainsi que celle de phospho-p38. Ceci suggère une compensation par les neurotrophines, favorisant la survie des cellules cancéreuses soumises à un stress hypoxique, en cas de défaillance de l'autophagie. Les données obtenues avec les prélèvements issus de patients atteints de GBM soutiennent l'importance du couple TrkC/NT-3 dans cette pathologie.

La collaboration bénéfique de ces deux voies pour la survie des cellules tumorales est également attestée par le fait que seule la double inhibition a induit une diminution de l'activité métabolique et un clivage de la PARP, principalement pour les cellules cultivées en hypoxie. Cette observation est le signe d'une mort apoptotique et nous conforte dans l'hypothèse que la voie des neurotrophines représente une cible potentielle pour la mise au point de nouveaux traitements contre le GBM. Cependant, tout au long de ce travail, en utilisant différents inhibiteurs pharmacologiques (CQ) ou d'expression (siRNA), nous avons également observé une diminution de l'activité métabolique accompagnée d'une perte cellulaire plus ou moins prononcée, sans clivage de la PARP. Cela suggère que les cellules engagent une voie de mort, indépendante des caspases. Cet aspect devra être approfondi notamment concernant la part de la mort AIF (Apoptotic-Inducing Factor) dépendante, nécrotique et/autophagique pour mieux comprendre l'impact des signalisations étudiées sur le devenir cellulaire.

Ce travail a également révélé une augmentation d'expression en hypoxie de la forme tronquée du TrkC ou TrkC-T1. Ce récepteur dépourvu de la partie intracellulaire à activité tyrosine kinase, est capable d'activer des petites protéines G telles que Arf6, et jouer un rôle important dans le remodelage membranaire. Bien que le taux de production d'Arf6 n'ait pas significativement varié en hypoxie, il semble être un facteur important pour le devenir cellulaire. En effet, son inhibition, qui a significativement diminué l'activité métabolique et la

croissance cellulaire, était corrélée à une diminution massive de l'autophagie. Cela suggère son importance dans ce processus de survie des cellules du GBM, bien que nous n'ayons pu établir un lien clair entre cette petite protéine G et le TrkC-T1. Pour cela, nous envisageons de rechercher son éventuelle localisation à la membrane en condition d'hypoxie. En effet, il a été montré que suite à son activation par le TrkC-T1, cette protéine se trouve relocalisée au niveau de la membrane plasmique et participe au changement de la morphologie cellulaire (Esteban et al., 2006). De plus, il faudrait étudier l'implication d'autres partenaires au TrkC-T1 tels que la protéine adaptatrice tamaline, et une autre petite protéine G, la Rac-GTPase. Dans cet objectif, nous allons transfecter des cellules de la lignée U87MG avec un vecteur d'expression favorisant la surproduction du TrkC-T1 et analyser les interactions qu'il peut réaliser avec d'autres acteurs. Cette approche nous permettra d'explorer le rôle du TrkC-T1 dans la biologie du GBM, et notamment dans le trafic des vésicules intracellulaires.

A moyen terme, notre équipe envisage d'étayer les hypothèses développées *in vitro* sur les lignées du GBM, sur des modèles *in vivo*, tels que des souris transgéniques pour des gènes d'intérêt. Ainsi, la greffe de cellules de GBM sera réalisée sur des animaux dont les gènes *BECN1* et/ou *ATG5*, ou encore *NTRK3*, auront été invalidés. Cet aspect, qui n'a pas pu être réalisé au cours de la thèse, validerait les observations faites sur les lignées cellulaires et sur les prélèvements de patients. L'association de ces altérations génétiques à des agents alkylants comme le Témzolomide serait également une approche intéressante pour modéliser la sensibilisation des cellules tumorales à la chimiothérapie.

Notre étude contribue à la compréhension de la biologie du GBM et des mécanismes de résistance que la tumeur développe face à un environnement hypoxique. Elle apporte des éléments sur la coopération des signalisations autophagique et neurotrophique dans la survie de cette tumeur et fournit de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement d'un cancer particulièrement agressif.

Bibliographie

Abeliovich, H., Dunn, W.A., Kim, J., and Klionsky, D.J. (2000). Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. *J. Cell Biol.* 151, 1025–1034.

Adam, M.F., Gabalski, E.C., Bloch, D.A., Oehlert, J.W., Brown, J.M., Elsaid, A.A., Pinto, H.A., and Terris, D.J. (1999). Tissue oxygen distribution in head and neck cancer patients. *Head Neck* 21, 146–153.

Adler, V., Schaffer, A., Kim, J., Dolan, L., and Ronai, Z. (1995). UV irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways. *J. Biol. Chem.* 270, 26071–26077.

Aita, V.M., Liang, X.H., Murty, V.V., Pincus, D.L., Yu, W., Cayanis, E., Kalachikov, S., Gilliam, T.C., and Levine, B. (1999). Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 59, 59–65.

Akil, H., Perraud, A., Mélin, C., Jauberteau, M.-O., and Mathonnet, M. (2011). Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. *PLoS One* 6, e25097.

Allalunis-Turner, M.J., Zia, P.K., Barron, G.M., Mirzayans, R., and Day, R.S. (1995). Radiation-induced DNA damage and repair in cells of a radiosensitive human malignant glioma cell line. *Radiat. Res.* 144, 288–293.

Alvarez-Erviti, L., Rodriguez-Oroz, M.C., Cooper, J.M., Caballero, C., Ferrer, I., Obeso, J.A., and Schapira, A.H.V. (2010). Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch. Neurol.* 67, 1464–1472.

Amberger-Murphy, V. (2009). Hypoxia helps glioma to fight therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* 9, 381–390.

Anderson, C.W., Dunn, J.J., Freimuth, P.I., Galloway, A.M., and Allalunis-Turner, M.J. (2001). Frameshift mutation in PRKDC, the gene for DNA-PKcs, in the DNA repair-defective, human, glioma-derived cell line M059J. *Radiat. Res.* 156, 2–9.

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

Armour, S.M., Baur, J.A., Hsieh, S.N., Land-Bracha, A., Thomas, S.M., and Sinclair, D.A. (2009). Inhibition of mammalian S6 kinase by resveratrol suppresses autophagy. *Aging* 1, 515–528.

Axe, E.L., Walker, S.A., Manfava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 182, 685–701.

Azad, M.B., and Gibson, S.B. (2010). Role of BNIP3 in proliferation and hypoxia-induced autophagy: implications for personalized cancer therapies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1210, 8–16.

Azad, M.B., Chen, Y., Henson, E.S., Cizeau, J., McMillan-Ward, E., Israels, S.J., and Gibson, S.B. (2008). Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy* 4, 195–204.

Baeza, N., Weller, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2003). PTEN methylation and expression in glioblastomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 106, 479–485.

Balbous, A., Cortes, U., Guilloteau, K., Villalva, C., Flamant, S., Gaillard, A., Milin, S., Wager, M., Sorel, N., Guilhot, J., et al. (2014). A mesenchymal glioma stem cell profile is related to clinical outcome. *Oncogenesis* 3, e91.

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

Basu, A. (1993). The potential of protein kinase C as a target for anticancer treatment. *Pharmacol. Ther.* 59, 257–280.

Basu, T., Warne, P.H., and Downward, J. (1994). Role of Shc in the activation of Ras in response to epidermal growth factor and nerve growth factor. *Oncogene* 9, 3483–3491.

Baudrimont, M. (1991). [Astrocytes: morphology and functional role]. *Ann. Médecine Interne* 142, 526–529.

Bellanger, C., Dubanet, L., Lise, M.-C., Fauchais, A.-L., Bordessoule, D., Jauberteau, M.-O., and Troutaud, D. (2011). Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PloS One* 6, e27213.

Beltaifa, S., Webster, M.J., Ligons, D.L., Fatula, R.J., Herman, M.M., Kleinman, J.E., and Weickert, C.S. (2005). Discordant changes in cortical TrkC mRNA and protein during the human lifespan. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2433–2444.

Bhui, K., Tyagi, S., Prakash, B., and Shukla, Y. (2010). Pineapple bromelain induces autophagy, facilitating apoptotic response in mammary carcinoma cells. *BioFactors Oxf. Engl.* 36, 474–482.

Bianchi, L., Tacchini, L., and Cairo, G. (1999). HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic Acids Res.* 27, 4223–4227.

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

Blommaert, E.F., Luiken, J.J., Blommaert, P.J., van Woerkom, G.M., and Meijer, A.J. (1995). Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 2320–2326.

Blommaert, A.G., Dhôtel, H., Ducos, B., Durieux, C., Goudreau, N., Bado, A., Garbay, C., and Roques, B.P. (1997). Structure-based design of new constrained cyclic agonists of the cholecystokinin CCK-B receptor. *J. Med. Chem.* 40, 647–658.

Borsello, T., Croquelois, K., Hornung, J.-P., and Clarke, P.G.H. (2003). N-methyl-d-aspartate-triggered neuronal death in organotypic hippocampal cultures is endocytic, autophagic and mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Eur. J. Neurosci.* 18, 473–485.

Bouzas-Rodriguez, J., Cabrera, J.R., Delloye-Bourgeois, C., Ichim, G., Delcros, J.-G., Raquin, M.-A., Rousseau, R., Combaret, V., Bénard, J., Tauszig-Delamasure, S., et al. (2010). Neurotrophin-3 production promotes human neuroblastoma cell survival by inhibiting TrkC-induced apoptosis. *J. Clin. Invest.* 120, 850–858.

Box, C., Rogers, S.J., Mendiola, M., and Eccles, S.A. (2010). Tumour-microenvironmental interactions: paths to progression and targets for treatment. *Semin. Cancer Biol.* 20, 128–138.

Boya, P., González-Polo, R.-A., Casares, N., Perfettini, J.-L., Dessen, P., Larochette, N., Métivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., et al. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1025–1040.

- Boyer, M.J., and Tannock, I.F. (1992). Regulation of intracellular pH in tumor cell lines: influence of microenvironmental conditions. *Cancer Res.* *52*, 4441–4447.
- Brahimi-Horn, C., Mazure, N., and Pouyssegur, J. (2005). Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell. Signal.* *17*, 1–9.
- Brantley, E.C., Nabors, L.B., Gillespie, G.Y., Choi, Y.-H., Palmer, C.A., Harrison, K., Roarty, K., and Benveniste, E.N. (2008). Loss of protein inhibitors of activated STAT-3 expression in glioblastoma multiforme tumors: implications for STAT-3 activation and gene expression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 4694–4704.
- Breckenridge, A.M., and Winstanley, P.A. (1997). Clinical pharmacology and malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* *91*, 727–733.
- Bresnahan, P.A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H.L., Brake, A.J., Barr, P.J., and Thomas, G. (1990). Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J. Cell Biol.* *111*, 2851–2859.
- Bröcker, E.B., Magiera, H., and Herlyn, M. (1991). Nerve growth and expression of receptors for nerve growth factor in tumors of melanocyte origin. *J. Invest. Dermatol.* *96*, 662–665.
- Brodeur, G.M., Minturn, J.E., Ho, R., Simpson, A.M., Iyer, R., Varela, C.R., Light, J.E., Kolla, V., and Evans, A.E. (2009). Trk Receptor Expression and Inhibition in Neuroblastomas. *Clin. Cancer Res.* *15*, 3244–3250.
- Brown, F.D., Rozelle, A.L., Yin, H.L., Balla, T., and Donaldson, J.G. (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J. Cell Biol.* *154*, 1007–1018.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* *96*, 857–868.
- Burger, P.C., Pearl, D.K., Aldape, K., Yates, A.J., Scheithauer, B.W., Passe, S.M., Jenkins, R.B., and James, C.D. (2001). Small cell architecture--a histological equivalent of EGFR amplification in glioblastoma multiforme? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *60*, 1099–1104.
- Burnett, P.E., Barrow, R.K., Cohen, N.A., Snyder, S.H., and Sabatini, D.M. (1998). RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 1432–1437.
- Bursch, W., Ellinger, A., Kienzl, H., Török, L., Pandey, S., Sikorska, M., Walker, R., and Hermann, R.S. (1996). Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* *17*, 1595–1607.
- Burton, T.R., Henson, E.S., Baijal, P., Eisenstat, D.D., and Gibson, S.B. (2006). The pro-cell death Bcl-2 family member, BNIP3, is localized to the nucleus of human glial cells: Implications for glioblastoma multiforme tumor cell survival under hypoxia. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *118*, 1660–1669.
- Cagnol, S., and Chambard, J.-C. (2010). ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J.* *277*, 2–21.
- Calza, L., Giardino, L., Giuliani, A., Aloe, L., and Levi-Montalcini, R. (2001). Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenic and vasoactive factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 4160–4165.
- Carrero, P., Okamoto, K., Coumailleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H., and Poellinger, L. (2000). Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 402–415.

- Cerniglia, G.J., Karar, J., Tyagi, S., Christofidou-Solomidou, M., Rengan, R., Koumenis, C., and Maity, A. (2012). Inhibition of autophagy as a strategy to augment radiosensitization by the dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. *Mol. Pharmacol.* *82*, 1230–1240.
- Chan, E.Y. (2009). mTORC1 phosphorylates the ULK1-mAtg13-FIP200 autophagy regulatory complex. *Sci. Signal.* *2*, pe51.
- Chao, M.V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 299–309.
- Chau, Y.-P., Lin, S.-Y., Chen, J.H.-C., and Tai, M.-H. (2003). Endostatin induces autophagic cell death in EAhy926 human endothelial cells. *Histol. Histopathol.* *18*, 715–726.
- Chen, A. (2013). Neuroprotective effect of brain-derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Mol. Med. Rep.*
- Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., and Maity, A. (2001). Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J. Biol. Chem.* *276*, 9519–9525.
- Chen, J., Zhao, S., Nakada, K., Kuge, Y., Tamaki, N., Okada, F., Wang, J., Shindo, M., Higashino, F., Takeda, K., et al. (2003). Dominant-Negative Hypoxia-Inducible Factor-1 α Reduces Tumorigenicity of Pancreatic Cancer Cells through the Suppression of Glucose Metabolism. *Am. J. Pathol.* *162*, 1283–1291.
- Chi, S., Kitanaka, C., Noguchi, K., Mochizuki, T., Nagashima, Y., Shirouzu, M., Fujita, H., Yoshida, M., Chen, W., Asai, A., et al. (1999). Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene* *18*, 2281–2290.
- Chiacchiera, F., and Simone, C. (2009). Inhibition of p38 α unveils an AMPK-FoxO3A axis linking autophagy to cancer-specific metabolism. *Autophagy* *5*, 1030–1033.
- Chin, L.S., Murray, S.F., Zitnay, K.M., and Rami, B. (1997). K252a inhibits proliferation of glioma cells by blocking platelet-derived growth factor signal transduction. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *3*, 771–776.
- Chinnadurai, G., Vijayalingam, S., and Gibson, S.B. (2008). BNIP3 subfamily BH3-only proteins - mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene* *27*, S114–S127.
- Choi, C.-H., Jung, Y.-K., and Oh, S.-H. (2010). Autophagy induction by capsaicin in malignant human breast cells is modulated by p38 and extracellular signal-regulated mitogen-activated protein kinases and retards cell death by suppressing endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Mol. Pharmacol.* *78*, 114–125.
- Choi, E.J., Cho, B.J., Lee, D.J., Hwang, Y.H., Chun, S.H., Kim, H.H., and Kim, I.A. (2014). Enhanced cytotoxic effect of radiation and temozolomide in malignant glioma cells: targeting PI3K-AKT-mTOR signaling, HSP90 and histone deacetylases. *BMC Cancer* *14*, 17.
- Clarke, P.G.H., and Puyal, J. (2012). Autophagic cell death exists. *Autophagy* *8*, 867–869.
- Clary, D.O., and Reichardt, L.F. (1994). An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 11133–11137.
- Codogno, P., and Meijer, A.J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.* *12 Suppl 2*, 1509–1518.
- Cohen, S., and Levi-Montalcini, R. (1956). A NERVE GROWTH-STIMULATING FACTOR ISOLATED FROM SNAKE VENOM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *42*, 571–574.

Colosetti, P., Puissant, A., Robert, G., Luciano, F., Jacquel, A., Gounon, P., Cassuto, J.-P., and Auberger, P. (2009). Autophagy is an important event for megakaryocytic differentiation of the chronic myelogenous leukemia K562 cell line. *Autophagy* 5, 1092–1098.

Com, E., Lagadec, C., Page, A., El Yazidi-Belkoura, I., Slomianny, C., Spencer, A., Hammache, D., Rudkin, B.B., and Hondermarck, H. (2007). Nerve growth factor receptor TrkA signaling in breast cancer cells involves Ku70 to prevent apoptosis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 6, 1842–1854.

Conrad, P.W., Freeman, T.L., Beitner-Johnson, D., and Millhorn, D.E. (1999). EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J. Biol. Chem.* 274, 33709–33713.

Coons, S.W., Johnson, P.C., Scheithauer, B.W., Yates, A.J., and Pearl, D.K. (1997). Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer* 79, 1381–1393.

Corcelle, E., Nebout, M., Bekri, S., Gauthier, N., Hofman, P., Poujeol, P., Fénichel, P., and Mograbi, B. (2006). Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *Cancer Res.* 66, 6861–6870.

Cormier-Regard, S., Nguyen, S.V., and Claycomb, W.C. (1998). Adrenomedullin Gene Expression Is Developmentally Regulated and Induced by Hypoxia in Rat Ventricular Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 17787–17792.

Corradetti, M.N., and Guan, K.-L. (2006). Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene* 25, 6347–6360.

Cragolini, A.B., Huang, Y., Gokina, P., and Friedman, W.J. (2009). Nerve growth factor attenuates proliferation of astrocytes via the p75 neurotrophin receptor. *Glia* 57, 1386–1392.

De la Cruz-Morcillo, M.A., García-Cano, J., Arias-González, L., García-Gil, E., Artacho-Cordón, F., Ríos-Arrabal, S., Valero, M.L., Cimas, F.J., Serrano-Oviedo, L., Villas, M.V., et al. (2013). Abrogation of the p38 MAPK α signaling pathway does not promote radioresistance but its activity is required for 5-Fluorouracil-associated radiosensitivity. *Cancer Lett.* 335, 66–74.

Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (2000). Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic Cph. Den.* 1, 570–583.

Cuervo, A.M., Knecht, E., Terlecky, S.R., and Dice, J.F. (1995). Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am. J. Physiol.* 269, C1200–C1208.

Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., and Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305, 1292–1295.

Cuevas, B.D., Lu, Y., Mao, M., Zhang, J., LaPushin, R., Siminovitch, K., and Mills, G.B. (2001). Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 27455–27461.

Cufí, S., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., Corominas-Faja, B., Cuyàs, E., López-Bonet, E., Martin-Castillo, B., Joven, J., and Menendez, J.A. (2013). The anti-malarial chloroquine overcomes Primary resistance and restores sensitivity to Trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *Sci. Rep.* 3.

Cui, Q., Tashiro, S.-I., Onodera, S., Minami, M., and Ikejima, T. (2007). Oridonin induced autophagy in human cervical carcinoma HeLa cells through Ras, JNK, and P38 regulation. *J. Pharmacol. Sci.* 105, 317–325.

Dall'Armi, C., Hurtado-Lorenzo, A., Tian, H., Morel, E., Nezu, A., Chan, R.B., Yu, W.H., Robinson, K.S., Yeku, O., Small, S.A., et al. (2010). The phospholipase D1 pathway modulates macroautophagy. *Nat. Commun.* 1, 142.

- Daumas-Duport, C., Scheithauer, B.W., and Kelly, P.J. (1987). A histologic and cytologic method for the spatial definition of gliomas. *Mayo Clin. Proc.* 62, 435–449.
- Davies, A.M., Horton, A., Burton, L.E., Schmelzer, C., Vandlen, R., and Rosenthal, A. (1993). Neurotrophin-4/5 is a mammalian-specific survival factor for distinct populations of sensory neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 13, 4961–4967.
- Dechant, G., and Barde, Y.A. (1997). Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 413–418.
- Von Deimling, A., von Ammon, K., Schoenfeld, D., Wiestler, O.D., Seizinger, B.R., and Louis, D.N. (1993). Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 3, 19–26.
- Déry, M.-A.C., Michaud, M.D., and Richard, D.E. (2005). Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 535–540.
- Descamps, S., Lebourhis, X., Delehedde, M., Boilly, B., and Hondermarck, H. (1998). Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 16659–16662.
- Descamps, S., Toillon, R.A., Adriaenssens, E., Pawlowski, V., Cool, S.M., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., Boilly, B., Peyrat, J.P., and Hondermarck, H. (2001). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 276, 17864–17870.
- Díaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M.E., Florencio, F.J., and Crespo, J.L. (2008). The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* 4, 851–865.
- Dice, J.F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 15, 305–309.
- Dice, J.F., and Terlecky, S.R. (1990). Targeting of cytosolic proteins to lysosomes for degradation. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 7, 211–233.
- DiStefano, P.S., Chelsea, D.M., Schick, C.M., and McKelvy, J.F. (1993). Involvement of a metalloprotease in low-affinity nerve growth factor receptor truncation: inhibition of truncation in vitro and in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 13, 2405–2414.
- Duan, W.-J., Li, Q.-S., Xia, M.-Y., Tashiro, S., Onodera, S., and Ikejima, T. (2011). Silibinin activated p53 and induced autophagic death in human fibrosarcoma HT1080 cells via reactive oxygen species-p38 and c-Jun N-terminal kinase pathways. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 47–53.
- Dunn, W.A. (1990). Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110, 1923–1933.
- Ebendal, T. (1992). Function and evolution in the NGF family and its receptors. *J. Neurosci. Res.* 32, 461–470.
- Eckhart, A.D., Yang, N., Xin, X., and Faber, J.E. (1997). Characterization of the α 1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 9487–9492.
- Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456–461.

- Eggert, A., Grotzer, M.A., Ikegaki, N., Liu, X.G., Evans, A.E., and Brodeur, G.M. (2000). Expression of neurotrophin receptor TrkA inhibits angiogenesis in neuroblastoma. *Med. Pediatr. Oncol.* 35, 569–572.
- Eide, F.F., Vining, E.R., Eide, B.L., Zang, K., Wang, X.Y., and Reichardt, L.F. (1996). Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 3123–3129.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.-U., and Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.* 16, 966–975.
- Ekstrand, A.J., James, C.D., Cavenee, W.K., Seliger, B., Pettersson, R.F., and Collins, V.P. (1991). Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res.* 51, 2164–2172.
- Ellington, A.A., Berhow, M.A., and Singletary, K.W. (2006). Inhibition of Akt signaling and enhanced ERK1/2 activity are involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 27, 298–306.
- El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Dollé, L., Descamps, S., and Hondermarck, H. (2003). Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein is involved in the neurotrophin receptor-mediated antiapoptotic activity of nerve growth factor in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 278, 16952–16956.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., and Lee, Y.L. (2000). Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000). *Neurochem. Res.* 25, 1439–1451.
- Esteban, P.F., Yoon, H.-Y., Becker, J., Dorsey, S.G., Caprari, P., Palko, M.E., Coppola, V., Saragovi, H.U., Randazzo, P.A., and Tessarollo, L. (2006). A kinase-deficient TrkC receptor isoform activates Arf6-Rac1 signaling through the scaffold protein tamalin. *J. Cell Biol.* 173, 291–299.
- Fader, C.M., Sánchez, D.G., Mestre, M.B., and Colombo, M.I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1901–1916.
- Farhadi, H.F., Mowla, S.J., Petrecca, K., Morris, S.J., Seidah, N.G., and Murphy, R.A. (2000). Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 4059–4068.
- Fauchais, A.-L., Lalloué, F., Lise, M.-C., Boumediene, A., Preud'homme, J.-L., Vidal, E., and Jauberteau, M.-O. (2008). Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 3027–3038.
- Feldser, D., Agani, F., Iyer, N.V., Pak, B., Ferreira, G., and Semenza, G.L. (1999). Reciprocal Positive Regulation of Hypoxia-inducible Factor 1 α and Insulin-like Growth Factor 2. *Cancer Res.* 59, 3915–3918.
- Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer* 2, 795–803.
- Figarella-Branger, D., and Bouvier, C. (2005). [Histological classification of human gliomas: state of art and controversies]. *Bull. Cancer (Paris)* 92, 301–309.
- Figarella-Branger, D., Colin, C., Coulibaly, B., Quilichini, B., Maues De Paula, A., Fernandez, C., and Bouvier, C. (2008). [Histological and molecular classification of gliomas]. *Rev. Neurol. (Paris)* 164, 505–515.

- Fleming, T.P., Saxena, A., Clark, W.C., Robertson, J.T., Oldfield, E.H., Aaronson, S.A., and Ali, I.U. (1992). Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res.* *52*, 4550–4553.
- Florez-McClure, M.L., Linseman, D.A., Chu, C.T., Barker, P.A., Bouchard, R.J., Le, S.S., Laessig, T.A., and Heidenreich, K.A. (2004). The p75 neurotrophin receptor can induce autophagy and death of cerebellar Purkinje neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 4498–4509.
- Forsyth, P.A., Krishna, N., Lawn, S., Valadez, J.G., Qu, X., Fenstermacher, D.A., Fournier, M., Potthast, L., Chinnaiyan, P., Gibney, G.T., et al. (2014). p75 neurotrophin receptor cleavage by α - and γ -secretases is required for neurotrophin-mediated proliferation of brain tumor-initiating cells. *J. Biol. Chem.* *289*, 8067–8085.
- Frank, S., Upender, S., Hansen, S.H., and Casanova, J.E. (1998). ARNO is a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6. *J. Biol. Chem.* *273*, 23–27.
- Frieboes, H.B., Huang, J.S., Yin, W.C., and McNally, L.R. (2014). Chloroquine-mediated cell death in metastatic pancreatic adenocarcinoma through inhibition of autophagy. *JOP J. Pancreas* *15*, 189–197.
- Fu, L., Cheng, Y., and Liu, B. (2013). Beclin-1: autophagic regulator and therapeutic target in cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 921–924.
- Fujisawa, H., Reis, R.M., Nakamura, M., Colella, S., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2000). Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *80*, 65–72.
- Fults, D., Pedone, C.A., Thompson, G.E., Uchiyama, C.M., Gumpfer, K.L., Iliev, D., Vinson, V.L., Tavtigian, S.V., and Perry, W.L. (1998). Microsatellite deletion mapping on chromosome 10q and mutation analysis of MMAC1, FAS, and MXI1 in human glioblastoma multiforme. *Int. J. Oncol.* *12*, 905–910.
- Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon, K.L., Louis, D.N., Brennan, C., et al. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* *21*, 2683–2710.
- Galavotti, S., Bartesaghi, S., Faccenda, D., Shaked-Rabi, M., Sanzone, S., McEvoy, A., Dinsdale, D., Condorelli, F., Brandner, S., Campanella, M., et al. (2013). The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. *Oncogene* *32*, 699–712.
- Gallego, O., Cuatrecasas, M., Benavides, M., Segura, P.P., Berrocal, A., Erill, N., Colomer, A., Quintana, M.J., Balaña, C., Gil, M., et al. (2014). Efficacy of erlotinib in patients with relapsed glioblastoma multiforme who expressed EGFRVIII and PTEN determined by immunohistochemistry. *J. Neurooncol.* *116*, 413–419.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., and Kreutzberg, G.W. (1995). Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *20*, 269–287.
- Ghosh, A., and Greenberg, M.E. (1995). Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* *15*, 89–103.
- Goldberg, M.A., Dunning, S.P., and Bunn, H.F. (1988). Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* *242*, 1412–1415.
- Gonzalez-Noriega, A., Grubb, J.H., Talkad, V., and Sly, W.S. (1980). Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *J. Cell Biol.* *85*, 839–852.

- González-Polo, R.-A., Boya, P., Pauleau, A.-L., Jalil, A., Larochette, N., Souquère, S., Eskelinen, E.-L., Pierron, G., Saftig, P., and Kroemer, G. (2005). The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J. Cell Sci.* *118*, 3091–3102.
- Götz, R., Köster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Schartl, M., and Thoenen, H. (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* *372*, 266–269.
- Graven, K.K., Yu, Q., Pan, D., Roncarati, J.S., and Farber, H.W. (1999). Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochim. Biophys. Acta* *1447*, 208–218.
- Griffin, C.A., Burger, P., Morsberger, L., Yonescu, R., Swierczynski, S., Weingart, J.D., and Murphy, K.M. (2006). Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *65*, 988–994.
- Grosfeld, A., André, J., Mouzon, S.H., Berra, E., Pouyssegur, J., and Guerre-Millo, M. (2002). Hypoxia-inducible Factor 1 Transactivates the Human Leptin Gene Promoter. *J. Biol. Chem.* *277*, 42953–42957.
- Gruber-Olipitz, M., Ströbel, T., Kang, S.U., John, J.P.P., Grotzer, M.A., Slavc, I., and Lubec, G. (2009). Neurotrophin 3/TrkC-regulated proteins in the human medulloblastoma cell line DAOY. *Electrophoresis* *30*, 540–549.
- Guertin, D.A., and Sabatini, D.M. (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* *12*, 9–22.
- Guidi, M., Muiños-Gimeno, M., Kagerbauer, B., Martí, E., Estivill, X., and Espinosa-Parrilla, Y. (2010). Overexpression of miR-128 specifically inhibits the truncated isoform of NTRK3 and upregulates BCL2 in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *BMC Mol. Biol.* *11*, 95.
- Gulati, P., and Thomas, G. (2007). Nutrient sensing in the mTOR/S6K1 signalling pathway. *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 236–238.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* *30*, 214–226.
- Hablützel, J., and Schweiz, K. (2009). Les tumeurs cérébrales et du système nerveux central: une information de la Ligue contre le cancer pour les personnes concernées et leurs proches (Ligue suisse contre le cancer).
- Hait, W.N., Jin, S., and Yang, J.-M. (2006). A matter of life or death (or both): understanding autophagy in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 1961–1965.
- Hallböök, F., Ibáñez, C.F., and Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* *6*, 845–858.
- Hamel, W., and Westphal, M. (2000). Growth factors in gliomas revisited. *Acta Neurochir. (Wien)* *142*, 113–137; discussion 137–138.
- Han, J., Hou, W., Goldstein, L.A., Stolz, D.B., Watkins, S.C., and Rabinowich, H. (2014a). A Complex between Atg7 and Caspase-9: A NOVEL MECHANISM OF CROSS-REGULATION BETWEEN AUTOPHAGY AND APOPTOSIS. *J. Biol. Chem.* *289*, 6485–6497.
- Han, M.W., Lee, J.C., Choi, J.-Y., Kim, G.C., Chang, H.W., Nam, H.Y., Kim, S.W., and Kim, S.Y. (2014b). Autophagy inhibition can overcome radioresistance in breast cancer cells through suppression of TAK1 activation. *Anticancer Res.* *34*, 1449–1455.

Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., and Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* *282*, 37298–37302.

Hansen, K., Wagner, B., Hamel, W., Schweizer, M., Haag, F., Westphal, M., and Lamszus, K. (2007). Autophagic cell death induced by TrkA receptor activation in human glioblastoma cells. *J. Neurochem.* *103*, 259–275.

Hara, T., and Mizushima, N. (2009). Role of ULK-FIP200 complex in mammalian autophagy: FIP200, a counterpart of yeast Atg17? *Autophagy* *5*, 85–87.

Harris, A.L. (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 38–47.

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

Hazzalin, C.A., and Mahadevan, L.C. (2002). MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 30–40.

He, P., Peng, Z., Luo, Y., Wang, L., Yu, P., Deng, W., An, Y., Shi, T., and Ma, D. (2009). High-throughput functional screening for autophagy-related genes and identification of TM9SF1 as an autophagosome-inducing gene. *Autophagy* *5*, 52–60.

Heinen, C., Garner, T.P., Long, J., Böttcher, C., Ralston, S.H., Cavey, J.R., Searle, M.S., Layfield, R., and Dantuma, N.P. (2010). Mutant p62/SQSTM1 UBA domains linked to Paget's disease of bone differ in their abilities to function as stabilization signals. *FEBS Lett.* *584*, 1585–1590.

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

Hewitson, K.S., McNeill, L.A., Riordan, M.V., Tian, Y.-M., Bullock, A.N., Welford, R.W., Elkins, J.M., Oldham, N.J., Bhattacharya, S., Gleadle, J.M., et al. (2002). Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J. Biol. Chem.* *277*, 26351–26355.

Hofer, T., Desbaillets, I., Höpfl, G., Gassmann, M., and Wenger, R.H. (2001). Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1 α activation cascade: implications for HIF-1 α gene therapy. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 2715–2717.

Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., and Barde, Y.A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* *344*, 339–341.

Hoppe, B.S., Jensen, R.B., and Kirchgessner, C.U. (2000). Complementation of the radiosensitive M059J cell line. *Radiat. Res.* *153*, 125–130.

Hosoi, G., Hara, J., Okamura, T., Osugi, Y., Ishihara, S., Fukuzawa, M., Okada, A., Okada, S., and Tawa, A. (1994). Low frequency of the p53 gene mutations in neuroblastoma. *Cancer* *73*, 3087–3093.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1981–1991.

Hu, J., Discher, D.J., Bishopric, N.H., and Webster, K.A. (1998). Hypoxia Regulates Expression of the Endothelin-1 Gene through a Proximal Hypoxia-Inducible Factor-1 Binding Site on the Antisense Strand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *245*, 894–899.

- Hu, Y.-L., DeLay, M., Jahangiri, A., Molinaro, A.M., Rose, S.D., Carbonell, W.S., and Aghi, M.K. (2012). Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. *Cancer Res.* *72*, 1773–1783.
- Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* *24*, 677–736.
- Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* *72*, 609–642.
- Huang, J., and Manning, B.D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 217–222.
- Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., and Bunn, H.F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J. Biol. Chem.* *271*, 32253–32259.
- Hur, E., Chang, K.Y., Lee, E., Lee, S.K., and Park, H. (2001). Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol. Pharmacol.* *59*, 1216–1224.
- Ichimura, K., Schmidt, E.E., Miyakawa, A., Goike, H.M., and Collins, V.P. (1998). Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes. Chromosomes Cancer* *22*, 9–15.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., et al. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* *408*, 488–492.
- Iliopoulos, O., Levy, A.P., Jiang, C., Kaelin, W.G., and Goldberg, M.A. (1996). Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 10595–10599.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.-L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* *4*, 648–657.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* *115*, 577–590.
- Ip, N.Y., Ibáñez, C.F., Nye, S.H., McClain, J., Jones, P.F., Gies, D.R., Belluscio, L., Le Beau, M.M., Espinosa, R., and Squinto, S.P. (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 3060–3064.
- Ishihara, N., Hamasaki, M., Yokota, S., Suzuki, K., Kamada, Y., Kihara, A., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2001). Autophagosome requires specific early Sec proteins for its formation and NSF/SNARE for vacuolar fusion. *Mol. Biol. Cell* *12*, 3690–3702.
- Jenkins, R.B., Blair, H., Ballman, K.V., Giannini, C., Arusell, R.M., Law, M., Flynn, H., Passe, S., Felten, S., Brown, P.D., et al. (2006). A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res.* *66*, 9852–9861.
- Jensen, P.B., Sørensen, B.S., Sehested, M., Grue, P., Demant, E.J., and Hansen, H.H. (1994). Targeting the cytotoxicity of topoisomerase II-directed epipodophyllotoxins to tumor cells in acidic environments. *Cancer Res.* *54*, 2959–2963.
- Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J., and Kim, K.W. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* *111*, 709–720.

- Jia, G., Cheng, G., Gangahar, D.M., and Agrawal, D.K. (2006). Insulin-like growth factor-1 and TNF- α regulate autophagy through c-jun N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells. *Immunol. Cell Biol.* *84*, 448–454.
- Jin, S., and White, E. (2007). Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy* *3*, 28–31.
- Jin, H., Pan, Y., Zhao, L., Zhai, H., Li, X., Sun, L., He, L., Chen, Y., Hong, L., Du, Y., et al. (2007). p75 Neurotrophin Receptor Suppresses the Proliferation of Human Gastric Cancer Cells. *Neoplasia* *9*, 471–478.
- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., and Chao, M. (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* *47*, 545–554.
- Johnston, A.L.M., Lun, X., Rahn, J.J., Liacini, A., Wang, L., Hamilton, M.G., Parney, I.F., Hempstead, B.L., Robbins, S.M., Forsyth, P.A., et al. (2007). The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. *PLoS Biol.* *5*, e212.
- Jones, K.R., and Reichardt, L.F. (1990). Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 8060–8064.
- Josset, E., Burckel, H., Noël, G., and Bischoff, P. (2013). The mTOR inhibitor RAD001 potentiates autophagic cell death induced by temozolomide in a glioblastoma cell line. *Anticancer Res.* *33*, 1845–1851.
- Juhasz, G., and Neufeld, T.P. (2006). Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source. *PLoS Biol.* *4*, e36.
- Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1992–2003.
- Jung, V., Romeike, B.F., Henn, W., Feiden, W., Moringlane, J.R., Zang, K.D., and Urbschat, S. (1999). Evidence of focal genetic microheterogeneity in glioblastoma multiforme by area-specific CGH on microdissected tumor cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *58*, 993–999.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* *19*, 5720–5728.
- Kallio, P.J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., and Poellinger, L. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 5667–5672.
- Kang, H.J., and Schuman, E.M. (1995). Neurotrophin-induced modulation of synaptic transmission in the adult hippocampus. *J. Physiol. Paris* *89*, 11–22.
- Kanzawa, T., Kondo, Y., Ito, H., Kondo, S., and Germano, I. (2003). Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res.* *63*, 2103–2108.
- Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V., and Parada, L.F. (1991). The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* *252*, 554–558.
- Karanasios, E., Stapleton, E., Manifava, M., Kaizuka, T., Mizushima, N., Walker, S.A., and Ktistakis, N.T. (2013). Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J. Cell Sci.* *126*, 5224–5238.

- Katsetos, C.D., Del Valle, L., Legido, A., de Chadarévian, J.-P., Perentes, E., and Mörk, S.J. (2003). On the neuronal/neuroblastic nature of medulloblastomas: a tribute to Pio del Rio Hortega and Moises Polak. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 105, 1–13.
- Kaur, B., Khwaja, F.W., Severson, E.A., Matheny, S.L., Brat, D.J., and Van Meir, E.G. (2005). Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-Oncol.* 7, 134–153.
- Kayali, A.G., Austin, D.A., and Webster, N.J. (2000). Stimulation of MAPK cascades by insulin and osmotic shock: lack of an involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 49, 1783–1793.
- Ke, Q., and Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.* 70, 1469–1480.
- Kermani, P., Rafii, D., Jin, D.K., Whitlock, P., Schaffer, W., Chiang, A., Vincent, L., Friedrich, M., Shido, K., Hackett, N.R., et al. (2005). Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB+ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J. Clin. Invest.* 115, 653–663.
- Kernohan, J.W., and Mabon, R.F. (1949). A simplified classification of the gliomas. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* 24, 71–75.
- Khwaja, F., Tabassum, A., Allen, J., and Djakiew, D. (2006). The p75(NTR) tumor suppressor induces cell cycle arrest facilitating caspase mediated apoptosis in prostate tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 1184–1192.
- Kietzmann, T., Roth, U., and Jungermann, K. (1999). Induction of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Expression by Mild Hypoxia Via a Hypoxia Response Element Binding the Hypoxia-Inducible Factor-1 in Rat Hepatocytes. *Blood* 94, 4177–4185.
- Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E., and Cuervo, A.M. (2004). Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol. Biol. Cell* 15, 4829–4840.
- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001a). Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep.* 2, 330–335.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2001b). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 152, 519–530.
- Kim, D.-H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002a). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163–175.
- Kim, J., Huang, W.-P., Stromhaug, P.E., and Klionsky, D.J. (2002b). Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *J. Biol. Chem.* 277, 763–773.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141.
- Kim, J.Y.H., Sutton, M.E., Lu, D.J., Cho, T.A., Goumnerova, L.C., Goritchenko, L., Kaufman, J.R., Lam, K.K., Billet, A.L., Tarbell, N.J., et al. (1999). Activation of Neurotrophin-3 Receptor TrkC Induces Apoptosis in Medulloblastomas. *Cancer Res.* 59, 711–719.
- Kim, P.K., Hailey, D.W., Mullen, R.T., and Lippincott-Schwartz, J. (2008). Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20567–20574.

Kim, Y.-H., Yoo, K.-C., Cui, Y.-H., Uddin, N., Lim, E.-J., Kim, M.-J., Nam, S.-Y., Kim, I.-G., Suh, Y., and Lee, S.-J. (2014). Radiation promotes malignant progression of glioma cells through HIF-1 α stabilization. *Cancer Lett.* 354, 132–141.

Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.* 151, 263–276.

Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I., and Dikic, I. (2009). A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol. Cell* 34, 259–269.

Kitanaka, C., Kato, K., Ijiri, R., Sakurada, K., Tomiyama, A., Noguchi, K., Nagashima, Y., Nakagawara, A., Momoi, T., Toyoda, Y., et al. (2002). Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 358–368.

Kitano, J., Kimura, K., Yamazaki, Y., Soda, T., Shigemoto, R., Nakajima, Y., and Nakanishi, S. (2002). Tamalin, a PDZ domain-containing protein, links a protein complex formation of group 1 metabotropic glutamate receptors and the guanine nucleotide exchange factor cytohesins. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 1280–1289.

Kitano, J., Yamazaki, Y., Kimura, K., Masukado, T., Nakajima, Y., and Nakanishi, S. (2003). Tamalin is a scaffold protein that interacts with multiple neuronal proteins in distinct modes of protein-protein association. *J. Biol. Chem.* 278, 14762–14768.

Klein, R., Parada, L.F., Coulier, F., and Barbacid, M. (1989). trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J.* 8, 3701–3709.

Klein, R., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., and Barbacid, M. (1991). The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65, 189–197.

Klionsky, D.J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 931–937.

Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., et al. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* 5, 539–545.

Koob, G.F. (2009). Dynamics of neuronal circuits in addiction: reward, antireward, and emotional memory. *Pharmacopsychiatry* 42 Suppl 1, S32–S41.

Krakstad, C., and Chekenya, M. (2010). Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol. Cancer* 9, 135.

Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P., et al. (2003). Regulation of Colon Carcinoma Cell Invasion by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cancer Res.* 63, 1138–1143.

Kroemer, G., and Jäätelä, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer* 5, 886–897.

Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 1004–1010.

Krygier, S., and Djakiew, D. (2002). Neurotrophin receptor p75(NTR) suppresses growth and nerve growth factor-mediated metastasis of human prostate cancer cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 98, 1–7.

- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032–1036.
- Kuner, P., and Hertel, C. (1998). NGF induces apoptosis in a human neuroblastoma cell line expressing the neurotrophin receptor p75NTR. *J. Neurosci. Res.* 54, 465–474.
- Kung, A.L., Wang, S., Klco, J.M., Kaelin, W.G., and Livingston, D.M. (2000). Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat. Med.* 6, 1335–1340.
- Kunz, J.B., Schwarz, H., and Mayer, A. (2004). Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *J. Biol. Chem.* 279, 9987–9996.
- Kuusisto, E., Kauppinen, T., and Alafuzoff, I. (2008). Use of p62/SQSTM1 antibodies for neuropathological diagnosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 34, 169–180.
- Lagadec, C., Meignan, S., Adriaenssens, E., Foveau, B., Vanhecke, E., Romon, R., Toillon, R.-A., Oxombre, B., Hondermarck, H., and Le Bourhis, X. (2009). TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* 28, 1960–1970.
- Lamballe, F., Klein, R., and Barbacid, M. (1991). trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66, 967–979.
- Lamballe, F., Tapley, P., and Barbacid, M. (1993). trkC encodes multiple neurotrophin-3 receptors with distinct biological properties and substrate specificities. *EMBO J.* 12, 3083–3094.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., and Bruick, R.K. (2002a). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 16, 1466–1471.
- Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., Gorman, J.J., and Whitelaw, M.L. (2002b). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295, 858–861.
- Lang, F.F., Miller, D.C., Koslow, M., and Newcomb, E.W. (1994). Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J. Neurosurg.* 81, 427–436.
- Lavoie, J.-F., Lesauteur, L., Kohn, J., Wong, J., Furtoss, O., Thiele, C.J., Miller, F.D., and Kaplan, D.R. (2005). TrkA induces apoptosis of neuroblastoma cells and does so via a p53-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 280, 29199–29207.
- Lawlor, M.A., and Alessi, D.R. (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J. Cell Sci.* 114, 2903–2910.
- Lawn, S., Krishna, N., Pisklakova, A., Qu, X., Fenstermacher, D.A., Fournier, M., Vrionis, F.D., Tran, N., Chan, J.A., Kenchappa, R.S., et al. (2015). Neurotrophin Signaling via TrkB and TrkC Receptors Promotes the Growth of Brain Tumor-initiating Cells. *J. Biol. Chem.* 290, 3814–3824.
- Lawrence, B.P., and Brown, W.J. (1993). Inhibition of protein synthesis separates autophagic sequestration from the delivery of lysosomal enzymes. *J. Cell Sci.* 105 (Pt 2), 473–480.
- LeCouter, J., Kowalski, J., Foster, J., Hass, P., Zhang, Z., Dillard-Telm, L., Frantz, G., Rangell, L., DeGuzman, L., Keller, G.-A., et al. (2001). Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412, 877–884.
- Lee, J.-A., Beigneux, A., Ahmad, S.T., Young, S.G., and Gao, F.-B. (2007a). ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr. Biol. CB* 17, 1561–1567.

- Lee, J.W., Park, S., Takahashi, Y., and Wang, H.-G. (2010). The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS One* 5, e15394.
- Lee, P.J., Jiang, B.-H., Chin, B.Y., Iyer, N.V., Alam, J., Semenza, G.L., and Choi, A.M.K. (1997). Hypoxia-inducible Factor-1 Mediates Transcriptional Activation of the Heme Oxygenase-1 Gene in Response to Hypoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 5375–5381.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945–1948.
- Lee, S.-B., Tong, S.-Y., Kim, J.-J., Um, S.-J., and Park, J.-S. (2007b). Caspase-independent autophagic cytotoxicity in etoposide-treated CaSki cervical carcinoma cells. *DNA Cell Biol.* 26, 713–720.
- Leibrock, C.S., Reuter, T., and Lamb, T.D. (1998). Molecular basis of dark adaptation in rod photoreceptors. *Eye Lond. Engl.* 12 (Pt 3b), 511–520.
- Lemasters, J.J. (2005). Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res.* 8, 3–5.
- Leung, S.Y., Chan, T.L., Chung, L.P., Chan, A.S., Fan, Y.W., Hung, K.N., Kwong, W.K., Ho, J.W., and Yuen, S.T. (1998). Microsatellite instability and mutation of DNA mismatch repair genes in gliomas. *Am. J. Pathol.* 153, 1181–1188.
- Levi-Montalcini, R., and Cohen, S. (1956). IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF A NERVE GROWTH-STIMULATING AGENT ISOLATED FROM SNAKE VENOM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 42, 695–699.
- Levine, B. (2005). Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 120, 159–162.
- Levine, B., and Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* 6, 463–477.
- Levine, B., and Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* 115, 2679–2688.
- Levy, A.P., Levy, N.S., Wegner, S., and Goldberg, M.A. (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 270, 13333–13340.
- Li, C., Capan, E., Zhao, Y., Zhao, J., Stolz, D., Watkins, S.C., Jin, S., and Lu, B. (2006). Autophagy is induced in CD4+ T cells and important for the growth factor-withdrawal cell death. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 5163–5168.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., et al. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943–1947.
- Li, S., Chou, A.P., Chen, W., Chen, R., Deng, Y., Phillips, H.S., Selfridge, J., Zurayk, M., Lou, J.J., Everson, R.G., et al. (2013). Overexpression of isocitrate dehydrogenase mutant proteins renders glioma cells more sensitive to radiation. *Neuro-Oncol.* 15, 57–68.
- Liang, C., Lee, J., Inn, K., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E.A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., et al. (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat. Cell Biol.* 10, 776–787.
- Liao, P.-C., Ng, L.-T., Lin, L.-T., Richardson, C.D., Wang, G.-H., and Lin, C.-C. (2010). Resveratrol arrests cell cycle and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells. *J. Med. Food* 13, 1415–1423.

- Lim, S.-C., Hahm, K.-S., Lee, S.-H., and Oh, S.-H. (2010). Autophagy involvement in cadmium resistance through induction of multidrug resistance-associated protein and counterbalance of endoplasmic reticulum stress WI38 lung epithelial fibroblast cells. *Toxicology* 276, 18–26.
- Lippai, M., and Lőw, P. (2014). The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *BioMed Res. Int.* 2014, 832704.
- Liu, B., Cheng, Y., Zhang, B., Bian, H., and Bao, J. (2009). Polygonatum cyrtoneura lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 pathway. *Cancer Lett.* 275, 54–60.
- Lok, C.N., and Ponka, P. (1999). Identification of a Hypoxia Response Element in the Transferrin Receptor Gene. *J. Biol. Chem.* 274, 24147–24152.
- Lomonaco, S.L., Finniss, S., Xiang, C., Decarvalho, A., Umansky, F., Kalkanis, S.N., Mikkelsen, T., and Brodie, C. (2009). The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 125, 717–722.
- Lorin, S., Codogno, P., and Djavaheri-Mergny, M. (2008). [Autophagy: a new concept in cancer research]. *Bull. Cancer (Paris)* 95, 43–50.
- Lotze, M.T., Maranchie, J., and Appleman, L. (2013). Inhibiting autophagy: a novel approach for the treatment of renal cell carcinoma. *Cancer J. Sudbury Mass* 19, 341–347.
- Louie, E., Chen, X.F., Coomes, A., Ji, K., Tsirka, S., and Chen, E.I. (2013). Neurotrophin-3 modulates breast cancer cells and the microenvironment to promote the growth of breast cancer brain metastasis. *Oncogene* 32, 4064–4077.
- Louis, D.N., Holland, E.C., and Cairncross, J.G. (2001). Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am. J. Pathol.* 159, 779–786.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 97–109.
- Luberg, K., Wong, J., Weickert, C.S., and Timmusk, T. (2010). Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J. Neurochem.* 113, 952–964.
- MacDonald, J.I., Gryz, E.A., Kubu, C.J., Verdi, J.M., and Meakin, S.O. (2000). Direct binding of the signaling adapter protein Grb2 to the activation loop tyrosines on the nerve growth factor receptor tyrosine kinase, TrkA. *J. Biol. Chem.* 275, 18225–18233.
- MacKenzie, D.J. (1926). A Classification of the Tumours of the Glioma Group on a Histogenetic Basis With a Correlated Study of Prognosis. *Can. Med. Assoc. J.* 16, 872.
- Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N.Y., Furth, M.E., Lindsay, R.M., and Yancopoulos, G.D. (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247, 1446–1451.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 741–752.
- Maiuri, M.C., Tascemir, E., Criollo, A., Morselli, E., Vicencio, J.M., Carnuccio, R., and Kroemer, G. (2009). Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ.* 16, 87–93.

Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., et al. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* 6, 458–471.

Marshall, M. (1995). Interactions between Ras and Raf: key regulatory proteins in cellular transformation. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 493–499.

Martin, D.N., and Baehrecke, E.H. (2004). Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Dev. Camb. Engl.* 131, 275–284.

Martínez, A., Alcántara, S., Borrell, V., Del Río, J.A., Blasi, J., Otal, R., Campos, N., Boronat, A., Barbacid, M., Silos-Santiago, I., et al. (1998). TrkB and TrkC signaling are required for maturation and synaptogenesis of hippocampal connections. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 7336–7350.

Martin-Zanca, D., Hughes, S.H., and Barbacid, M. (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 319, 743–748.

Marusyk, A., and Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1805, 105–117.

Masson, N., and Ratcliffe, P.J. (2003). HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels. *J. Cell Sci.* 116, 3041–3049.

Masson, N., Willam, C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.* 20, 5197–5206.

Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., et al. (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137, 1062–1075.

Mathupala, S.P., Rempel, A., and Pedersen, P.L. (2001). Glucose Catabolism in Cancer Cells IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A MARKED ACTIVATION RESPONSE OF THE TYPE II HEXOKINASE GENE TO HYPOXIC CONDITIONS. *J. Biol. Chem.* 276, 43407–43412.

Maxwell, P.H., Dachs, G.U., Gleadle, J.M., Nicholls, L.G., Harris, A.L., Stratford, I.J., Hankinson, O., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (1997). Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8104–8109.

McAllister, A.K., Katz, L.C., and Lo, D.C. (1997). Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. *Neuron* 18, 767–778.

McKay, M.M., and Morrison, D.K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26, 3113–3121.

Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L.S., Cox, G.W., and Varesio, L. (1995). A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J. Exp. Med.* 182, 1683–1693.

Menéndez-Benito, V., and Neefjes, J. (2007). Autophagy in MHC class II presentation: sampling from within. *Immunity* 26, 1–3.

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

Mercer, C.A., Kaliappan, A., and Dennis, P.B. (2009). A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* 5, 649–662.

- Middlemas, D.S., Kihl, B.K., Zhou, J., and Zhu, X. (1999). Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and chemoprotection of human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 16451–16460.
- Minchenko, A., Leshchinsky, I., Opentanova, I., Sang, N., Srinivas, V., Armstead, V., and Caro, J. (2002). Hypoxia-inducible Factor-1-mediated Expression of the 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) Gene ITS POSSIBLE ROLE IN THE WARBURG EFFECT. *J. Biol. Chem.* *277*, 6183–6187.
- Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M., Remacle, J., and Michiels, C. (2000). ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett.* *468*, 53–58.
- Mittler, M.A., Walters, B.C., and Stopa, E.G. (1996). Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. *J. Neurosurg.* *85*, 1091–1094.
- Miyakis, S., Liloglou, T., Kearney, S., Xinarianos, G., Spandidos, D.A., and Field, J.K. (2003). Absence of mutations in the VHL gene but frequent loss of heterozygosity at 3p25-26 in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer Amst. Neth.* *39*, 273–277.
- Mizushima, N. (2005). The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ.* *12 Suppl 2*, 1535–1541.
- Mizushima, N. (2006). [The role of autophagy in quality control inside neural cells]. *Rinshō Shinkeigaku Clin. Neurol.* *46*, 885–886.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev.* *21*, 2861–2873.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* *395*, 395–398.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* *152*, 657–668.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* *27*, 421–429.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* *116*, 1679–1688.
- Moreau, K., Ravikumar, B., Puri, C., and Rubinsztein, D.C. (2012). Arf6 promotes autophagosome formation via effects on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phospholipase D. *J. Cell Biol.* *196*, 483–496.
- Morrison, R.S., Yamaguchi, F., Bruner, J.M., Tang, M., McKeegan, W., and Berger, M.S. (1994). Fibroblast growth factor receptor gene expression and immunoreactivity are elevated in human glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* *54*, 2794–2799.
- Mowla, S.J., Pareek, S., Farhadi, H.F., Petrecca, K., Fawcett, J.P., Seidah, N.G., Morris, S.J., Sossin, W.S., and Murphy, R.A. (1999). Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 2069–2080.
- Munshi, A., Kakkar, S., Budrukkar, A., and Jalali, R. (2008). Unusual intensification of skin reactions by chloroquine use during breast radiotherapy. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* *47*, 318–319.
- Murphy, L.O., and Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 268–275.

- Nakagawara, A., Liu, X.G., Ikegaki, N., White, P.S., Yamashiro, D.J., Nycum, L.M., Biegel, J.A., and Brodeur, G.M. (1995). Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics* 25, 538–546.
- Nakamura, K., Martin, K.C., Jackson, J.K., Beppu, K., Woo, C.-W., and Thiele, C.J. (2006). Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 66, 4249–4255.
- Naves, T., Jawhari, S., Jauberteau, M.-O., Ratinaud, M.-H., and Verdier, M. (2013). Autophagy takes place in mutated p53 neuroblastoma cells in response to hypoxia mimetic CoCl₂. *Biochem. Pharmacol.* 85, 1153–1161.
- Nevrivy, D.J., Peterson, V.J., Avram, D., Ishmael, J.E., Hansen, S.G., Dowell, P., Hruby, D.E., Dawson, M.I., and Leid, M. (2000). Interaction of GRASP, a protein encoded by a novel retinoic acid-induced gene, with members of the cytohesin family of guanine nucleotide exchange factors. *J. Biol. Chem.* 275, 16827–16836.
- Newell, K., Franchi, A., Pouyssegur, J., and Tannock, I. (1993). Studies with glycolysis-deficient cells suggest that production of lactic acid is not the only cause of tumor acidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1127–1131.
- Nguyen, S.V., and Claycomb, W.C. (1999). Hypoxia Regulates the Expression of the Adrenomedullin and HIF-1 Genes in Cultured HL-1 Cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 382–386.
- Nguyen, T.K., Korsak, R.A., Takeda, K., Akira, S., and Sofroniew, M.V. (2008). STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 7231–7243.
- Nilsson, A.S., Fainzilber, M., Falck, P., and Ibáñez, C.F. (1998). Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett.* 424, 285–290.
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., and Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 9–22.
- Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009). IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 6002–6007.
- Noda, N.N., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2009a). ATG systems from the protein structural point of view. *Chem. Rev.* 109, 1587–1598.
- Noda, S., El-Jawahri, A., Patel, D., Lautenschlaeger, T., Siedow, M., and Chakravarti, A. (2009b). Molecular advances of brain tumors in radiation oncology. *Semin. Radiat. Oncol.* 19, 171–178.
- Noda, T., Kim, J., Huang, W.P., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y., and Klionsky, D.J. (2000). Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J. Cell Biol.* 148, 465–480.
- Nykjaer, A., Willnow, T.E., and Petersen, C.M. (2005). p75NTR--live or let die. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 49–57.
- Obermeier, A., Lammers, R., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1993). Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J. Biol. Chem.* 268, 22963–22966.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tani, I., Yoshinaga, K., et al. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* 26, 9220–9231.

- Ogier-Denis, E., Pattingre, S., El Benna, J., and Codogno, P. (2000). Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* 275, 39090–39095.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol.* 170, 1445–1453.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P.-L., Burkhard, C., Schüler, D., Probst-Hensch, N.M., Maiorka, P.C., et al. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 64, 6892–6899.
- Ohmichi, M., Decker, S.J., Pang, L., and Saltiel, A.R. (1991). Phospholipase C-gamma 1 directly associates with the p70 trk oncogene product through its src homology domains. *J. Biol. Chem.* 266, 14858–14861.
- Ojha, R., Jha, V., Singh, S.K., and Bhattacharyya, S. (2014). Autophagy inhibition suppresses the tumorigenic potential of cancer stem cell enriched side population in bladder cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 2073–2086.
- Okugawa, Y., Tanaka, K., Inoue, Y., Kawamura, M., Kawamoto, A., Hiro, J., Saigusa, S., Toiyama, Y., Ohi, M., Uchida, K., et al. (2013). Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B pathway in gastric cancer. *Br. J. Cancer* 108, 121–130.
- Ono, K., and Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell. Signal.* 12, 1–13.
- O'Rourke, J.F., Pugh, C.W., Bartlett, S.M., and Ratcliffe, P.J. (1996). Identification of hypoxically inducible mRNAs in HeLa cells using differential-display PCR. Role of hypoxia-inducible factor-1. *Eur. J. Biochem. FEBS* 241, 403–410.
- Ozpolat, B., Akar, U., Mehta, K., and Lopez-Berestein, G. (2007). PKC delta and tissue transglutaminase are novel inhibitors of autophagy in pancreatic cancer cells. *Autophagy* 3, 480–483.
- Palko, M.E., Coppola, V., and Tessarollo, L. (1999). Evidence for a role of truncated trkC receptor isoforms in mouse development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 775–782.
- Palumbo, S., Pirtoli, L., Tini, P., Cevenini, G., Calderaro, F., Toscano, M., Miracco, C., and Comincini, S. (2012). Different involvement of autophagy in human malignant glioma cell lines undergoing irradiation and temozolomide combined treatments. *J. Cell. Biochem.* 113, 2308–2318.
- Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.-H., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487–491.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 24131–24145.
- Papandreou, I., Powell, A., Lim, A.L., and Denko, N. (2005). Cellular reaction to hypoxia: sensing and responding to an adverse environment. *Mutat. Res.* 569, 87–100.
- Papatsoris, A.G., Liolitsa, D., and Deliveliotis, C. (2007). Manipulation of the nerve growth factor network in prostate cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* 16, 303–309.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G.L., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321, 1807–1812.

- Patani, N., Jiang, W.G., and Mokbel, K. (2011). Brain-derived neurotrophic factor expression predicts adverse pathological & clinical outcomes in human breast cancer. *Cancer Cell Int.* 11, 23.
- Patapoutian, A., and Reichardt, L.F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 272–280.
- Pearse, R.N., Swendeman, S.L., Li, Y., Rafii, D., and Hempstead, B.L. (2005). A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood* 105, 4429–4436.
- Peng, X.-H., Karna, P., Cao, Z., Jiang, B.-H., Zhou, M., and Yang, L. (2006). Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1alpha signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *J. Biol. Chem.* 281, 25903–25914.
- Polivka, J., Polivka, J., Rohan, V., Pesta, M., Repik, T., Pitule, P., and Topolcan, O. (2014). Isocitrate dehydrogenase-1 mutations as prognostic biomarker in glioblastoma multiforme patients in West Bohemia. *BioMed Res. Int.* 2014, 735659.
- Polson, H.E.J., de Lartigue, J., Rigden, D.J., Reedijk, M., Urbé, S., Clague, M.J., and Tooze, S.A. (2010). Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* 6, 506–522.
- Proikas-Cezanne, T., Waddell, S., Gaugel, A., Frickey, T., Lupas, A., and Nordheim, A. (2004). WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. *Oncogene* 23, 9314–9325.
- Qian, X., Riccio, A., Zhang, Y., and Ginty, D.D. (1998). Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons. *Neuron* 21, 1017–1029.
- Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z., and Donaldson, J.G. (1999). ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 6), 855–866.
- Ramón y Cajal, S. (1909). *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés* (Paris : Maloine).
- Randazzo, P.A., Nie, Z., Miura, K., and Hsu, V.W. (2000). Molecular aspects of the cellular activities of ADP-ribosylation factors. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2000, re1.
- Rasheed, B.K., McLendon, R.E., Friedman, H.S., Friedman, A.H., Fuchs, H.E., Bigner, D.D., and Bigner, S.H. (1995). Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 10, 2243–2246.
- Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z.M., Sutter, C.H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L.E., Madan, A., Semenza, G.L., and Bedi, A. (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev.* 14, 34–44.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., et al. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 90, 1383–1435.
- Razi, M., Chan, E.Y.W., and Tooze, S.A. (2009). Early endosomes and endosomal coatomer are required for autophagy. *J. Cell Biol.* 185, 305–321.
- Ren, H., Fu, K., Mu, C., Li, B., Wang, D., and Wang, G. (2010). DJ-1, a cancer and Parkinson's disease associated protein, regulates autophagy through JNK pathway in cancer cells. *Cancer Lett.* 297, 101–108.

- Richard, D.E., Berra, E., Gothié, E., Roux, D., and Pouyssegur, J. (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.* *274*, 32631–32637.
- Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O'Toole, E., Winey, M., and Goldfarb, D.S. (2003). Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *14*, 129–141.
- Rodriguez-Tébar, A., Dechant, G., and Barde, Y.A. (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* *4*, 487–492.
- Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M., and Wenger, R.H. (1997). Oxygen-regulated Transferrin Expression Is Mediated by Hypoxia-inducible Factor-1. *J. Biol. Chem.* *272*, 20055–20062.
- Rose, C.R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K.W., and Konnerth, A. (2003). Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* *426*, 74–78.
- Roux, P. (1999). [PTEN: a tumor suppressor with original properties]. *Bull. Cancer (Paris)* *86*, 522–525.
- Roux, P.P., and Barker, P.A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog. Neurobiol.* *67*, 203–233.
- Roux, P.P., Bhakar, A.L., Kennedy, T.E., and Barker, P.A. (2001). The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* *276*, 23097–23104.
- Rudge, J.S., Li, Y., Pasnikowski, E.M., Mattsson, K., Pan, L., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J., Lindsay, R.M., and Ip, N.Y. (1994). Neurotrophic factor receptors and their signal transduction capabilities in rat astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* *6*, 693–705.
- Ruggeri, P., R., A., Cappabianca, L., Di, N., Ragone, M., Merolle, S., Gulino, A., and R., A. (2013). Neurotrophin and Neurotrophin Receptor Involvement in Human Neuroblastoma. In *Neuroblastoma*, H. Shimada, ed. (InTech),.
- Ryan, H.E., Poloni, M., McNulty, W., Elson, D., Gassmann, M., Arbeit, J.M., and Johnson, R.S. (2000). Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res.* *60*, 4010–4015.
- Rydén, M., and Ibáñez, C.F. (1996). Binding of neurotrophin-3 to p75LNGFR, TrkA, and TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by trkC. *J. Biol. Chem.* *271*, 5623–5627.
- Sabers, C.J., Martin, M.M., Brunn, G.J., Williams, J.M., Dumont, F.J., Wiederrecht, G., and Abraham, R.T. (1995). Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *270*, 815–822.
- Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 623–635.
- Sakaki, K., Wu, J., and Kaufman, R.J. (2008). Protein kinase Ctheta is required for autophagy in response to stress in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *283*, 15370–15380.
- Sang, N., Fang, J., Srinivas, V., Leshchinsky, I., and Caro, J. (2002). Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 alpha is governed by a von Hippel-Lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 2984–2992.
- Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J., Ducray, F., El Hallani, S., Boisselier, B., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., et al. (2009). Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an

important prognostic biomarker in gliomas. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 4150–4154.

Sarkar, S., Floto, R.A., Berger, Z., Imarisio, S., Cordenier, A., Pasco, M., Cook, L.J., and Rubinsztein, D.C. (2005). Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J. Cell Biol.* 170, 1101–1111.

Scheid, A., Wenger, R.H., Schäffer, L., Camenisch, I., Distler, O., Ferenc, A., Cristina, H., Ryan, H.E., Johnson, R.S., Wagner, K.F., et al. (2002). Physiologically low oxygen concentrations determined in fetal skin regulate hypoxia-inducible factor 1 and transforming growth factor b3. *FASEB J.*

Scherer, H.J. (1940). A CRITICAL REVIEW: THE PATHOLOGY OF CEREBRAL GLIOMAS. *J. Neurol. Psychiatry* 3, 147–177.

Schiefermeier, N., Teis, D., and Huber, L.A. (2011). Endosomal signaling and cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 615–620.

Schmid, T., Zhou, J., and Brüne, B. (2004). HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* 8, 423–431.

Schofield, C.J., and Zhang, Z. (1999). Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 722–731.

Sclabas, G.M., Fujioka, S., Schmidt, C., Li, Z., Frederick, W.A.I., Yang, W., Yokoi, K., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Hess, K.R., et al. (2005). Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 440–449.

Scott, R.C., Schuldiner, O., and Neufeld, T.P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev. Cell* 7, 167–178.

Seglen, P.O., and Gordon, P.B. (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 1889–1892.

Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Chrétien, M., and Murphy, R.A. (1996). Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett.* 379, 247–250.

Sekulić, A., Hudson, C.C., Homme, J.L., Yin, P., Otterness, D.M., Karnitz, L.M., and Abraham, R.T. (2000). A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res.* 60, 3504–3513.

Semenza, G.L. (2004). Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer Cell* 5, 405–406.

Semenza, G.L. (2013). HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J. Clin. Invest.* 123, 3664–3671.

Semenza, G.L., Neufeldt, M.K., Chi, S.M., and Antonarakis, S.E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 5680–5684.

Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M., and Wang, G.L. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 269, 23757–23763.

Semenza, G.L., Jiang, B.-H., Leung, S.W., Passantino, R., Concordet, J.-P., Maire, P., and Giallongo, A. (1996). Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-inducible Factor 1. *J. Biol. Chem.* 271, 32529–32537.

- Shchors, K., and Evan, G. (2007). Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? *Cancer Res.* *67*, 7059–7061.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B., and Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* *6*, 1221–1228.
- Shintani, T., and Klionsky, D.J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* *306*, 990–995.
- Singer, H.S., Hansen, B., Martinie, D., and Karp, C.L. (1999). Mitogenesis in Glioblastoma Multiforme Cell Lines: A Role for NGF and its TrkA Receptors. *J. Neurooncol.* *45*, 1–8.
- Singh, A., Ye, M., Bucur, O., Zhu, S., Tanya Santos, M., Rabinovitz, I., Wei, W., Gao, D., Hahn, W.C., and Khosravi-Far, R. (2010). Protein phosphatase 2A reactivates FOXO3a through a dynamic interplay with 14-3-3 and AKT. *Mol. Biol. Cell* *21*, 1140–1152.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* *432*, 396–401.
- Sinkevicius, K.W., Kriegel, C., Bellaria, K.J., Lee, J., Lau, A.N., Leeman, K.T., Zhou, P., Beede, A.M., Fillmore, C.M., Caswell, D., et al. (2014). Neurotrophin receptor TrkB promotes lung adenocarcinoma metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 10299–10304.
- Skuli, N., Monferran, S., Delmas, C., Favre, G., Bonnet, J., Toulas, C., and Cohen-Jonathan Moyal, E. (2009). Alphasbeta3/alphavbeta5 integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Res.* *69*, 3308–3316.
- Smith, E.D., Prieto, G.A., Tong, L., Sears-Kraxberger, I., Rice, J.D., Steward, O., and Cotman, C.W. (2014). Rapamycin and Interleukin-1 β Impair Brain-Derived Neurotrophic Factor - Dependent Neuron Survival by Modulating Autophagy. *J. Biol. Chem.*
- Sodhi, A., Montaner, S., Patel, V., Zohar, M., Bais, C., Mesri, E.A., and Gutkind, J.S. (2000). The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res.* *60*, 4873–4880.
- Sodhi, A., Montaner, S., Miyazaki, H., and Gutkind, J.S. (2001). MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1alpha in rasV12 upregulation of VEGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *287*, 292–300.
- Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* *32*, 638–647.
- Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *119*, 7–35.
- Solomon, V.R., and Lee, H. (2009). Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur. J. Pharmacol.* *625*, 220–233.
- Sontheimer, H. (2008). A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *J. Neurochem.* *105*, 287–295.
- Sridharan, S., Jain, K., and Basu, A. (2011). Regulation of autophagy by kinases. *Cancers* *3*, 2630–2654.

- Srinivas, V., Zhang, L.P., Zhu, X.H., and Caro, J. (1999). Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *260*, 557–561.
- Stefanis, L., Larsen, K.E., Rideout, H.J., Sulzer, D., and Greene, L.A. (2001). Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 9549–9560.
- Steinman, R.M., Mellman, I.S., Muller, W.A., and Cohn, Z.A. (1983). Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell Biol.* *96*, 1–27.
- Stephens, R.M., Loeb, D.M., Copeland, T.D., Pawson, T., Greene, L.A., and Kaplan, D.R. (1994). Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* *12*, 691–705.
- Stoilov, P., Castren, E., and Stamm, S. (2002). Analysis of the Human TrkB Gene Genomic Organization Reveals Novel TrkB Isoforms, Unusual Gene Length, and Splicing Mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *290*, 1054–1065.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *352*, 987–996.
- Sturm, D., Bender, S., Jones, D.T.W., Lichter, P., Grill, J., Becher, O., Hawkins, C., Majewski, J., Jones, C., Costello, J.F., et al. (2014). Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 92–107.
- Sui, X., Kong, N., Wang, X., Fang, Y., Hu, X., Xu, Y., Chen, W., Wang, K., Li, D., Jin, W., et al. (2014). JNK confers 5-fluorouracil resistance in p53-deficient and mutant p53-expressing colon cancer cells by inducing survival autophagy. *Sci. Rep.* *4*, 4694.
- Suzuki, H., Tomida, A., and Tsuruo, T. (2001). Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene* *20*, 5779–5788.
- Tacconelli, A., Farina, A.R., Cappabianca, L., Gulino, A., and Mackay, A.R. (2005a). Alternative TrkAIII splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma. *Future Oncol. Lond. Engl.* *1*, 689–698.
- Tacconelli, A., Farina, A.R., Cappabianca, L., Gulino, A., and Mackay, A.R. (2005b). TrkAIII. A novel hypoxia-regulated alternative TrkA splice variant of potential physiological and pathological importance. *Cell Cycle Georget. Tex* *4*, 8–9.
- Takahashi, Y., Takahashi, S., Shiga, Y., Yoshimi, T., and Miura, T. (2000). Hypoxic Induction of Prolyl 4-Hydroxylase α (I) in Cultured Cells. *J. Biol. Chem.* *275*, 14139–14146.
- Takahashi, Y., Meyerkord, C.L., and Wang, H.-G. (2009). Bif-1/endophilin B1: a candidate for crescent driving force in autophagy. *Cell Death Differ.* *16*, 947–955.
- Talbot, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Harris, A.L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am. J. Pathol.* *157*, 411–421.
- Tanaka, H., Yamamoto, M., Hashimoto, N., Miyakoshi, M., Tamakawa, S., Yoshie, M., Tokusashi, Y., Yokoyama, K., Yaginuma, Y., and Ogawa, K. (2006). Hypoxia-independent overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha as an early change in mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* *66*, 11263–11270.
- Tatsuta, T., and Langer, T. (2008). Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J.* *27*, 306–314.

- Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., et al. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 5455–5463.
- Thoenen, H. (1991). The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* 14, 165–170.
- Thyagarajan, A., Jedinak, A., Nguyen, H., Terry, C., Baldrige, L.A., Jiang, J., and Sliva, D. (2010). Triterpenes from *Ganoderma Lucidum* induce autophagy in colon cancer through the inhibition of p38 mitogen-activated kinase (p38 MAPK). *Nutr. Cancer* 62, 630–640.
- Torrisani, J., and Buscail, L. (2002). [Molecular pathways of pancreatic carcinogenesis]. *Ann. Pathol.* 22, 349–355.
- Truzzi, F., Marconi, A., Lotti, R., Dallaglio, K., French, L.E., Hempstead, B.L., and Pincelli, C. (2008). Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J. Invest. Dermatol.* 128, 2031–2040.
- Tsoufas, P., Soppet, D., Escandon, E., Tessarollo, L., Mendoza-Ramirez, J.L., Rosenthal, A., Nikolics, K., and Parada, L.F. (1993). The rat trkC locus encodes multiple neurogenic receptors that exhibit differential response to neurotrophin-3 in PC12 cells. *Neuron* 10, 975–990.
- Tsuchihara, K., Fujii, S., and Esumi, H. (2009). Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. *Cancer Lett.* 278, 130–138.
- Tuttle, D.L., Lewin, A.S., and Dunn, W.A. (1993). Selective autophagy of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *Eur. J. Cell Biol.* 60, 283–290.
- Ueki, K., Ono, Y., Henson, J.W., Efrid, J.T., von Deimling, A., and Louis, D.N. (1996). CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res.* 56, 150–153.
- Urfer, R., Tsoufas, P., O’Connell, L., Shelton, D.L., Parada, L.F., and Presta, L.G. (1995). An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *EMBO J.* 14, 2795–2805.
- Valenzuela, D.M., Maisonpierre, P.C., Glass, D.J., Rojas, E., Nuñez, L., Kong, Y., Gies, D.R., Stitt, T.N., Ip, N.Y., and Yancopoulos, G.D. (1993). Alternative forms of rat TrkC with different functional capabilities. *Neuron* 10, 963–974.
- Vicario-Abejón, C., Cunningham, M.G., and McKay, R.D. (1995). Cerebellar precursors transplanted to the neonatal dentate gyrus express features characteristic of hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 6351–6363.
- Wadhwa, S., Nag, T.C., Jindal, A., Kushwaha, R., Mahapatra, A.K., and Sarkar, C. (2003). Expression of the neurotrophin receptors Trk A and Trk B in adult human astrocytoma and glioblastoma. *J. Biosci.* 28, 181–188.
- Wagner, E.F., and Nebreda, A.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat. Rev. Cancer* 9, 537–549.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., and Semenza, G.L. (1995). Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 550–556.
- Wang, J.-B., Dong, D.-F., Wang, M.-D., and Gao, K. (2014). IDH1 overexpression induced chemotherapy resistance and IDH1 mutation enhanced chemotherapy sensitivity in Glioma cells in vitro and in vivo. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 15, 427–432.

- Wang, S.-H., Shih, Y.-L., Lee, C.-C., Chen, W.-L., Lin, C.-J., Lin, Y.-S., Wu, K.-H., and Shih, C.-M. (2009). The role of endoplasmic reticulum in cadmium-induced mesangial cell apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* *181*, 45–51.
- Watanabe, K., Tachibana, O., Sata, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (1996). Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *6*, 217–223; discussion 23–24.
- Watanabe, T., Nobusawa, S., Lu, S., Huang, J., Mittelbronn, M., and Ohgaki, H. (2009). Mutational inactivation of the nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in glioblastomas is associated with multiple TP53 mutations. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *68*, 210–215.
- Webber, J.L., and Tooze, S.A. (2010a). New insights into the function of Atg9. *FEBS Lett.* *584*, 1319–1326.
- Webber, J.L., and Tooze, S.A. (2010b). Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J.* *29*, 27–40.
- Wei, M.-F., Chen, M.-W., Chen, K.-C., Lou, P.-J., Lin, S.Y.-F., Hung, S.-C., Hsiao, M., Yao, C.-J., and Shieh, M.-J. (2014). Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. *Autophagy* *10*, 1179–1192.
- Weis, J., Schönrock, L.M., Züchner, S.L., Lie, D.C., Sure, U., Schul, C., Stögbauer, F., Ringelstein, E.B., and Halfter, H. (1999). CNTF and its receptor subunits in human gliomas. *J. Neurooncol.* *44*, 243–253.
- Wen, P.Y., and Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* *359*, 492–507.
- White, E., and DiPaola, R.S. (2009). The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 5308–5316.
- Wiesener, M.S., Turley, H., Allen, W.E., Willam, C., Eckardt, K.U., Talks, K.L., Wood, S.M., Gatter, K.C., Harris, A.L., Pugh, C.W., et al. (1998). Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* *92*, 2260–2268.
- Wiesner, J., Ortmann, R., Jomaa, H., and Schlitzer, M. (2003). New antimalarial drugs. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *42*, 5274–5293.
- Wilson, C.M., Naves, T., Vincent, F., Melloni, B., Bonnaud, F., Lalloué, F., and Jauberteau, M.-O. (2014). Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J. Cell Sci.*
- Wilson, W.R., Hicks, K.O., Pullen, S.M., Ferry, D.M., Helsby, N.A., and Patterson, A.V. (2007). Bystander effects of bioreductive drugs: potential for exploiting pathological tumor hypoxia with dinitrobenzamide mustards. *Radiat. Res.* *167*, 625–636.
- Windisch, J.M., Auer, B., Marksteiner, R., Lang, M.E., and Schneider, R. (1995a). Specific neurotrophin binding to leucine-rich motif peptides of TrkA and TrkB. *FEBS Lett.* *374*, 125–129.
- Windisch, J.M., Marksteiner, R., and Schneider, R. (1995b). Nerve growth factor binding site on TrkA mapped to a single 24-amino acid leucine-rich motif. *J. Biol. Chem.* *270*, 28133–28138.
- Windisch, J.M., Marksteiner, R., Lang, M.E., Auer, B., and Schneider, R. (1995c). Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 bind to a single leucine-rich motif of TrkB. *Biochemistry (Mosc.)* *34*, 11256–11263.
- Wong, A.J., Ruppert, J.M., Bigner, S.H., Grzeschik, C.H., Humphrey, P.A., Bigner, D.S., and Vogelstein, B. (1992). Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 2965–2969.

- Wouters, B.G., and Brown, J.M. (1997). Cells at intermediate oxygen levels can be more important than the "hypoxic fraction" in determining tumor response to fractionated radiotherapy. *Radiat. Res.* *147*, 541–550.
- Wu, W.K.K., Sakamoto, K.M., Milani, M., Aldana-Masangkay, G., Fan, D., Wu, K., Lee, C.W., Cho, C.H., Yu, J., and Sung, J.J.Y. (2010). Macroautophagy modulates cellular response to proteasome inhibitors in cancer therapy. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* *13*, 87–92.
- Wykoff, C.C., Beasley, N.J.P., Watson, P.H., Turner, K.J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G.D., Turley, H., Talks, K.L., Maxwell, P.H., et al. (2000). Hypoxia-inducible Expression of Tumor-associated Carbonic Anhydrases. *Cancer Res.* *60*, 7075–7083.
- Xie, B.-S., Zhao, H.-C., Yao, S.-K., Zhuo, D.-X., Jin, B., Lv, D.-C., Wu, C.-L., Ma, D.-L., Gao, C., Shu, X.-M., et al. (2011). Autophagy inhibition enhances etoposide-induced cell death in human hepatoma G2 cells. *Int. J. Mol. Med.* *27*, 599–606.
- Xiong, J., Zhou, L., Yang, M., Lim, Y., Zhu, Y., Fu, D., Li, Z., Zhong, J., Xiao, Z., and Zhou, X.-F. (2013a). ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells in vitro. *Neuro-Oncol.* *15*, 990–1007.
- Xiong, J., Zhou, L., Lim, Y., Yang, M., Zhu, Y.-H., Li, Z.-W., Zhou, F.H., Xiao, Z.-C., and Zhou, X.-F. (2013b). Mature BDNF promotes the growth of glioma cells in vitro. *Oncol. Rep.* *30*, 2719–2724.
- Xu, P., Das, M., Reilly, J., and Davis, R.J. (2011). JNK regulates FoxO-dependent autophagy in neurons. *Genes Dev.* *25*, 310–322.
- Yacoubian, T.A., and Lo, D.C. (2000). Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. *Nat. Neurosci.* *3*, 342–349.
- Yamaguchi, F., Saya, H., Bruner, J.M., and Morrison, R.S. (1994). Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 484–488.
- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct. Funct.* *23*, 33–42.
- Yan, H., and Chao, M.V. (1991). Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *J. Biol. Chem.* *266*, 12099–12104.
- Yan, H., Bigner, D.D., Velculescu, V., and Parsons, D.W. (2009). Mutant metabolic enzymes are at the origin of gliomas. *Cancer Res.* *69*, 9157–9159.
- Yang, L.-Y., Wu, K.-H., Chiu, W.-T., Wang, S.-H., and Shih, C.-M. (2009). The cadmium-induced death of mesangial cells results in nephrotoxicity. *Autophagy* *5*, 571–572.
- Yasinska, I.M., and Sumbayev, V.V. (2003). S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* *549*, 105–109.
- Yeh, Y.-Y., Wrasman, K., and Herman, P.K. (2010). Autophosphorylation within the Atg1 activation loop is required for both kinase activity and the induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *185*, 871–882.
- Ben-Yosef, Y., Lahat, N., Shapiro, S., Bitterman, H., and Miller, A. (2002). Regulation of Endothelial Matrix Metalloproteinase-2 by Hypoxia/Reoxygenation. *Circ. Res.* *90*, 784–791.

- Younce, C.W., and Kolattukudy, P.E. (2010). MCP-1 causes cardiomyoblast death via autophagy resulting from ER stress caused by oxidative stress generated by inducing a novel zinc-finger protein, MCPIP. *Biochem. J.* *426*, 43–53.
- Yu, L., Lenardo, M.J., and Baehrecke, E.H. (2004). Autophagy and caspases: a new cell death program. *Cell Cycle Georget. Tex* *3*, 1124–1126.
- Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T., and Millhorn, D.E. (2003). Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α . *J. Biol. Chem.* *278*, 15911–15916.
- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J., and Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15077–15082.
- Zagórska, A., and Dulak, J. (2004). HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim. Pol.* *51*, 563–585.
- Zeng, X., and Kinsella, T.J. (2008). Mammalian target of rapamycin and S6 kinase 1 positively regulate 6-thioguanine-induced autophagy. *Cancer Res.* *68*, 2384–2390.
- Zhang, S., Guo, D., Luo, W., Zhang, Q., Zhang, Y., Li, C., Lu, Y., Cui, Z., and Qiu, X. (2010). TrkB is highly expressed in NSCLC and mediates BDNF-induced the activation of Pyk2 signaling and the invasion of A549 cells. *BMC Cancer* *10*, 43.
- Zhong, H., De Marzo, A.M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D.A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W.B., Semenza, G.L., and Simons, J.W. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* *59*, 5830–5835.
- Zhu, Z., Kleeff, J., Kayed, H., Wang, L., Korc, M., Büchler, M.W., and Friess, H. (2002). Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Mol. Carcinog.* *35*, 138–147.
- Zhuang, W., Li, B., Long, L., Chen, L., Huang, Q., and Liang, Z. (2011). Induction of autophagy promotes differentiation of glioma-initiating cells and their radiosensitivity. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *129*, 2720–2731.
- Zou, Y., Wang, Q., Li, B., Xie, B., and Wang, W. (2014a). Temozolomide induces autophagy via ATM-AMPK-ULK1 pathways in glioma. *Mol. Med. Rep.* *10*, 411–416.
- Zou, Y.-M., Hu, G.-Y., Zhao, X.-Q., Lu, T., Zhu, F., Yu, S.-Y., and Xiong, H. (2014b). Hypoxia-induced autophagy contributes to radioresistance via c-Jun-mediated Beclin1 expression in lung cancer cells. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban* *34*, 761–767.
- Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A.R., Ryan, H.E., Johnson, R.S., Jefferson, A.B., et al. (2000). Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* *14*, 391–396.
- Zupan, A.A., Osborne, P.A., Smith, C.E., Siegel, N.R., Leimgruber, R.M., and Johnson, E.M. (1989). Identification, purification, and characterization of truncated forms of the human nerve growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* *264*, 11714–11720.

Annexes

Annexe 1 : Publication 1

Autophagy takes place in mutated p53 neuroblastoma cells in response to hypoxia mimetic CoCl₂.

Thomas NAVES, Soha JAWHARI, Marie-Odile JAUBERTEAU, Marie-Hélène RATINAUD, Mireille VERDIER.

Biochemical Pharmacology 85, 1153-1161, 2013.

Annexe 2 : Publication 2

Hypoxia-induced autophagy and neurotrophin signaling promote survival in human glioblastoma.

Soha JAWHARI, Marie-Odile JAUBERTEAU, Marie-Hélène RATINAUD and Mireille VERDIER.

Soumis

Abstract

Glioblastoma multiform (GBM), a primary brain tumor that is the most common and the most aggressive. It's characterized by a high degree of hypoxia and a resistance to therapy because of its adaptation capacities including autophagy. This degradation process allows recycling of cellular components to produce precursors for anabolism and ATP. We have studied the hypoxia-induced autophagy in three human GBM cell lines, the U87MG, M059K and M059J. We have found a survival hypoxia-induced autophagy that was efficient in all cell lines. Indeed, we observed an accumulation of autophagosomes when we inhibited the autophagic flux with chloroquine (CQ). Treatment with CQ or interference of Beclin1 or Atg5 expression by specific siRNA in GBM cells significantly decreased their metabolic activity and growth. However, we did not detect PARP cleavage by western blotting. Thus, we verified the neurotrophic signaling as another survival pathway by which GBM cells resist to hypoxia. After hypoxia, the transcription level of TrkC FL (full length), TrkC-T1 (truncated TrkC) and the NT-3 (the TrkC ligand) significantly increases in the U87MG cell lines, as far as the translation level of TrkC FL and TrkC-T1. When we explored the TrkC FL signaling pathway, there was an increase in the phosphorylation level of p38. After inhibition of this MAPK, we observed PARP cleavage, which was particularly important in hypoxia conditions. This cleavage was further enhanced upon CQ treatment. The autophagy inhibition using either CQ, siBeclin1 or siAtg5, increases TrkC FL and T1 expression, suggesting that in the absence of autophagy, cells would adapt by increasing TrkC signaling.

Finally, we have verified for hypoxic (BNIP3) and autophagic (LC3) markers on tumor sections from patients with GBM. We confirmed the hypoxic character of GBM, and showed important autophagy activation, after autophagosomes quantification. In comparison with cavernoma (benign brain tumor), patients with GBM showed a significant increase in TrkC and NT-3 expression, highlighting the importance of neurotrophic signaling in GBM tumor cell survival.

Résumé

Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur cérébrale la plus fréquente et la plus agressive. Il s'agit d'une tumeur capable de survivre même dans des conditions d'oxygénation faible ou hypoxie. En effet, les cellules cancéreuses du GBM activent des voies de survie en réponse à cette privation de dioxygène, dont l'autophagie. Il s'agit d'un mécanisme catabolique conduisant à la dégradation des constituants cellulaires, générant ainsi des précurseurs pour l'anabolisme cellulaire ainsi que de l'ATP. Nous avons étudié l'activation de l'autophagie en réponse à l'hypoxie, dans trois lignées cellulaires de GBM humain, les U87MG, les M059K et les M059J. Une autophagie de survie est activée dans les trois lignées cellulaires, en réponse à l'hypoxie. L'inhibition du flux autophagique par la chloroquine (CQ), induit une accumulation des autophagosomes, soulignant ainsi l'efficacité du processus. L'inhibition de l'autophagie par la CQ ou par des siRNA spécifiques dirigés contre les transcrits de Beclin1 ou d'Atg5, entraîne une diminution significative de l'activité métabolique cellulaire, ainsi qu'un retard de prolifération. Toutefois, nous n'avons pas détecté de mort apoptotique dépendante des caspases. Nous avons donc étudié une deuxième voie de signalisation de survie cellulaire, la signalisation neurotrophique. Une augmentation significative des transcrits de TrkC FL et T1 (TrkC tronqué) ainsi que de leur ligand, la NT-3 a été observée dans les cellules U87MG cultivées en hypoxie. De même, le taux de production des protéines TrkC FL et T1 a significativement augmenté en hypoxie. L'augmentation de l'expression du TrkC FL était accompagnée par une augmentation de sa phosphorylation et de celle de la p38 MAPK. L'inhibition de cette dernière par siRNA induit un clivage de la PARP, qui est d'autant plus important suite à l'ajout de la CQ. Ces effets étaient plus marqués au niveau des cellules cultivées en hypoxie. L'inhibition de l'autophagie par la CQ, augmente l'expression de TrkC FL et la phosphorylation de la p38, ce qui suggère qu'en absence de l'autophagie, les cellules s'adapteraient en augmentant la signalisation du TrkC.

La recherche des zones hypoxiques et autophagiques sur des coupes de tumeurs issues de patients atteints de GBM, confirme le caractère hypoxique de cette tumeur, et montre une induction du processus autophagique. En comparaison avec le cavernome (tumeur cérébrale bénigne), les patients atteints de GBM montrent une augmentation significative de l'expression de TrkC et de NT-3, ce qui renforce l'importance de la signalisation neurotrophique dans la survie des cellules de GBM.