



Université de Limoges
École Doctorale Bio-Santé (ED 524)
Equipe d'accueil 3842

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Neuro-Oncologie

Présentée et soutenue par
Sandra Pinet

Le 16 septembre 2016

**Rôle du transfert des récepteurs des neurotrophines via les
exosomes dans l'agressivité du glioblastome et le contrôle du
microenvironnement**

Thèse dirigée par Pr Fabrice LALLOUÉ et Pr Serge BATTU

JURY :

Président du jury

M. Jean-Marc Muller, Professeur des Universités, R2CT, Université de Poitiers

Rapporteurs

Mme. Julie Gavard, Chargé de Recherche CNRS, HDR, Inserm U892, UMR 6299,
Université de Nantes

M. Jean-Philippe Hugnot, Maître de conférences, HDR, Institut de Neurosciences,
université de Montpellier 2

Examineurs

Mme. Barbara Bessette, Maître de conférences, EA3842, Université de Limoges

M. Serge Battu, Professeur des Universités, EA3842, Université de Limoges

M. Fabrice Lalloué, Professeur des Universités, EA3842, Université de Limoges

Membre invité

Mme Marie-Odile Jauberteau-Marchan, PU-PH, EA3842, Université de Limoges

A mes parents,

A Thomas

A Lou

Remerciements

Je tiens à exprimer en tout premier lieu ma reconnaissance aux membres du Jury :

Je remercie le Dr Julie Gavard (Université de Nantes) et le Dr Jean-Philippe Hugnot (Université de Montpellier 2) d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, et pour l'intérêt qu'ils y ont porté. Soyez assurés, Madame, Monsieur, de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude au Pr Jean-Marc Muller, (Université de Poitiers). Recevez, Monsieur le Professeur, toute mon estime et mes plus sincères remerciements.

Je tiens à remercier le Professeur Marie-Odile Jauberteau-Marchan de m'avoir accueillie au sein de son équipe « Homéostasie Cellulaire et Pathologies » et d'avoir cru en mon travail. Merci pour votre aide et votre soutien en ce qui concerne la suite de mon projet professionnel.

Je remercie également le Pr Serge BATTU et le Pr Fabrice LALLOUE, mes directeurs de thèse, de m'avoir encadrée et de m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans des conditions favorables.

Serge, merci tout d'abord pour ton écoute et ta franchise. J'ai essayé de prendre en compte toutes tes remarques et tes commentaires. Tu as su faire preuve, au cours de ces années, de beaucoup de pédagogie et je t'en suis reconnaissante. Cette thèse m'a beaucoup appris en terme d'autonomie dans le travail et de remise en question et j'estime que cela n'aurait pas été possible sans ton sens critique mais particulièrement juste. D'un point de vue moins professionnel, sache que tu m'as beaucoup apporté et que j'ai conscience de l'énergie et du temps passé sur la suite de mon projet professionnel.

Fabrice, je tiens tout d'abord à souligner la qualité de vos enseignements dans le domaine des neurosciences. Malgré une disponibilité quelque peu relative au cours de cette dernière année, j'ai apprécié votre gentillesse et votre bonne humeur. Je vous remercie pour les différents projets que vous m'avez permis de mener car ils m'ont énormément appris sur le travail en équipe, la transdisciplinarité et sur la richesse de notre travail. Merci pour ces moments de rigolade, j'en sais maintenant un peu plus sur la creuse et ses habitants.

Je remercie le Dr Barbara BESSETTE (Université de LIMOGES), d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse, et pour le regard bienveillant porté sur ce travail, tout au long de ces années. Merci pour ta générosité et ton amitié et je te souhaite de t'accomplir professionnellement et surtout personnellement.

Je remercie également le Conseil régional de la Haute-Vienne et la Ligue Nationale pour le cancer pour l'aide financière dont j'ai bénéficié pour effectuer cette thèse.

Je remercie les services de Radiothérapie, d'Oncologie et de Neurochirurgie du CHU de Limoges ainsi que les services de Radiothérapie et d'Oncologie du Centre Hospitalier de Brive-La-Gaillarde et toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Mireille et Marie-Hélène, merci d'avoir cru en moi dès le début, sans vous mon parcours aurait été bien plus compliqué...

Je remercie ensuite tous mes collègues de l'EA3842 qui ont contribué à la bonne entente de l'équipe et avec qui j'ai eu plaisir à travailler. Pour tous les « vieux » thésards, courage la fin est proche et pour tous les nouveaux, courage aussi la thèse est une épreuve difficile mais tellement enrichissante.

Une pensée spéciale à mes trois copines internes, Justine, Amel et Hélène, malgré toutes les contaminations, oublis ou simplement moments de galère, j'ai été heureuse de participer à votre découverte de la recherche fondamentale. En retour, vous avez réussi à me faire aimer le monde de la clinique. Que notre amitié perdure.

Je réalise quelle chance j'ai, d'avoir trouvé, bien plus que des collègues mais des amis durant ces quatre années. Maz, Héloïse, Amandine, Sofiane, Hussein, Julie, Nico et Niki merci d'être là. Pas besoin d'une grande déclaration, vous savez déjà ce que je pense de vous...

Dédicace à Thomas. C'est avec un profond respect et une grande admiration que je souligne tes qualités de chercheur, les exosomes n'ont qu'à bien se tenir ! Toi et ta famille représentez beaucoup pour moi, je suis heureuse de vous connaître !

Enfin comme toute épreuve importante dans la vie d'un Homme nécessite un soutien sans faille.

Je remercie tout d'abord mon beau-frère Julien et ma belle-sœur Camille pour leur présence ainsi que mes beaux parents Christophe et Isabelle pour leur intégration dans la famille Prinsaud.

Bien évidemment je remercie mes parents pour leur amour inconditionnel et leur dévouement. Maman sans toi rien n'aurait été possible.

Une dernière parole aux deux hommes de ma vie. Je vous aime.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Contexte du travail	13
Introduction.....	16
I.1. Les gliomes	16
I.1.1. Les cellules du système nerveux central (SNC).....	16
I.1.1.1 Les neurones.....	17
I.1.1.2 Les cellules gliales.....	17
I.1.2. Les gliomes	19
I.1.2.1 Historique de l'évolution de la classification des tumeurs cérébrales selon l'OMS	20
I.1.2.2 Classification actuelle des gliomes selon l'OMS	21
I.1.2.3 Classification de l'hôpital Saint-Anne	24
I.1.3. Incidence, épidémiologie	26
I.1.4. Gliomagenèse et anomalies génétiques	28
I.1.4.1 Gliomagenèse	28
I.1.4.2 Altérations génétiques	30
I.1.4.3 Signature moléculaires des glioblastomes	35
I.1.5. Principaux mécanismes physiopathologie des glioblastomes.....	38
I.1.5.1 Néo-angiogenèse tumorale	39
I.1.5.2 Invasion tumorale	39
I.1.6. Prise en charge thérapeutique des GBMs.....	40
I.1.6.1 Biopsie et résection chirurgicale.....	41
I.1.6.2 Radiothérapie et chimiothérapie.....	41
I.1.6.3 Thérapies ciblées	43
I.1.6.4 Mécanismes de résistance des GBM	45
I.2. Agressivité du GBM	47
I.2.1. Les cellules souches cancéreuses	47
I.2.1.1 Découverte des CSC.....	47
I.2.1.2 Propriétés et origine des CSC	48
I.2.1.3 Marqueurs des CSC	50
I.2.2. YKL-40 (CHI3L1).....	51
I.2.2.1 Découverte de YKL-40	51
I.2.2.2 Rôle de YKL-40 dans le GBM	53
I.2.3. Les exosomes	57
I.2.3.1 Découverte des exosomes.....	57
I.2.3.2 Biogenèse des exosomes	58
I.2.3.3 Composition des exosomes	66
I.2.3.4 Recapture des exosomes.....	70
I.2.3.5 Rôles des exosomes dans le processus tumoral	72
I.3. Les neurotrophines	80
I.1.1. Découverte des neurotrophines	80
I.1.2. Structures des neurotrophines	80
I.2. Les récepteurs aux neurotrophines	82
I.2.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase.....	82
I.2.2. Le récepteurs p75 ^{NTR}	93
I.2.3. La sortiline	100
I.3. Rôles physiologiques et pathologiques des NTs	104
I.3.1. Rôles des NTs dans le développement du système nerveux	104
I.3.2. Neurotrophines et glioblastome.....	105
Objectifs de la thèse	110
Matériels et méthodes	114

I.4. Culture cellulaire	114
I.4.1. Lignées cellulaires	114
I.3.3. Entretien des cultures	115
I.5. Extinction de gènes par shRNA	117
I.5.1. Amplification du plasmide porteur de la séquence d'intérêt	117
I.5.2. Transformation des cellules HEK293T	119
I.5.3. Infection lentivirale des cellules U87-MG	121
I.6. Analyse transcriptomique par qPCR	121
I.6.1. Extraction des ARNs totaux	121
I.6.2. Retrotranscription des ARNs	122
I.6.3. La PCR quantitative	122
I.7. Tri cellulaire par la technique de couplage flux/force de sédimentation (SdFFF)	122
I.7.1. Principe	122
I.7.2. Préparation des cellules et tri cellulaire	124
I.8. Purification des exosomes	124
I.8.1. Centrifugations différentielles	124
I.8.2. Fractionnement des exosomes sur gradient continu de sucrose	125
I.8.3. Collection de sérum de patients atteints de GBM	125
I.8.4. Test d'internalisation des exosomes	126
I.8.5. Microscopie électronique	127
I.9. Tests fonctionnels	127
I.9.1. Test d'invasion en chambre de Boyden	127
I.9.2. Test de prolifération	128
I.10. Analyse protéique	128
I.10.1. Western blot	128
I.10.2. Immunofluorescence indirecte	132
I.11. Modèle <i>in vivo</i>	133
I.11.1. Animaux	133
I.11.2. Xénogreffes	134
I.11.3. Traitement des souris aux exosomes	134
I.12. Etude immunohistochimique	134
Résultats	138
I.13. Le transfert de TrkB, via les exosomes de GBM, permet de moduler l'agressivité des cellules inactivées pour YKL-40	138
I.14. Implication des exosomes issus de cellules de glioblastome humain dans les mécanismes de radiorésistance	156
I.14.1. Introduction et problématique	156
I.14.2. Protocole expérimental	157
I.14.3. Résultats	159
I.15. Communication des cellules de GBM avec les cellules souches mésenchymateuses via le transfert d'exosomes.	167
I.15.1. Introduction et problématique	167
I.15.2. Protocole expérimental	168
I.15.3. Résultats	171
Discussion générale	180
I.16. Les exosomes sont des vecteurs d'agressivité tumorale	181
I.17. CHI3L1, un outil pour moduler l'agressivité tumorale	181
I.18. Changement du niveau d'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs selon le grade d'agressivité des cellules	182
I.19. Les récepteurs des neurotrophines peuvent-ils être transférés par les exosomes ?	183
I.20. Le transfert de TrkB dans les exosomes permet de propager l'agressivité tumoral à l'ensemble du microenvironnement	185

I.21. <i>In vivo</i>, les exosomes agissent directement sur la croissance et la progression tumorale	187
I.22. Etude du rôle des neurotrophines dans les mécanismes de radiorésistance	190
I.23. Les récepteurs aux neurotrophines et leurs ligands représentent des facteurs de radiorésistance.	192
I.24. Impact des exosomes de GBM sur le microenvironnement tumoral.	196
Conclusion	201
Références bibliographiques	205
Annexes	237

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique des différents types cellulaires du système nerveux central.	16
Figure 2 : Principales catégories histo-moléculaires des gliomes diffus de l'adulte.	24
Figure 3: Altérations génétiques impliquées dans la gliomagenèse pour les GBM primaires et secondaires.	29
Figure 4 : Principales voies de signalisation altérées dans le glioblastome.	32
Figure 5 : signature moléculaire des GBMs selon les classifications de Verhaak, Phillips et Brennan.	38
Figure 6: Modèles d'évolutions clonale et hiérarchique.	46
Figure 7 : Voies de signalisations activées par YKL-40 dans les cellules de glioblastome et endothéliales.	55
Figure 8: Formation des MVB.	59
Figure 9: Les complexes ESCRT et la formation d'un endosome multi-vésiculaire.	62
Figure 10 : Sécrétion exosomale et implication des Rab.	65
Figure 11 : Composition d'un exosome.	69
Figure 12: Mécanismes d'internalisation des exosomes.	72
Figure 13: Structure primaire des neurotrophines.	81
Figure 14 : Structure des différents récepteurs aux neurotrophines.	84
Figure 15 : Principales isoformes issues de l'épissage alternatif du transcrit du gène de TrkA (NTRK1).	86
Figure 16 : Principales isoformes issues de l'épissage alternatif du transcrit du gène de TrkB (NTRK2).	88
Figure 17 : Principales isoformes issues de l'épissage alternatif du transcrit du gène de TrkC (NTRK3).	89
Figure 18 : Voies de signalisation des Trk.	92
Figure 19 : Structure du récepteur des neurotrophines p75 ^{NTR} .	94
Figure 20 : Les différentes formes du récepteur p75 ^{NTR} .	95
Figure 21 : Voies de signalisation du récepteur p75 ^{NTR} .	98
Figure 22 : Les différents co-récepteurs de p75 ^{NTR} et les conséquences de leur activation selon leurs ligands.	103
Figure 23 : Carte du vecteur pLKO.1 utilisé pour l'extinction de gènes par shRNA.	118
Figure 24 : Principe de la transfection cellulaire par le réactif JetPEI	120
Figure 25 : Représentation de l'appareillage composant la machine de SdFFF.	123
Figure 26: Protocole expérimental 1.	158
Figure 27 : Validation du modèle cellulaire et de la sécrétion exosomale.	160
Figure 28 : Validation de l'internalisation des exosomes dans les cellules cibles.	161
Figure 29 : Etude de l'effet des exosomes U87-MG sur la prolifération et la clonogénicité de cellules U87-MG et U87 shRab27a après irradiation.	164
Figure 30 : Analyse de l'expression de l'EGFR, p75NTR, TrkB et la sortiline.	166
Figure 31 : Protocole expérimental 2.	170
Figure 32 : Analyse de l'internalisation des exosomes C6 sur les différentes fractions d'astrocytes sains.	172
Figure 33 : Photographies en microscopie à contraste de phase de BM-MSC traitées ou non aux exosomes.	173
Figure 34 : Modifications de l'expression de protéines liées à l'état souche et à la différenciation fibroblastique des BM-MSC.	175
Figure 35: Modification de l'expression des protéines EGFR, GFAP et Runx2.	177
Figure 36 : Modification de l'expression des protéines GFAP et αSMA.	178
Figure 37 : Effets des exosomes sur la survie, la prolifération et la migration des BM-MSC.	179

Table des tableaux

<i>Tableau 1 : Classification des gliomes selon l'OMS. (WHO, 2000)</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 2 : Composition du milieu défini</i>	<i>116</i>
<i>Tableau 3 : Liste des anticorps primaires utilisés en western blot.....</i>	<i>131</i>
<i>Tableau 4 : Liste des anticorps secondaires utilisés en western blot.....</i>	<i>132</i>
<i>Tableau 5 : Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence indirecte.</i>	<i>132</i>
<i>Tableau 6 : Liste des anticorps secondaires utilisés en western blot.....</i>	<i>133</i>

Liste des abréviations :

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

AKT: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog

ALDH1: Aldéhyde déshydrogénase 1

ATRX: Alpha Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked

BCAN: brevican core protein

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor

bFGF: basic Fibroblasts Growth Factor

BHE: barrière hémato-encéphalique

BTSC: Brain Tumor Stem Cells

CAF: Cancer Associated Fibroblasts

CDK: Cyclin-Dependent Kinase

CFU: Colony Forming Unit

CHI3L1: Chitinase 3 like protein 1

ChK1: Checkpoint kinase 1

CIMP: CpG-island methylator phenotype

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CREB: cAMP Response Element Binding

CSC: Cellules Souches Cancéreuses

CSM: Cellules Souches Mésenchymateuses

CXCR4: c-x-c chemokine receptor type 4

DAG: diacylglycérol

DLL3: delta-like 3

EFM: exosome free medium

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

ERK: extracellular signal-regulated kinase

ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport

FADD: Fas-associated death domain

FAIM: Fas Apoptosis Inhibitor Molecule

FAK: focal adhesion kinase

FDA: Food and Drug Administration

GBM: glioblastoma

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

GSC: Glioma Stem Cells

HBMEC: Human Brain Microvascular Endothelial Cell

HIF: Hypoxia Inductible Factor

HRS: Hepatocyte Receptor tyrosine kinase Substrate

HS: Heparan Sulfate

HSP: Heat Shock Protein

IDH: isocitrate déshydrogénase

ILV: vésicule intraluminale

IRAK: Interleukin-1 Receptor Associated Kinase

IRS1: Insulin Receptor Substrate 1

ITK: inhibiteur de tyrosine kinase

JNK: c-Jun-N-terminal Kinase

Kd: constante de dissociation

KO: knockout

LB: lymphocyte B

LBPA: acide lysobisphosphatidique

LCR: liquide céphalorachidien

Lingo-1: LRR and Ig-domain-containing Nogo receptor interacting protein1

LOH: Loss Of Heterozygosity

LPL: lipoprotéine lipase

LT: lymphocyte T

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MDM: murine double minute

MEC: matrice extracellulaire

MET: hepatocyte growth factor receptor

MGMT: Methyl Guanyl Methyl Transferase

miR: microARN

MMP: matrix metalloproteinase

mTOR: mammalian target of rapamycin

MV: corps multivésiculé

NADE: p75NTR associated cell death executor

NF1: neurofibromatose de type 1

NFκB: nuclear factor kappa B

NGF: Nerve Growth Factor

NK: natural killer

NRAGE: neurotrophin receptor homolog 2

NRIF: Nuclear Receptor Interacting Factor

NT: neurotrophine

NTR3: neurotensin receptor 3

OLIG2: oligodendrocyte transcription factor 2

PC1: proconvertase1

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

PDGFR: platelet-derived growth factor receptor

PDK1: phosphatidylinositol 3-dependent-kinase 1

PDLIM1: PDZ and LIM Domain 1

PIP2: phosphatidylinositol 4,5 biphosphate

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PLC: phospholipase C

PMEL: pigment cell-specific type I integrated membrane protein

PTEN: Phosphatase and TENSing homolog

p75 CTF: p75 cell death domain

p75 ECD: p75 extracellular domain

p75 ICD: p75 intracellular domain

RAP: receptor associated protein

RB: rétinoblastome

RE: reticulum endoplasmique

RIP2: receptor interacting protein 2

RISC: RNA-induces silencing complex

RTK: récepteur à domaine tyrosine kinase

SAP: sphingolipid activator protein

SCID: severe combined deficiency

SC-1: schwann-cell-factor-1

SdFFF: Sedimentation Field Flow Fractionation

shRNA: short hairpin RNA

α-SMA: alpha smooth muscle actin

SNARE: soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor

Sox2: SRY-box 2

STAM: signal transducing adaptator attachment

TEM: tetraspanin enriched microdomain

TERT: telomerase reverse transcriptase

TES: TrkB-EGFR-Sortiline

TGF: transforming growth factor

TLDA: taqman low density array

TLX: tailless

TMZ: temozolomide

TNF: tumor necrosis factor

TOP2A: topoisomerase II alpha

TP53: suppressor tumor P53

TSG101: tumor susceptibility gene 101

TRADD: TNFR-associated death domain

TRAF6: TNF receptor associated factor

TrkA: tropomyosine related kinase A

TrkB: tropomyosine related kinase B

TrkC: tropomyosine related kinase C

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

Vsp: vacuolar protein sorting

Contexte du travail

Les glioblastomes (GBM) sont des tumeurs astrocytaires au pronostic défavorable. L'échec des thérapies actuelles (chimio et radiothérapie) est notamment lié à la résistance de certaines cellules tumorales aux traitements, et au caractère infiltrant de ces tumeurs qui a pour conséquences des récidives locales importantes. Depuis quelques décennies, l'existence d'une sous-population de cellules possédant des propriétés proches des cellules souches normales, à savoir capacité d'auto-renouvellement, de prolifération quasi-illimitée et de régénération de la tumeur a été mise en évidence au sein des GBM. Ces cellules qualifiées de cellules souches cancéreuses (CSC), sont résistantes aux chimio et radiothérapies permettant ainsi la croissance de la masse tumorale. Il y a donc une nécessité à développer de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement les CSC. Cependant, les travaux actuels peinent à identifier des marqueurs des CSC dans le glioblastome. Dans ce contexte, l'identification de nouveaux biomarqueurs fiables des CSC constituent un prérequis indispensable au développement de thérapies ciblées contre ces cellules.

Parmi les nombreux candidats, notre équipe s'intéresse particulièrement aux neurotrophines ou NTs (NGF; BDNF, NT-3 et NT-4/5) et à leurs récepteurs (Trk-A, TrkB, TrkC et p75^{NTR}). Les NTs sont une famille de facteurs de croissance largement étudiés dans le système nerveux, et retrouvés surexprimés dans de nombreux cancers tels que le cancer du côlon, le cancer bronchique ou encore le GBM. Dans ce dernier, une étude récente souligne l'importance des récepteurs TrkB et TrkC dans la survie et la croissance des CSC (Lawn et al., 2015). La survie et le maintien du caractère souche de ces cellules dépend également du microenvironnement qui les entoure et conditionne leurs propriétés. Un contrôle permanent du microenvironnement par des facteurs diffusibles susceptibles d'influencer les cellules présentes dans le microenvironnement est donc indispensable. Cette communication entre la tumeur et les cellules environnantes peut se faire via des exosomes qui permettraient ainsi de transférer du matériel protéique spécifique de la tumeur aux autres cellules. Bien que différentes données de la littérature aient mis en évidence le rôle des exosomes dans la progression du GBM, les mécanismes moléculaires dépendants de ces nanovésicules associés à la résistance aux traitements restent

peu connus.

Ma thèse s'inscrit dans cette thématique et a pour objectif de déterminer l'implication des récepteurs des neurotrophines et de leur ligand dans le transfert du phénotype agressif des cellules souches cancéreuses afin de favoriser la résistance thérapeutique du glioblastome. Ces travaux ne se limitent pas à la caractérisation d'un nouveau mécanisme lié à la tumorigenèse mais décrivent également l'intérêt potentiel en tant que biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques des récepteurs aux neurotrophines.

Introduction

Introduction

I.1. Les gliomes

I.1.1. Les cellules du système nerveux central (SNC)

Le système nerveux central (SNC) est un tissu dense constitué par l'encéphale (cerveau, tronc cérébral et cervelet) et la moelle épinière qui est composé de 2 grands types cellulaires : les neurones et les cellules gliales (Figure 1).

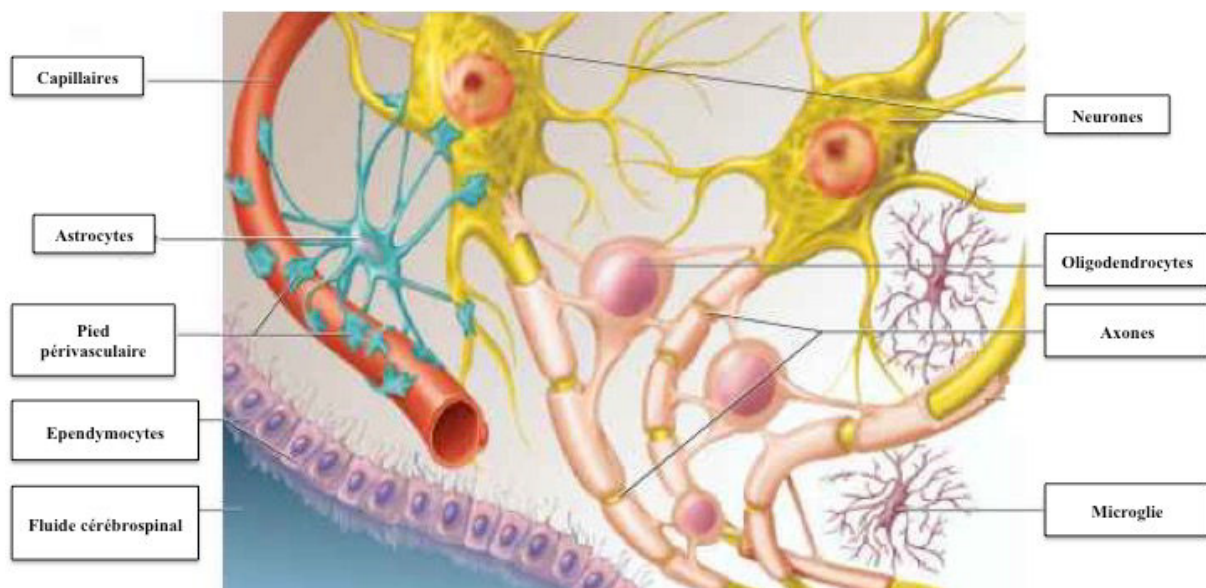


Figure 1 : Représentation schématique des différents types cellulaires du système nerveux central.

(Physiology Third Edition: The Unity of Companies, 2003 Form and Function). La glie est constituée de 2 grandes parties : la microglie et la macroglie. Les différents types cellulaires de la glie interagissent avec les neurones et les vaisseaux sanguins environnants. Les oligodendrocytes produisent la gaine de myéline afin d'accroître la vitesse de propagation de l'influx nerveux le long de l'axone. Les astrocytes entourent les vaisseaux sanguins et les synapses. La microglie protège le cerveau des dommages et infections.

I.1.1.1 Les neurones

Le neurone est considéré comme l'unité fonctionnelle du SNC. Les neurones sont des cellules spécialisées, tant au niveau anatomique que physiologique dans la réception, l'intégration et la transmission d'informations. En effet, ces cellules excitables produisent et transmettent le signal nerveux sous forme d'influx électrique (potentiel d'action).

I.1.1.2 Les cellules gliales

Les cellules gliales, qui constituent le tissu de soutien du système nerveux, sont plus petites que les neurones mais sont environ dix fois plus nombreuses. Les cellules gliales assurent plusieurs fonctions majeures en permettant la protection, le soutien et la nutrition des neurones, mais aussi la régulation de l'activité neuronale et la défense du système nerveux (Allen and Barres, 2009). Elles jouent un rôle majeur dans la mise en place de la barrière hémato-encéphalique qui constitue une barrière sélective protégeant le cerveau contre les agents infectieux et les toxines et permet également l'apport des nutriments essentiels au fonctionnement métabolique du système nerveux en particulier le glucose. Contrairement aux neurones, les cellules gliales peuvent se multiplier, proliférer. On distingue 4 types de cellules gliales : les astrocytes, les oligodendrocytes, la microglie, et les cellules épendymaires (Figure 1).

- Les astrocytes, cellules étoilées, constituent la majorité des cellules gliales. Véritables tissu de soutien, elles assurent le support mécanique et métabolique des réseaux neuronaux en apportant les nutriments (glucose et oxygène) et en évacuant leurs déchets métaboliques. Une classification morphologique permet de distinguer différents types d'astrocytes ; les astrocytes fibrillaires (ou fibreux) présentant de longs prolongements radiaires, sont riches en gliofilaments et sont localisés préférentiellement au niveau de la substance blanche. Les astrocytes protoplasmiques présentant des prolongements courts et contenant peu de gliofilaments, sont localisés préférentiellement au niveau de la substance grise. En plus, de ces deux morphologies principales, des sous-populations astrocytaires

spécifiques de certaines régions du SNC, comme le cervelet, peuvent adopter d'autres morphologies.

Une classification fonctionnelle permet de distinguer les astrocytes de type I et les astrocytes de type II.

Les astrocytes de type I jouent un rôle de barrière puisque l'extrémité de leurs prolongements appelée pied astrocytaire entoure soit les capillaires sanguins participant à la formation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et régule les échanges entre les capillaires sanguins et les neurones, soit les méninges (pie-mère) participant alors à la formation de la glia limitans (Montgomery, 1994; Sofroniew, 2015).

Les astrocytes de type II jouent un rôle métabolique et trophique puisque leurs pieds astrocytaires entourent les synapses délimitant hermétiquement la fente synaptique et permettant d'une part de garantir l'homéostasie du milieu neuronal et d'autre part de réguler l'intensité de la transmission synaptique par recapture des neurotransmetteurs. Ces astrocytes jouent aussi un rôle dans la cicatrisation (=gliose) en cas de lésions du tissu nerveux (Pekny and Pekna, 2014; Sarrazay et al., 2013; Sofroniew and Vinters, 2010).

- Les oligodendrocytes sont spécifiques du SNC. Leurs homologues dans le SNP (Système Nerveux Périphérique) sont les cellules de Schwann. Ces petites cellules gliales sont à l'origine de la formation de la gaine de myéline. Elles possèdent des prolongements qui entourent les axones de plusieurs neurones. Elles jouent à la fois un rôle de soutien et permettent de diminuer les pertes électriques et d'augmenter la vitesse de conduction de l'influx nerveux.

- Les épendymocytes tapissent les cavités ventriculaires de l'encéphale et le canal de l'épendyme. Ces cellules constituent une barrière sélective et jouent un rôle important dans les échanges entre le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le liquide interstitiel dans lequel baignent les cellules du SNC (Jiménez et al., 2014). Certaines cellules épendymaires spécialisées vont donner naissance à des cellules épithéliales qui formeront les plexus choroïdes. Ces structures vont permettre la production du liquide céphalo-rachidien au niveau du troisième et quatrième ventricule du SNC.

- Les cellules microgliales ou microglie représentent environ 5% de l'ensemble des cellules du système nerveux central. À la différence des autres cellules nerveuses qui dérivent du neuroectoderme, les cellules microgliales dérivent de cellules souches hématopoïétiques (origine mésodermique) et appartiennent au système immunitaire. La microglie constitue la population de macrophages résidents du système nerveux central. En fonction de leur état d'activation, la morphologie des cellules microgliales varie. En effet, au cours du développement cérébral, la microglie est activée et présente une morphologie améboïde de forme ovale avec de très courts prolongements cytoplasmiques et participe à l'élimination des débris cellulaires. Pendant, la maturation du système nerveux central, la microglie alors activée se différencie en microglie quiescente et adopte progressivement une morphologie ramifiée en mouvement constant permettant une immunosurveillance locale. En situation inflammatoire, les cellules microgliales sont activées et présentent une rétraction des ramifications et une hypertrophie du corps cellulaire. Les cellules ont alors une capacité de phagocytose augmentée, avec l'expression de molécules d'histocompatibilité de classe II et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Ginhoux et al., 2013).

Contrairement aux neurones, qui ont perdu leur capacité à se diviser (cellules post-mitotiques), l'évolution clonale d'une cellule gliale et/ou l'existence de cellules souches cancéreuses pourrait conduire à la formation d'une tumeur cérébrale ou gliome

I.1.2. Les gliomes

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes du système nerveux central. Ils correspondent à l'ensemble des tumeurs dont la cellule d'origine présumée est une cellule gliale. A ce jour, deux systèmes de classification existent ; la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en fonction du phénotype des cellules tumorales (astrocytomes, oligodendrogliomes et oligoastrocytomes) et du grade de malignité, du grade I au grade IV hautement malin (Louis et al., 2007) et la classification de l'hôpital St Anne intégrant les données cliniques et l'imagerie notamment exploration IRM.

I.1.2.1 Historique de l'évolution de la classification des tumeurs cérébrales selon l'OMS

La classification de l'OMS résulte d'un consensus et est considérée comme le standard international pour le typage histopathologique et le « grading » histopronostique des gliomes. Le premier modèle de classification des gliomes date de 1926 et est basé sur la morphologie histologique des cellules tumorales et sur la théorie des restes embryonnaires (Bailey and Cushing, 1926). Selon ces auteurs, les gliomes seraient issus de cellules embryonnaires arrêtées à différents stades de l'embryogenèse. A la suite de cette étude, en 1949, Kernohan et al. (Kernohan and Mabon, 1949) propose que les gliomes se développent à partir de cellules adultes spécialisées qui sont capables de se dédifférencier. La notion de classification en grade (grading) en fonction de la malignité des lésions apparaît en 1979. L'OMS définit la première classification officielle basée essentiellement sur la localisation tumorale, l'histo-morphologie et le grade de la tumeur (Zülch, 1979). Cette classification évolue en 1993 par l'introduction de l'immunohistochimie dans le diagnostic pathologique (Kleihues et al., 1993), puis en 2000 par l'ajout du profil génétique et épigénétique des tumeurs tel que la méthylation du promoteur du gène *MGMT* (Méthyl Guanyl Méthyl Transférase) pour les glioblastomes ou la détection de pertes de régions chromosomiques 1p et/ou 19q pour les tumeurs oligodendrogiales (Kleihues and Sobin, 2000; Kleihues et al., 2002). L'édition 2007, incorpore des données de biologie moléculaire et de cytogénétique en complément de l'histologie (Louis et al., 2007). La nouvelle classification histo-moléculaire apparaît en 2014 et complète la précédente en ajoutant notamment le statut d'expression du gène *ATRX* (Alpha Thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) dans les tumeurs cérébrales (Louis et al., 2014; Vigneswaran et al., 2015). L'évolution de cette classification au cours du temps a permis d'améliorer la classification des gliomes.

I.1.2.2 Classification actuelle des gliomes selon l'OMS

Les gliomes sont classés en fonction de leur morphologie/composition. Trois sous-types de gliomes sont ainsi distingués :

- les astrocytomes qui partagent les caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques des astrocytes notamment caractérisés par un marquage GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) positif
- les oligodendrogliomes qui partagent les caractéristiques des oligodendrocytes
- les oligo-astrocytomes qui sont considérés comme des tumeurs mixtes et partagent les caractéristiques des deux types cellulaires ; astrocytes et oligodendrocytes.

Le grade des gliomes est défini selon la présence de certains critères d'anaplasie à savoir une augmentation de la densité cellulaire, des atypies nucléaires, de l'index mitotique, de la néo-angiogenèse tumorale et la présence de zone de nécrose (Louis, 2006).

Les astrocytomes sont divisés en 4 grades de malignité distinctes: astrocytomes pilocytiques (grade I), astrocytomes diffus (grade II), astrocytomes anaplasiques (grade III) et glioblastomes multiformes (grade IV) (Tableau 1).

Concernant les deux autres sous-types de gliomes (oligodendrogliomes et oligo-astrocytomes), ils sont classés en grade II et grade III (ou anaplasiques) (Tableau 1).

	Différenciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Mitose	Nécrose	Prolifération microvasculaire
Astrocytomes: • Grade II: Astrocytomes Diffus • Grade III: Astrocytomes Anaplasiques • Grade IV: Glioblastomes	Bien différencié	Modérément augmentée	Occasionnelles	Absentes	Absentes	Absentes
	Plages d'anaplasies focales ou diffuses	Augmentée	Présentes	Présentes	Absentes	Absentes
	Faible	Elevée	Marquées	Nombreuses	Présentes	Présentes
Oligodendrogliomes: • Grade II: • Grade III:	Bien différencié	Modérée	Possiblement marquées	Absentes ou occasionnelles	Absente	Non proéminente
	Anaplasie focales ou diffuses	Eventuellement augmentée	Eventuellement marquées	Souvent nombreuses	Possible	Possible
Oligoastrocytomes: • Grade II: • Grade III:	Bien différencié	Modérée	?	Absentes ou rares	Absente	Absente
	Anaplasie des contingents astro- et / ou oligo-	Eventuellement forte	Eventuellement présentes	Eventuellement nombreuses	Possible	Possible

Tableau 1 : Classification des gliomes selon l'OMS. (WHO, 2000)

Les critères diagnostiques issus de cette classification entraînent un manque de reproductibilité inter-observateur (Coons et al., 1997) lié à l'existence de différents facteurs; l'hétérogénéité tumorale ainsi que l'absence de marqueurs spécifiques de lignage afin de reconnaître le type précis des cellules tumorales, la difficulté à distinguer les cellules tumorales du parenchyme résiduel sain et le fait que le prélèvement ne puisse pas toujours être représentatif de la tumeur. De plus, elle ne prend pas en considération des données de la clinique et de l'imagerie (Figarella-Branger et al., 2012).

En 2016, l'intégration de paramètres phénotypiques et génotypiques a permis d'ajouter un niveau d'objectivité supplémentaire dans la classification des tumeurs du SNC (Louis et al., 2016).

Plusieurs changements majeurs ont été apportés par cette nouvelle classification (Figure 2):

- ✓ Contrairement à la classification de l'OMS 2007 qui classait les gliomes selon le type cellulaire prédominant (astrocytaire, oligodendrogial et mixte), la nouvelle classification oppose distinctement les gliomes diffus des autres. Ainsi, on distingue trois grandes catégories: les gliomes infiltrants diffus de type astrocytaire ou oligodendrogial, les autres gliomes astrocytaires (astrocytome pilocytique ...) et les autres gliomes (gliome chordoïde du

troisième ventricule, gliome angiocentrique et astroblastome).

- ✓ Les gliomes infiltrants de l'adulte sont classés selon deux altérations moléculaires : les mutations d'IDH1/2 (Isocitrate Déshydrogénase 1/2) et la codélétion 1p/19q.
- ✓ La notion de NOS « Not Otherwise Specified » a été introduite. Il s'avère que pour ces groupes de tumeurs, les informations sont insuffisantes pour permettre un diagnostic plus précis. C'est sur ce point que la classification tend à être améliorée.
- ✓ Le groupe des gliomes mixtes type oligoastrocytome, tend à disparaître et si cette terminologie est utilisée, ce le sera uniquement avec NOS. Des travaux récents (Sahm et al., 2014) montrent que les gliomes mixtes présentaient soit un profil de type astrocytaire (IDH muté et 1p/19q non-codélété) ou de type oligodendrogial (IDH muté et 1p/19p codélété). Si le profil moléculaire est discordant ou si ces altérations n'ont pas été recherchées, il s'agira d'un gliome mixte NOS.
- ✓ Une nouvelle entité apparaît : le gliome diffus de la ligne médiane qui présente une mutation gain-de-fonction du gène codant pour l'histone H3 (H3K27M) et un nouveau variant pour les glioblastomes IDH non-muté : le glioblastome épithélioïde
- ✓ Il est introduit la notion de glioblastome moléculaire qui correspond à tout gliome IDH non muté qui présente un gain du chromosome 7 et une perte du chromosome 10.

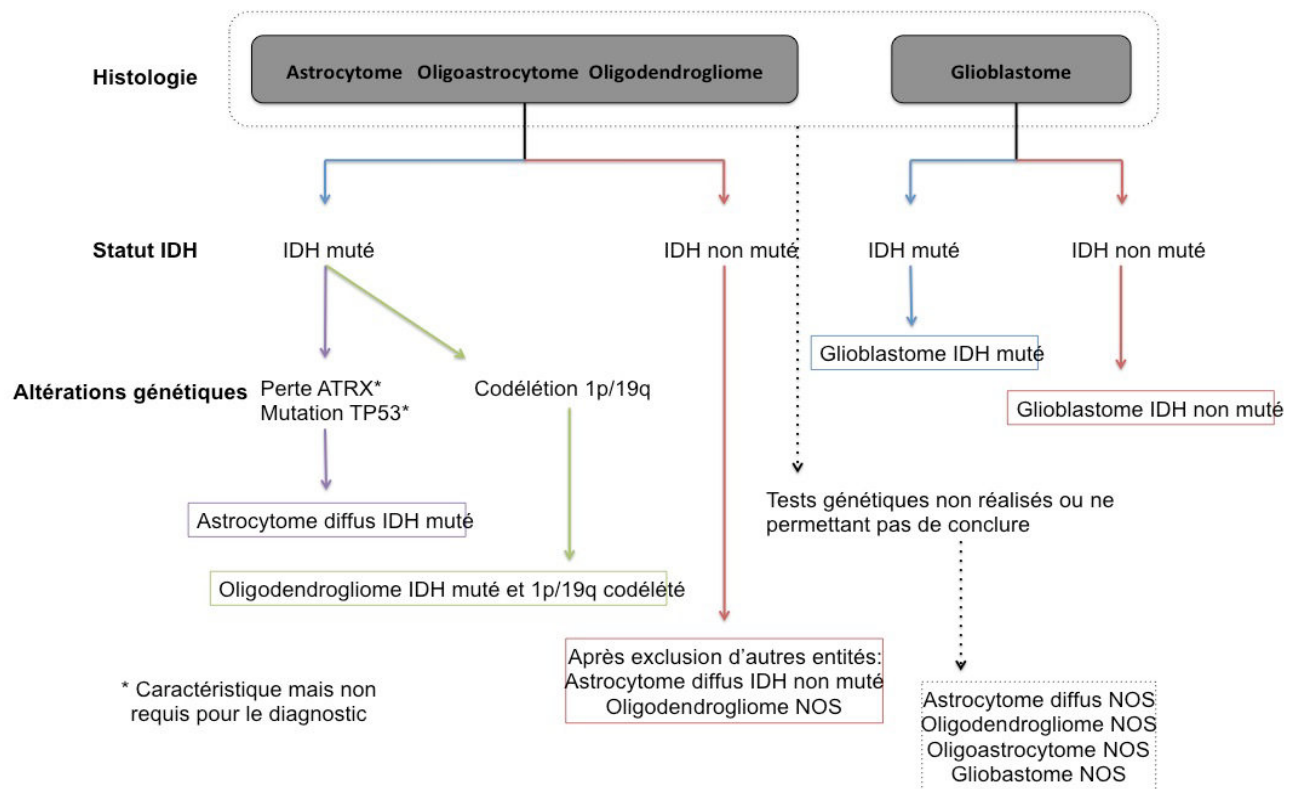


Figure 2 : Principales catégories histo-moléculaires des gliomes diffus de l'adulte.

D'après (Louis et al., 2016). La nouvelle classification histo-moléculaire 2016 devrait conduire à une plus grande précision diagnostique en permettant une amélioration de la gestion des patients et des déterminations plus précises de pronostic et de réponse au traitement.

I.1.2.3 Classification de l'hôpital Saint-Anne

Le second système de classification repose sur la classification de l'hôpital Saint-Anne proposée par le Pr Daumas-Duport (Daumas-Duport et al., 1997a). Cette classification tente de pallier le manque de reproductibilité puisqu'elle intègre les données cliniques et l'imagerie aux données histologiques augmentant ainsi la pertinence de l'évaluation pronostique. De plus, elle aboutit à l'établissement d'un nouveau système de « grading » fondé sur l'existence ou non d'une microangiogenèse. La structure spatiale des gliomes qui peut être infiltrante pure, solide pure ou mixte et leur mode de croissance peuvent alors être établies grâce à la corrélation de ces différentes données (Daumas-Duport et al., 1997a, 1997b).

Quant à l'analyse des images IRM (Imagerie par Résonnance Magnétique), elle permet de voir les signes de nécrose et de néo-vascularisation caractéristiques des gliomes de haut grade (Daumas-Duport et al., 2000).

Deux types de structures histologiques ont pu être mis en évidence au sein des gliomes : une structure tumorale solide et une structure infiltrante à cellules tumorales isolées :

- La structure tumorale solide formée uniquement de cellules tumorales avec peu ou pas de parenchyme résiduel s'accompagne d'une micro-angiogenèse qui se caractérise par une prise de contraste à l'imagerie (IRM).
- La structure à cellules tumorales isolées est représentée par la présence d'un parenchyme sous-jacent morphologiquement intact et sans microangiogenèse. Cette composante ne prend donc pas le contraste.

La microangiogenèse, élément principal de ce système de classification est représentée par l'association de deux critères qualitatifs ; la présence d'hyperplasie endothéliale au niveau microscopique et la présence d'une prise de contraste au niveau macroscopique. Le « grading » distingue alors, parmi les gliomes infiltrants (Daumas-Duport et al., 2005);

- les oligodendrogliomes et oligo-astrocytomes de grade A se caractérisent par l'absence d'hyperplasie endothéliale et de prise de contraste en IRM. Ces tumeurs sont associées à une survie médiane de 11 ans.
- les oligo-astrocytomes de grade B se caractérisent par la présence d'une hyperplasie endothéliale et/ou une prise de contraste en IRM. Ces tumeurs sont associées à une survie médiane de 3,5 ans.
- les glioblastomes peuvent être représentés par une structure mixte associant structure tumorale solide et des cellules tumorales isolées. Ces tumeurs sont associées à une survie moyenne de 12 mois (ISREC 2014).

Les problèmes liés à la non représentativité de l'échantillon au sein d'une tumeur hétérogène peuvent donc être palliés grâce à la prise en compte de ces données d'imagerie.

Cependant, l'existence de deux classifications des gliomes montre les limites de l'analyse histologique. En effet, le manque de critères morphologiques reproductibles ainsi que l'absence de biomarqueurs spécifiques rendent difficile la distinction entre des oligodendrocytes inclus et des oligodendrocytes tumoraux de même qu'entre des astrocytes tumoraux et des astrocytes réactifs (changements fonctionnels au sein des astrocytes en réponse à une situation pathologique).

L'analyse des tumeurs tend à identifier les différentes altérations génétiques et épigénétiques dans le but de mieux comprendre les processus moléculaires impliqués dans l'invasion et l'angiogenèse, considérées comme les deux principales caractéristiques d'agressivité du GBM.

I.1.3. Incidence, épidémiologie

Les tumeurs du système nerveux central se divisent deux catégories :

- les tumeurs secondaires ou métastases résultent de la migration d'une cellule tumorale issue d'un cancer primitif (poumon, sein, peau, rein) vers un autre organe. Les métastases cérébrales représentent 20 à 40% des cancers et leur épidémiologie reste liée en grande partie aux tumeurs primitives.
- les tumeurs primitives constituent toutes les tumeurs bénignes ou malignes ayant pour origine un des constituants du SNC, de ses enveloppes (méninges) ou des nerfs périphériques.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur les tumeurs primitives du système nerveux central (TPSNC) les plus fréquentes à savoir le glioblastome (GBM), tumeurs astrocytaires de grade IV qui représentent environ 70% des tumeurs du SNC (Brandes et al., 2008).

Les TPSNC sont un groupe hétérogène comprenant plus de 140 types et sous types histologiques (CBTRUS, 2005; ENCR, 1998). Les TPSNC représentent 2 à 3 % de l'ensemble des cancers. Les gliomes sont les tumeurs primaires du SNC les plus fréquentes chez l'adulte (70%).

Au sein des GBMs, deux principaux types génétiques sont individualisés correspondant à deux identités évolutives; les glioblastomes primaires et les glioblastomes secondaires (Ohgaki, 2005).

- les GBM primaires ou *de novo* représentent plus de 90% des GBM et se développent chez des sujets âgés de plus de 60 ans. L'histoire clinique est courte (< 3 mois) et sans symptômes prédictifs. L'origine cellulaire de ces tumeurs serait la transformation maligne d'une cellule souche neurale.
- Les GBM secondaires représentent 10% des GBM et résultent de la transformation anaplasique d'un gliome infiltrant de grade II ou III chez des patients plus jeunes (< 60 ans). Ces tumeurs présentent une histoire clinique plus longue et sont de meilleurs pronostics (Ohgaki and Kleihues, 2007).

Le GBM représente 60 à 75% des gliomes de haut grade (DeAngelis, 2001; Fisher et al., 2007). L'incidence du GBM, en France, correspond à environ 5 cas pour 100000 habitants (INCA, 2015) et augmente chaque année d'1% (Baldi et al., 2010; Zouaoui et al., 2012). Le vieillissement de la population ainsi que les progrès dans le domaine de l'imagerie et du diagnostic pourraient expliquer cette augmentation. Environ 60% des patients diagnostiqués avec un GBM ont entre 55 et 74 ans. Dans ce groupe d'âge, l'incidence est de 4 cas pour 100000 habitants (ENCR, 2001). Les hommes paraissent plus touchés par la survenue d'un GBM, avec un ratio homme/ femme compris entre 1,5 et 1,8 selon les études (Brandes et al., 2008).

Le pronostic de ces tumeurs reste défavorable car la survie relative pour un adulte atteint d'un GBM, en Europe ou aux États-Unis, est de moins de 30% à 1 an, de 5% à 3 ans et ne représente plus que 3% à 5 ans, sans différence homme / femme (Capocaccia et al., 2003; Crocetti et al., 2012; SEER, 2007).

Parmi les facteurs favorisant la survenue d'un GBM, seules les radiations ionisantes à haute énergie (rayons X) ainsi que certains facteurs génétiques peuvent être retenus avec certitude (Louis et al., 2007). Les syndromes héréditaires connus (neurofibromatose de type I et II, syndrome de Li-Fraumeni, syndrome de Turcot) pouvant conduire à l'apparition d'un GBM ne rendraient compte que de 1% des cas (Ohgaki and Kleihues, 2005). Aucun facteur environnemental (pesticides, composés

nitrosurés) ni sociétal (alcool, ondes électromagnétiques) n'a pu être clairement mis en cause (Baldi et al., 2010).

Cependant le risque d'apparition d'un GBM serait diminué chez les personnes avec un terrain atopique ou allergique tel que l'eczéma ou l'asthme ou atteints d'une maladie auto-immune telle que la sclérose en plaque ou la polyarthrite rhumatoïde (Loiseau et al., 2009).

I.1.4. Gliomagenèse et anomalies génétiques

I.1.4.1 Gliomagenèse

La gliomagenèse résulte d'une accumulation séquentielle d'altérations génétiques. A l'origine, la prolifération incontrôlée de cellules d'origines gliales conduit au développement d'un gliome. Ce phénomène s'explique en partie par l'acquisition, au sein de la cellule tumorale, d'altérations de leur code génétique lui permettant d'échapper aux différents points de contrôle « check point » du cycle cellulaire. Une surexpression de régulateurs positifs du cycle nommés proto-oncogènes et/ou l'inhibition de régulateurs négatifs nommés « supprimeurs de tumeurs » ainsi que des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN conduisent à ces changements génétiques et rompent l'équilibre fragile de ce cycle (Dirks and Rutka, 1997). Ces changements génétiques se traduisent progressivement par une prolifération incontrôlée, une perte de contrôle de la régulation du cycle cellulaire, une diminution de l'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN, une augmentation de l'instabilité génétique et une dérégulation des voies de signalisation aux facteurs de croissance (Hanahan and Weinberg, 2000).

Sur le plan moléculaire, les deux types de GBMs primaires et secondaires sont caractérisés par des profils différents (Watanabe et al., 1996). Les GBM de novo présentent une amplification du récepteur au facteur de croissance épithélial (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) dans 40% des cas, des mutations de *PTEN* (Phosphatase and TENSing homolog) dans 25% des cas, mais rarement des mutations de *TP53* (Tumor suppressor p53) (28%) et d'*IDH1* ou 2 (Isocitrate DeHydrogenase) (<10%) (Yan et al., 2009). Dans les GBM secondaires, les

mutations de *TP53* sont plus fréquentes (65%) ainsi que celles d'*IDH1* ou 2 (50 à 85%). Les mutations de *PTEN* (4%) et d'*EGFR* (8%) sont plus rares. Dans les 2 types de GBM, les altérations du chromosome 10 sont les plus fréquentes (60%) qu'il s'agisse d'une perte totale ou d'une perte partielle de 10p ou 10q. En revanche, les délétions 1p (14% des GBM en moyenne) ou 19q (23,9% des GBM en moyenne) sont plus rares dans les GBM que dans les oligodendrogliomes. Les codélétions 1p19q sont rares (0 à 5%) (Ohgaki and Kleihues, 2007). Les principales différences entre GBM primaires et secondaires définissent deux voies distinctes dans l'évolution de ces tumeurs. (Figure 3)

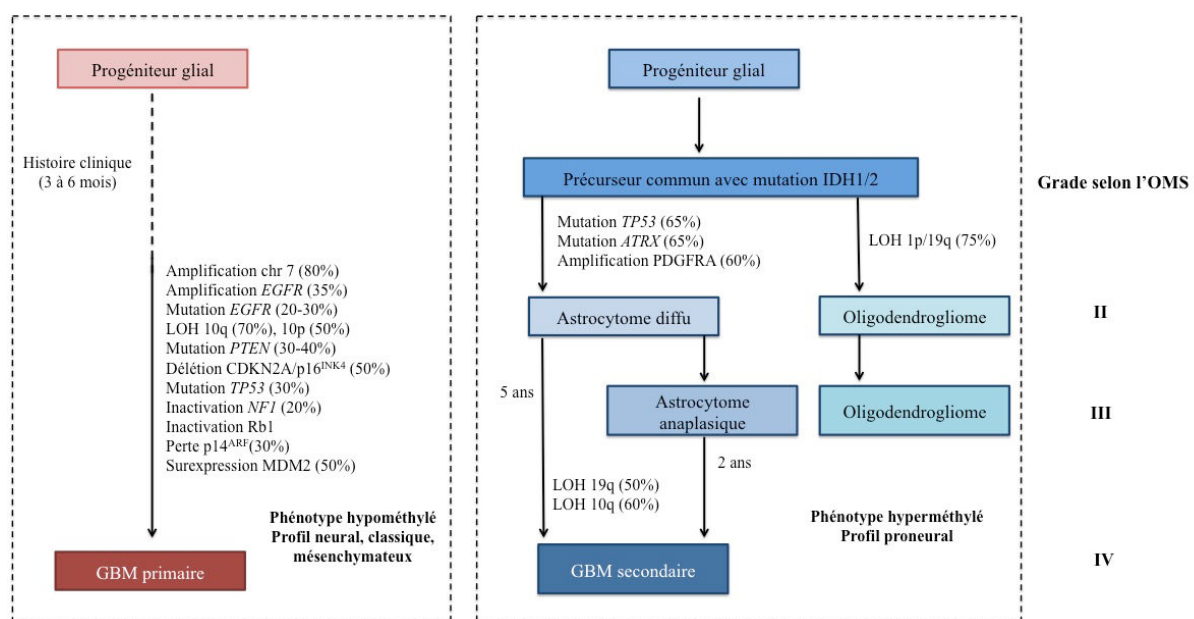


Figure 3: Altérations génétiques impliquées dans la gliomagenèse pour les GBM primaires et secondaires.

D'après (Aldape et al., 2015; Ohgaki and Kleihues, 2007, 2013) *IDH*, Isocitrate déshydrogénase ; *LOH*, Perte d'hétérozygotie ; *EGFR*, Epidermal growth factor receptor ; *PTEN*, Phosphatase and TENSin homolog ; *Rb*, Rétinoblastome ; *NF1*, Neurofibromatose de type 1; *CDKN2* Cyclin dependent kinase 2 ; *MDM*, Murine double minute ; *PDGFRA*, Platelet-derived growth factor receptor alpha.

Les principales altérations génétiques du GBM, ciblant le cycle cellulaire ou les voies de transmission du signal, se caractérisent par la surexpression de facteur de croissance, des mutations « gain de fonction » des récepteurs à activité tyrosine-kinase, à l'inverse des mutations « perte de fonction » des gènes suppresseurs de

tumeurs et constituent pour chacune d'entre elles une cible thérapeutique (Figarella-Branger et al., 2010).

I.1.4.2 Altérations génétiques

➤ Voie EGFR/ PI3K/PTEN/ AKT:

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) tels que l'EGFR ou PDGFR sont activés après fixation de leur ligand respectivement EGF, TGF- α , PDGF. La fixation du ligand entraîne l'activation du récepteur via la dimérisation et l'auto-phosphorylation de ce dernier au niveau des résidus tyrosine. L'activation du récepteur permet le recrutement de la PI3K (phosphoinositide-3 kinase) au niveau de la membrane plasmique ou l'activation de la protéine RAS qui à son tour peut activer la PI3K. La PI3K est composée de deux sous-unités, une sous-unité catalytique et une régulatrice et permet la phosphorylation de la phosphatidyl-inositol-4,5-biphosphate (PIP2) en PIP3. Cette phosphorylation induit l'activation d'effecteurs dont AKT (protein kinase B) puis de seconds messagers tels que mTOR (mammalian target of rapamycin), cible de la rapamycine (Figarella-Branger et al., 2010; Ohgaki, 2005). Cette voie de signalisation permet la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et dans l'inhibition de l'apoptose (Brennan et al., 2013a; Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). (Figure 4)

La protéine Phosphatase and tensin homology (PTEN) possède une activité phosphatase pour le PIP3 qui génère alors du PIP2 et qui permet de bloquer la voie de signalisation de la PI3K (Ohgaki and Kleihues, 2007). Le gène codant pour PTEN est présent sur le chromosome 10. (Figure 4)

Les principales altérations génétiques, mutation ou amplification du gène *EGFR*, mutation de *PTEN*, touchant cette voie conduisent alors à une activation de la PI3K. L'amplification du proto-oncogène *EGFR*, principalement observée dans les GBM primaires, constituerait un évènement tardif dans la progression tumorale (Hoang-Xuan et al., 2005). Environ 50% des GBM avec une amplification d'*EGFR* expriment le variant III muté de l'EGFR (EGFRVIII), qui est caractérisé par une délétion de 801pb couvrant l'exon 2 à 7 de la région codante de l'EGFR (Verhaak et al., 2010).

Ce récepteur tronqué, incapable de fixer son ligand l'EGF, conserve une activité tyrosine kinase intracellulaire et active de façon constitutive la voie de signalisation de la PI3K favorisant la survie cellulaire, la prolifération et l'invasion (Huang et al., 1997). Les GBM exprimant l'EGFRvIII sont caractérisés par un phénotype plus invasif et corrélés à une faible survie (Barker et al., 2001; Shinojima et al., 2003).

Les différentes altérations génétiques touchant le gène *PTEN* localisé en 10q23, comprennent des mutations, des délétions ou des insertions de codon-stop et conduisent à la traduction d'une protéine tronquée (Myers et al., 1998).

➤ Voie p16^{INK4A}/RB1/CDK4:

Cette voie intervient dans le contrôle du cycle cellulaire puisque la protéine Rétinoblastome 1 (RB1) permet la progression de la phase G1 à la phase S. En effet, le complexe CDK4/Cycline D1 phosphoryle RB1 qui libère le facteur de transcription E2F et permet l'expression de gènes impliqués dans la transition G1/S (Sherr and Roberts, 1999). La protéine p16^{INK4A} codée par le gène suppresseur de tumeur, *INK4A* (ou *CDKN2A*) inhibe les CDK (Chien and French, 2006). La liaison de p16^{INK4A} à CDK4 empêche la formation du complexe CDK4/Cycline D1 bloquant le cycle cellulaire en G1. (Figure 4)

78% des GBM présentent des altérations de cette voie, parmi les plus fréquentes, on retrouve des altérations au niveau des gènes *INK4A* et *RB1* telles que des mutations, des délétions homozygotes ou une méthylation du promoteur (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Nakamura et al., 2001; Ohgaki and Kleihues, 2007).

➤ Voie TP53/MDM2/p14^{ARF}:

La protéine P53 est codée par le gène *TP53* localisé sur le chromosome 17p13.1 et joue un rôle clé dans divers processus cellulaires tels que l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S, la réparation de l'ADN, l'apoptose, l'autophagie, la différenciation, la sénescence et l'auto-renouvellement (Vousden and Prives, 2009). 90% des GBM présentent des mutations du gène *TP53* qui inactiveraient sa fonction de régulateur négatif de la prolifération cellulaire et favoriseraient donc la tumorigenèse (Van Meir et al., 2010). L'amplification du gène *MDM2* (Murine Double

Minute) inactive également cette protéine puisque la protéine MDM2 s'associe avec p53 entraînant son inhibition et sa dégradation (Furnari et al., 2007). Le gène $p14^{ARF}$ code pour une protéine qui se lie à MDM2 et inhibe la dégradation de P53. Les GBM présentent une perte d'expression de $p14^{ARF}$ due notamment à une délétion homozygote ou à une méthylation du promoteur du gène (Ohgaki and Kleihues, 2009). La perte de fonction de P53 peut donc être liée à la modification de plusieurs gènes dont *TP53*, *MDM2* et $p14^{ARF}$. (Figure 4)

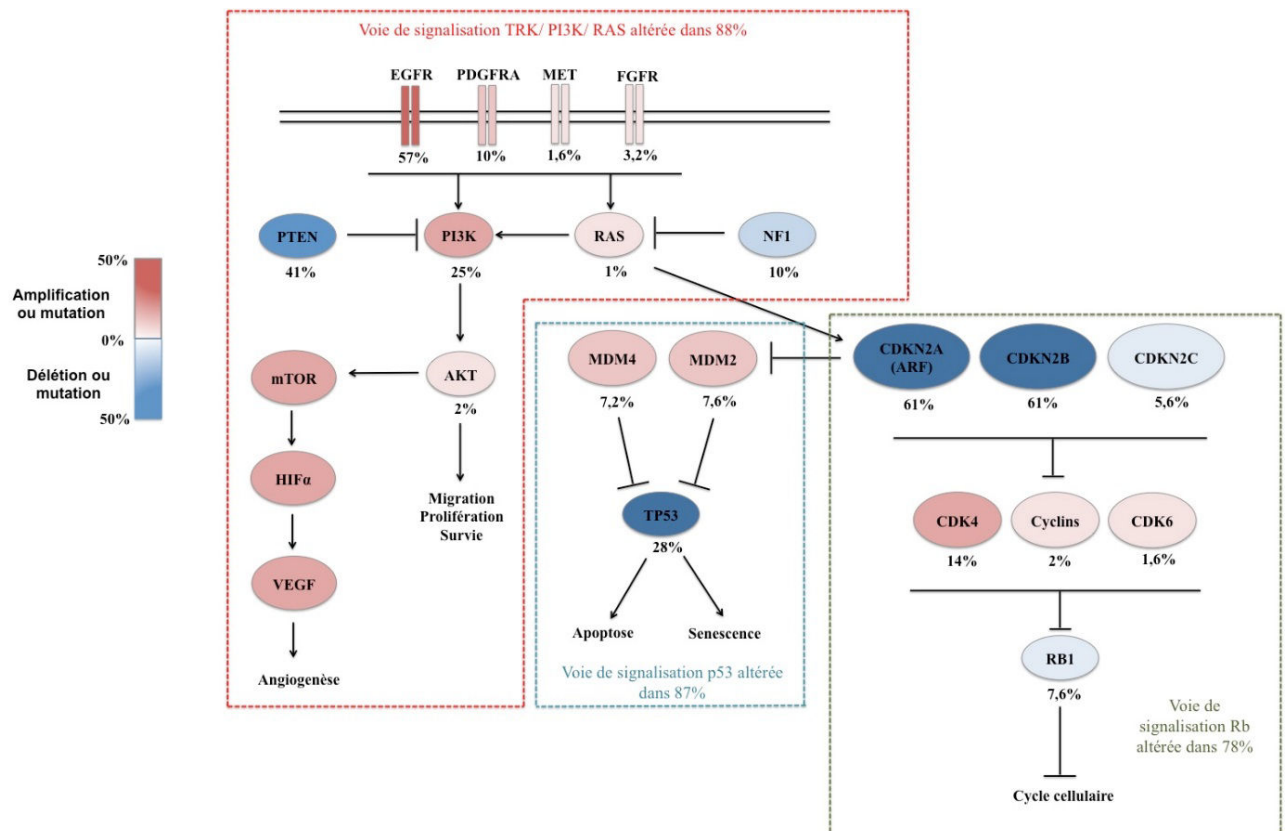


Figure 4 : Principales voies de signalisation altérées dans le glioblastome.

D'après (Brennan et al., 2013a; Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Ohgaki and Kleihues, 2007). Sont représentées en rouges les altérations activatrices et en bleues les altérations inactivatrices. EGFR, Epidermal growth factor receptor ; PDGFR, Platelet-derived growth factor receptor ; PTEN, Phosphatase and TENsin homolog ; PI3K, Phosphoinositide 3-kinase ; NF1, Neurofibromatose de type 1 ; mTOR, Mammalian Target of Rapamycin ; HIFα, Hypoxia inductible factor ; VEGF, Vascular endothelial growth factor ; MDM, Murine double minute ; CDKN2 Cyclin dependent kinase 2 ; CDK, Cyclin-depedent kinase ; Rb, Retinoblastome.

➤ Perte d'hétérozygotie du chromosome 10 ou LOH (Loss of Heterozygosity)

Les altérations génétiques du chromosome 10 présentent des profils de perte allélique différents en fonction du type de GBM (primaire ou secondaire). Etant fréquente, la LOH indique la perte d'un ou de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs sur le chromosome 10 dont *PTEN* localisé au niveau 10q23. La perte totale du chromosome est retrouvée dans les GBM primaire alors que la LOH partielle au niveau 10q est spécifique du GBM secondaire (Ohgaki and Kleihues, 2007).

➤ LOH 1p/19q

La codélétion du bras court du chromosome 1 (1p) et du bras long du chromosome 19 (19q) a été identifiée comme le résultat d'une translocation déséquilibrée qui conduit à une perte du matériel génétique concerné (Jenkins et al., 2006) et serait impliquée dans l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Les conséquences fonctionnelles et cliniques de cette anomalie font actuellement l'objet d'investigations. La codélétion 1p/19q est caractéristique d'un sous-groupe d'oligodendrogliomes à évolution clinique nettement plus lente, présentant une plus grande chimio- et radio-sensibilité et donc un meilleur pronostic (Fontaine et al., 2008).

➤ Mutations IDH1/IDH2

Deux isoformes principales existent pour les gènes *IDH* codant pour des enzymes participant au cycle de l'acide citrique, permettant ainsi la production d'énergie. *IDH1* code pour l'isocitrate déshydrogénase cytosolique, qui transforme l'isocitrate en α -cétooglutarate et *IDH2* code pour l'isocitrate déshydrogénase mitochondriale. Les mutations des gènes IDH1 et 2 sont caractéristiques des gliomes de bas grade (Rossetto et al., 2011). Les mutations se trouvent dans un codon spécifique et résultent en une nouvelle fonction enzymatique, induisant de fortes concentrations d'un métabolite normalement absent, le 2-hydroxyglutarate (2-HG) (Dang et al., 2009). Cet «oncométabolite» inhibe des enzymes impliqués dans la régulation épigénétique, ce qui induit une hyperméthylation de l'ADN «CpG-island methylator phenotype» (CIMP) et des histones. Ces modifications épigénétiques sont considérées comme déterminantes dans le processus tumoral puisque cette hyperméthylation concerne notamment la méthylation du promoteur du gène de la *MGMT*. Les mutations IDH1/2 sont typiques des GBM secondaires puisqu'elles sont

étroitement associées au profil moléculaire, en effet elle est retrouvée constante dans les gliomes avec codélétion 1p19q, et est pratiquement absente dans les gliomes avec amplification de l'*EGFR*. La mutation d'*IDH1* ou *IDH2* est considérée comme un facteur majeur de bon pronostic, quel que soit le sous-type et le grade histologique (Yan et al., 2009).

➤ Mutations de gènes impliqués dans la régulation des télomères

Les télomères sont des régions répétitives situées à l'extrémité des chromosomes permettant leur protection. Ils sont impliqués dans la régulation de la survie, de la division et de la prolifération des cellules cancéreuses. La télomerase reverse transcriptase (TERT) est une ribonucléoprotéine qui contrôle la longueur des télomères par l'ajout de séquences télomériques aux extrémités 3' (Rufer and Nabholz, 2003). Plus l'activité de TERT est importante, plus les télomères sont longs et plus la survie des cellules tumorales est prolongée (Londoño-Vallejo et al., 2008). Le gène Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked (*ARTX*) joue un rôle critique dans l'homéostasie de ces télomères. Des mutations des gènes *TERT* et *ATRX* ont été retrouvées dans les gliomes de haut et bas grades (Jiao et al., 2012).

La perte d'expression d'*ATRX* est associée à la mutation *IDH1/2*, et est fortement corrélée à la mutation *p53* mais mutuellement exclusive de la co-délétion 1p19q (Jiao et al., 2012). Cette altération est retrouvée dans 7% des GBMs I adultes et 57% des GBMs II. Le statut d'expression d'*ATRX* permet de discriminer deux groupes au sein des astrocytomes *IDH* mutés, corrélé avec la médiane de survie. Les patients présentant une perte d'expression d'*ATRX* et une mutation *IDH* survivent mieux que les patients ayant une tumeur *IDH* mutée associée à une expression normale d'*ATRX* (55,6 vs 31,8 mois) (Wiestler et al., 2013). Le statut d'*ATRX* permet d'affiner la classification des oligoastrocytomes, car *ATRX* est un marqueur des astrocytomes. Tout comme la mutation *IDH*, la mutation *ATRX* semble jouer un rôle déterminant dans l'origine de tumeurs de bas grades (Kannan et al., 2012).

En 2013, une étude a découvert des mutations activatrices du gène *TERT* dans 80% des GBMs I de l'adulte, exclusives à celles du gène *ATRX* et associées à une amplification *EGFR* dans les GBM I. Les patients non mutés pour *TERT* présentent une médiane de survie plus longue que ceux présentant la mutation (27 vs 14 mois)

(Killela et al., 2013).

➤ Méthylation du promoteur de la du gène *MGMT*

Le gène *MGMT* (MethylGuanine MethylTransferase) est un gène situé sur le chromosome 10 et code pour une protéine, la O-méthyl-guanine-ADN-méthyltransférase. Cette enzyme joue un rôle clé dans la réparation des dommages à l'ADN, plus précisément elle maintient l'intégrité de l'ADN en enlevant les groupements alkyls en position O⁶ sur les guanines provoqués par des agents alkylants (chimiothérapie telle que le témozolomide). Après transfert des groupements alkyls au niveau du site actif de l'enzyme, celle-ci est dégradée par le protéasome. La méthylation des îlots CpG situés dans le promoteur du gène *MGMT* induit une inhibition de la transcription de ce dernier et augmente la sensibilité des cellules aux traitements et notamment au témozolomide. Cette modification épigénétique est retrouvée dans 45% des GBM (Brennan et al., 2013a). Jusqu'à présent, la méthylation de *MGMT* était reconnue pour être un marqueur prédictif de la réponse au traitement par le témozolomide (Hegi et al., 2005). Ceci indique qu'elle serait un marqueur de bon pronostic.

Finalement, les recherches menées visent une meilleure caractérisation moléculaire des gliomes en s'efforçant de décrire au mieux les différentes altérations du génome, du transcriptome, du protéome et de l'épigénome afin d'en apprécier leur pertinence et leur intérêt clinique. L'analyse de l'ensemble de ces molécules permet ainsi d'établir une véritable carte d'identité moléculaire de la tumeur. En outre, les GBMs primaires présentent une amplification de l'EGFR, une mutation de PTEN et une perte totale du chromosome 10 alors que les GBMs secondaires sont caractérisés par une mutation de p53, une LOH19q et une mutation IDH1/2 (Ohgaki and Kleihues, 2007).

I.1.4.3 Signature moléculaires des glioblastomes

Une méthode regroupant les données d'expression génique, de transcriptomique et de protéomique a permis de classer les GBMs en sous-classes et de définir une signature moléculaire pour chacun des sous-ensembles. Plus que des phénotypes,

cette classification tente de mieux définir l'origine cellulaire ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition et le développement de ces tumeurs.

Une première étude basée sur l'analyse du transcriptome a permis de distinguer trois sous-ensembles de GBMs: proneuraux, proliférants et mésenchymateux (Phillips et al., 2006). Cette classification moléculaire s'appuie sur les profils d'expression de 35 gènes appelés « gènes signatures ». Ces gènes sont d'abord triés sur un critère de corrélation avec la survie des patients. Une classification hiérarchique de ces gènes définit ensuite trois sous-ensembles de gliomes de haut grade qui semblent correspondre à différents stades de la neurogenèse.

Les GBMs proneuraux sont de « bon » pronostic avec une médiane de survie de 174,5 semaines et expriment des gènes impliqués dans le développement du système nerveux central tels que *OLIG2* (Oligodendrocyte transcription factor 2), *DLL3* (Delta-like 3) et *BCAN* (Brevican core protein). Les GBMs proliférants (classique) et mésenchymateux sont de « mauvais » pronostic avec une survie médiane de 60,5 et 65 semaines respectivement. Les GBMs proliférants expriment les gènes *PCNA* (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et *TOP2A* (Topoisomerase II alpha) qui sont impliqués dans les voies de prolifération alors que les GBMs mésenchymateux expriment les gènes *YKL-40/CHI3L1* (Chitinase-3-like protein 1), *CD44* et *VEGF* (Vascular Endothelial Growth Factor) impliqués dans l'angiogenèse et présentent un profil d'expression similaire à celui des cellules souches neurales. La progression des gliomes semble corrélée avec les étapes de la neurogenèse, expliquant de ce fait l'agressivité des GBMs de types mésenchymateux et proliférants (Figure 5).

Par la suite, d'autres études, et notamment grâce à la réalisation de l'atlas du génome des glioblastomes (TCGA, The Cancer Atlas Genome), ont publié des classifications assez similaires basées sur les différentes altérations génétiques ainsi que sur le profil d'expression génique retrouvés au sein des gliomes de haut grade (Brennan et al., 2009; Verhaak et al., 2010). La classification, basée sur l'expression de 840 gènes, divise les GBMs en 4 sous-groupes différents ; classique, mésenchymateux, neural et proneural (Figure 5).

- GBM classique : la dénomination « classique » vient du fait que ce sous-type

de GBMs regroupe les altérations génétiques les plus communes tels que l'amplification du chromosome 7 ou la délétion du chromosome 10, l'amplification de l'*EGFR* ou une délétion homozygote de *CDKN2A*. Ce groupe nommé proliférant par Philips montre une augmentation de la prolifération des cellules tumorales dans ces tumeurs.

- GBM mésenchymateux : la principale caractéristique de ce sous-type est une forte association entre la mutation du gène *NF1* et une faible expression des transcrits de *NF1*. De plus, ces tumeurs présentent des mutations de *PTEN* et expriment fortement les marqueurs mésenchymateux YKL-40 (*CHI3L1*) et MET. Les mutations de *NF1* et *PTEN* entraînent une altération de voie de signalisation PI3K/AKT. D'autre part, lors d'une récurrence les tumeurs tendent à adopter un phénotype mésenchymateux (Verhaak et al., 2010).
- GBM neural : ce sous-type tumoral n'a pas d'altérations génétiques définit mais son profil d'expression tend à se rapprocher de celui d'un tissu cérébral sain.
- GBM proneural : ce sous-type présente des altérations du gène *PDGFRA* ainsi que des mutations de *TP53* et d'*IDH1* qui sont plus souvent associées aux GBMs secondaires (Ohgaki and Kleihues, 2007; Phillips et al., 2006; Verhaak et al., 2010). Ces tumeurs sont aussi associées à des patients plus jeunes et présentent une meilleure survie.

En 2010, la classification évolue en divisant les GBMs proneuraux en deux sous-groupes : le groupe G-CIMP-positif et G-CIMP-négatif (CpG island methylator phenotype) (Noussimehr et al., 2010). Cette subdivision prend en compte le profil de méthylation de l'ADN correspondant au statut mutationnel d'*IDH1*. Il apparaît que les tumeurs présentant une mutation *IDH1* sont associées à un phénotype G-CIMP-positif et à une survie plus importante. Cette meilleure survie serait conférée par le statut G-CIMP-positif (Brennan et al., 2013b). (Figure 5)

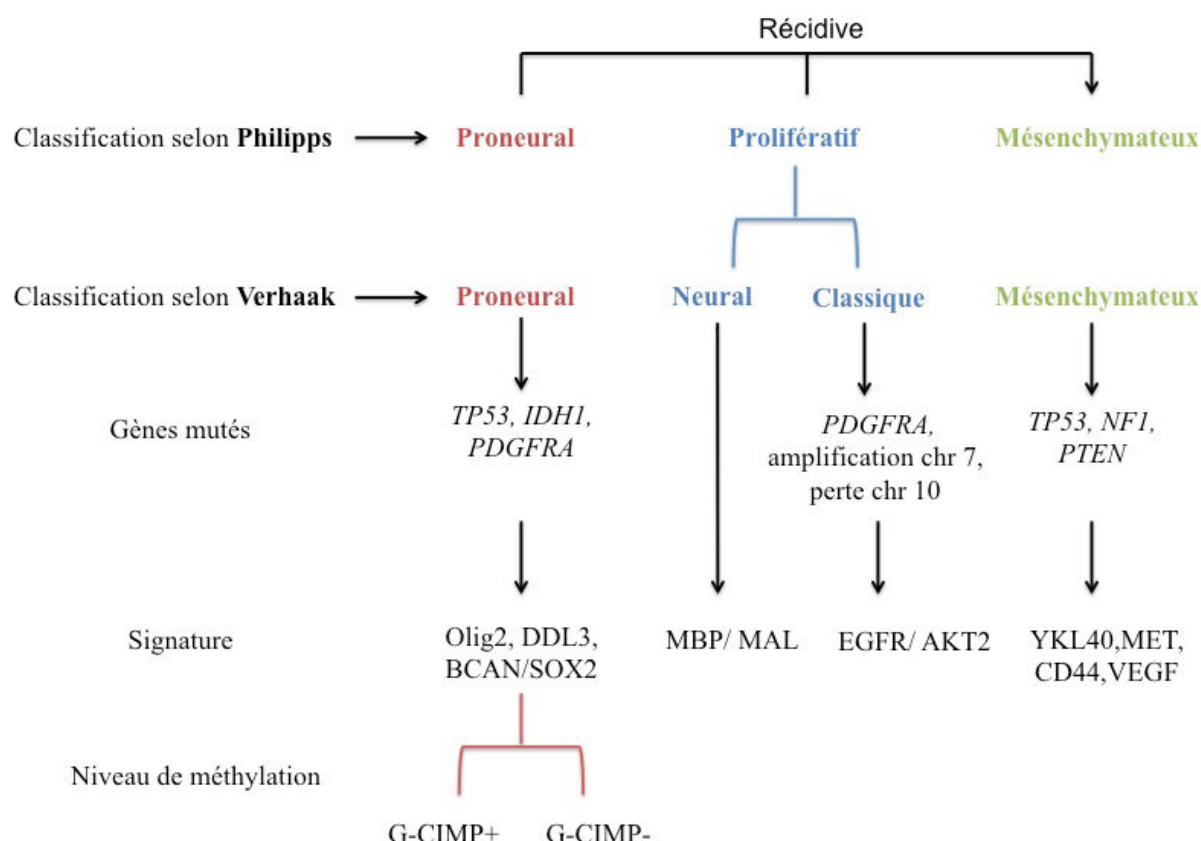


Figure 5 : signature moléculaire des GBMs selon les classifications de Verhaak, Phillips et Brennan.

D'après (Brennan et al., 2009, 2013a; Phillips et al., 2006; Verhaak et al., 2010). EGFR, Epidermal growth factor receptor ; NF1, Neurofibromatose de type 1 ; PTEN, Phosphatase and TENsin homolog ; IDH1, Isocitrate déshydrogénase ; PDGFR, Platelet-derived growth factor receptor ; YKL- 40, Chitinase-3-like protein 1 ; VEGF, Vascular endothelium growth factor ; Olig2, Oligodendrocyte Lineage Transcription Factor 2 ; DDL3, Delta-Like 3 ; BCAN, Brevican core protein ; SOX2, SRY-box2 ; AKT2 v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2 ; CIMP, CpG island methylator phenotype

I.1.5. Principaux mécanismes physiopathologie des glioblastomes

Les GBMs sont principalement caractérisés par une vascularisation importante et une invasion rapide du parenchyme cérébral sain. Ces critères sont des éléments d'agressivité importants dans le GBM traduisant leur degré de malignité.

I.1.5.1 Néo-angiogenèse tumorale

C'est Folkman en 1975 (Folkman, 1975) qui émet en premier l'hypothèse selon laquelle la croissance tumorale serait dépendante de l'angiogenèse. La néo-angiogenèse tumorale permet la formation de nouveaux vaisseaux, structurellement imparfaits à partir de vaisseaux primitifs. Le déclenchement de l'angiogenèse tumorale fait suite à un déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques au sein de la tumeur. Ce déséquilibre, en faveur des facteurs pro-angiogéniques est appelé « switch angiogénique » (Folkman, 1975). Ce mécanisme induit une accélération de la néo-vascularisation tumorale et une croissance tumorale rapide conduisant au développement de zones hypoxiques et nécrotiques. En réponse à l'hypoxie, les cellules tumorales qui bordent la zone de nécrose s'organisent en palissades caractéristiques du GBM et sur-expriment le facteur HIF-1 alpha (Inducible Factor 1). HIF-1 α et HIF-1 β induisent l'expression du gène codant pour le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). La sécrétion du VEGF par les cellules tumorales dans le microenvironnement va stimuler la prolifération et la migration des cellules endothéliales à l'origine du développement des néo-vaisseaux (Acker and Plate, 2004). Les néo-vaisseaux ainsi formés sont anormaux, fragiles et présentent un calibre irrégulier avec de nombreux shunts créant ainsi un réseau vasculaire anormal responsable d'une diminution du flux sanguin entraînant un mauvais apport en oxygène et nutriments ainsi qu'une mauvaise diffusion des chimiothérapies au sein de la masse tumorale (Brahimi-Horn et al., 2007).

I.1.5.2 Invasion tumorale

L'infiltration des cellules tumorales au niveau du parenchyme cérébral sain est responsable en grande partie de l'échec du traitement chirurgical puisque dans la plupart des cas, la récurrence tumorale a lieu au niveau des marges de résection ou à quelques centimètres de ces dernières (Giese et al., 2003). L'invasion cellulaire tumorale se déroule en quatre étapes distinctes. Dans un premier temps, les cellules tumorales se détachent de la masse tumorale et cette perte d'adhésion semble

associée à une perte d'expression de N-cadhérines qui sont des molécules d'adhésion cellulaire (Asano et al., 2004; Nakada et al., 2007). Ensuite les cellules, ayant acquises des capacités invasives, vont pouvoir adhérer à la MEC (matrice extracellulaire) via des interactions dynamiques. La dégradation protéolytique de la MEC est alors dépendante de l'activité des MMP (Matrix Métalloprotéinase) qui sont-elles-même régulées par de nombreux facteurs sécrétés par les cellules tumorales ou par les cellules du stroma tumoral, les CAF (Cancer Associated Fibroblasts) (Giese et al., 2003). Cette dégradation peut être associée ou non à un remodelage de la MEC par les cellules tumorales leur permettant d'acquérir une mobilité accrue. Les cellules de GBM migrent préférentiellement le long des voies myéliniques, des vaisseaux et au niveau l'espace sous-piale, zones toutes dépourvues d'acide hyaluronique (Louis, 2006; Onishi et al., 2011).

Dans le GBM, l'angiogenèse tumorale induit des changements structuraux et fonctionnels de la BHE (barrière hémato-encéphalique). Cette BHE est formée de cellules endothéliales, à la morphologie et à la composition biochimique différente du reste de l'organisme, des pieds des prolongements astrocytaires, d'une lame basale et de péricytes.

On retrouve, chez les patients atteints de GBM, une rupture de la barrière hémato-encéphalique favorisant le passage des agents chimiothérapeutiques ciblant la tumeur.

I.1.6. Prise en charge thérapeutique des GBMs

Le pronostic pour un patient atteint d'un GBM reste particulièrement sombre mais une prise en charge adéquat, combinant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie, permet d'améliorer la survie médiane.

I.1.6.1 Biopsie et résection chirurgicale

La chirurgie contribue autant au diagnostic qu'au traitement des GBMs. Dans le cas du diagnostic, l'exérèse tumorale permet d'obtenir le matériel tumoral nécessaire pour l'analyse histo-pathologique. Elle permet également de réduire la masse tumorale et ainsi diminuer l'hypertension intra-crânienne et une partie des troubles neurologiques induits par la compression du parenchyme (Weller et al., 2014). Malheureusement, l'exérèse n'est que très souvent partielle en raison du caractère infiltrant de certains GBM et ne permet pas toujours d'éradiquer les cellules tumorales ayant envahi le parenchyme sain.

La biopsie reste rare et est pratiquée seulement en cas de non-opérabilité.

Les progrès chirurgicaux, dus notamment à une amélioration des techniques d'imagerie cérébrale comme l'IRM, ont permis de mieux définir l'extension macroscopique de la tumeur et donc d'améliorer l'exérèse. L'IRM permet de réséquer le maximum de tissu pathologique, tout en conservant le parenchyme cérébral sain. Les « limites » tumorales peuvent également être visualisée via l'utilisation d'une molécule fluorescente, l'acide 5-aminolevulinique (5-ALA) (Stummer et al., 2006). Cependant la chirurgie reste toujours incomplète/partielle en raison du caractère infiltrant des GBM au niveau du parenchyme sain.

I.1.6.2 Radiothérapie et chimiothérapie

La radiothérapie a montré son efficacité dans le traitement des GBMs depuis de nombreuses années. L'objectif de la radiothérapie est d'assurer le contrôle et la guérison locale ou locorégionale des processus tumoraux et de diminuer l'inflammation. Elle peut être exclusive ou associée à la chirurgie et/ou concomitante de la chimiothérapie. Seule ou associée à une exérèse tumorale limitée, elle n'est pas sans lésion pour le reste des cellules du SNC à savoir un blocage de la neurogenèse et des troubles mnésiques mais elle vise avant tout à compléter la chirurgie en éliminant le maximum de cellules tumorales (Wefel et al., 2004; Welzel et al., 2008). En effet, les rayonnements ionisants n'agissent pas directement sur

l'ADN mais interagissent directement avec les molécules intracellulaires provoquant soit des ionisations soit des excitations. Les excitations ont peu d'impact sur la cellule mais les rayonnements ionisants entraînent des réactions physico-chimiques aboutissant à un effet biologique. Les radiations peuvent ainsi provoquer des interactions entre les électrons libérés et les molécules intracellulaires, dont l'ADN, ou encore entraîner la production de radicaux libres, via la radiolyse de l'eau, hautement réactifs et interagissant avec l'ADN. Ces interactions entraînent des cassures simples ou doubles brins de l'ADN ; en cas de non-réparation, les cassures chromosomiques génèrent des aberrations chromosomiques, induisant la mort cellulaire. Pour le GBM, plusieurs études indiquent une meilleure survie lorsqu'une radiothérapie est administrée après la chirurgie (Laperriere et al., 2002). Cependant, malgré ce traitement, la récurrence au niveau du site original de la tumeur est observée dans 90% des cas.

Quant à la chimiothérapie, de nombreux essais thérapeutiques soulignent l'efficacité des agents alkylant de l'ADN tel que le Témzolomide (Chamberlain, 2015). Le témozolomide est un agent alkylant exerçant une action principalement cytotoxique. Il délivre un groupement méthyl sur les bases guanines en position O⁶ et N⁷ de l'ADN. Cet adduit va être à l'origine d'un appariement aberrant des bases lors de la réplication de l'ADN ainsi méthylé, entraînant une cassure du brin d'ADN, puis une mort cellulaire par apoptose (Zhang et al., 2012).

A l'heure actuelle, le traitement classique du GBM, repose sur une résection chirurgicale de la partie la plus importante de la tumeur suivie d'un traitement concomitant radio-chimiothérapeutique selon le protocole Stupp (Stupp et al., 2005). L'agent chimiothérapeutique de référence est le Témzolomide (TMZ). Ce schéma thérapeutique, essentiellement applicable aux patients de moins de 70 ans, associe une radiothérapie à la dose de 60 Gray (Gy) en 30 fractions (2 Gy/fraction) délivrées en six semaines, associées à la prise orale de témozolomide (TMZ) à la dose de 75 mg/m² pendant toute la durée de l'irradiation. Puis six cycles de chimiothérapie orale de 150 à 200 mg/m² de J1 à J5 sont renouvelés tous les 28 jours. Avec le protocole thérapeutique STUPP la durée médiane de survie est allongée de 2.5 mois avec l'ajout du TMZ. Le traitement possède une efficacité supérieure à un traitement par radiothérapie seule avec une probabilité de survie à 5 ans de 9.8% contre 1.9% (Stupp et al., 2009). En cas d'échec du traitement avec le TMZ, les nitrosoures, telle

que la carmustine, sont les agents alkylants de chimiothérapie les plus utilisés en seconde ligne pour le traitement des GBMs. Ce traitement consiste en l'implantation de polymères biodégradables contenant de la carmustine (BCNU) (Gliadel[®], MGI Pharma) au niveau de la zone d'exérèse. Cela a pour but d'éradiquer les cellules tumorales résiduelles après résection par libération de carmustine sur plusieurs semaines (Qi et al., 2015).

Les patients présentant une méthylation du gène *MGMT* ont une survie plus longue lorsque le protocole Stupp est appliqué, cependant il n'existe aucun traitement efficace entraînant la guérison d'un GBM (Hegi et al., 2005). De part les caractéristiques de cette tumeur, le patient développe, à plus ou moins long terme une récurrence tumorale. Dans ce cas, les options thérapeutiques restent limitées à savoir intervention chirurgicale, irradiation ou chimiothérapie de deuxième ligne.

I.1.6.3 Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées sont des traitements qui ciblent des molécules surexprimées par les cellules gliales tumorales, responsables de la progression tumorale via leur rôle dans la prolifération, la migration ou l'angiogenèse ou dans la résistance aux traitements conventionnels. Ces traitements peuvent être associés ou non avec la radiothérapie ou le TMZ. Ces nouvelles molécules permettent d'agir de façon spécifique sur les cellules de GBM en limitant les effets indésirables et toxiques rencontrés lors de traitements par chimiothérapie.

- Thérapie ciblant l'angiogenèse

Le bevacizumab (Avastin[®]) est le traitement de thérapie ciblée à visée anti-angiogénique. Il a été reconnu par les autorités de santé américaines telle que la Food and Drug Administration (FDA) comme traitement dans les GBM récurrents (Cohen et al., 2009). Le bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé ciblant spécifiquement le VEGF. Le VEGF n'est alors plus capable d'activer son récepteur, le VEGFR (VEGF receptor) présent à la surface des cellules endothéliales. La suppression de l'activité biologique du VEGF induit alors une diminution de la

vascularisation tumorale et donc une diminution de la croissance tumorale augmentant le taux de survie à 6 mois (Nagpal et al., 2011; Reardon et al., 2011a). Plusieurs études ont évalué l'efficacité du bevacizumab en association avec l'irinotécan (inhibiteur spécifique de l'ADNtopo-isomérase I) qui traverse la BHE. Même si les résultats semblaient encourageants, la légitimité de l'irinotécan a été mise en cause en raison d'une toxicité importante (Prados et al., 2006; Vredenburgh et al., 2007).

D'autres inhibiteurs de l'angiogenèse ont été utilisés et évalués dans le traitement du GBM. L'aflibercept, est un récepteur « leurre » qui piège plusieurs isoformes du VEGF (VEGF-A, VEGF-B et PGF, Placental growth factor). Cependant il ne montre qu'une faible efficacité et une faible tolérance chez des patients atteints de GBM ayant récidivé (essai clinique de phase II) (de Groot et al., 2011). Des ITK (Inhibiteurs de Tyrosine Kinase) dirigés contre le VEGFR tels que le sorafenib ou le sunitinib, utilisés en monothérapie, n'ont pas montré de bénéfice clinique par rapport au protocole Stupp dans les GBMs nouvellement diagnostiqués ou récidivants (Balaña et al., 2014; Hainsworth et al., 2010). Le cilengitide est un inhibiteur sélectif des intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta$. Les intégrines sont exprimées dans les GBMs et à la surface des cellules endothéliales de la tumeur et participent au phénomène d'angiogenèse. Le cilengitide est associé à une toxicité ainsi qu'à une faible activité anti-tumorale chez des patients récidivant (Reardon et al., 2008) et nouvellement diagnostiqués porteurs d'une méthylation du promoteur *MGMT* (Stupp et al., 2010). Par la suite, une étude randomisée multicentrique de phase III a montré que le cilengitide en association avec le temozolomide et la radiothérapie n'avait pas d'impact ni sur la survie globale, ni sur la survie sans progression (Reardon et al., 2011b).

Malgré l'amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients ainsi que l'apparition de nouveaux traitements prometteurs beaucoup plus ciblés, le taux de survie des GBMs reste très faible et la récurrence est quasi systématique. Le phénomène d'échappement thérapeutique joue un rôle clé dans le mécanisme de récurrence. Il dépend directement de la résistance aux traitements de certaines cellules tumorales, ainsi que de leur caractère invasif. Il semble donc primordial d'identifier et de cibler de manière spécifique les cellules à l'origine de la tumeur.

I.1.6.4 Mécanismes de résistance des GBM

Même si les thérapies moléculaires ciblées semblent être une approche prometteuse, en termes de survie globale, les résultats obtenus restent modestes. Une mauvaise compréhension des mécanismes moléculaires de résistance au sein des différentes sous-populations cellulaires tumorales pourrait être responsable de ces résultats. En effet, de nombreux facteurs influencent la réponse aux traitements. En plus du caractère infiltrant de ces tumeurs, la fragilité du tissu cérébral sain et l'isolement du système nerveux central par la présence la barrière hémato-encéphalique (BHE) peuvent interférer avec l'action des molécules thérapeutiques même si cette dernière est dans la plupart du temps lésée (Grossman and Batará, 2004). D'autre part, les thérapies actuelles ciblent efficacement les cellules tumorales proliférantes jusqu'à la disparition de la masse tumorale. Cependant, une sous-population cellulaire en phase de quiescence a la capacité de donner naissance à une nouvelle tumeur soit au même endroit soit à distance, (Hanahan and Weinberg, 2000). L'hypothèse concernant l'existence de cette sous-population cellulaire, qui présente une agressivité et une résistance aux traitements supérieure aux autres cellules constituant la masse tumorale, est avancée en 2001 par Reya et coll. Deux modèles hypothétiques sont proposés afin d'expliquer la formation de tumeurs ainsi que la récurrence tumorale (Reya et al., 2001), le modèle stochastique et le modèle hiérarchique (Figure 6):

- Le modèle stochastique ou modèle d'évolution clonal prédit que toutes les cellules composant une tumeur détiennent le même potentiel tumorigénique et possèdent la même capacité à régénérer la masse tumorale (Nowell, 1976) (Figure 6).
- Le modèle hiérarchique suggère que l'ensemble des cellules constituant la tumeur dérivent d'une cellule unique qui posséderait des propriétés d'auto-renouvellement et de prolifération quasi-illimitée ainsi qu'un caractère multipotentiel lui permettant de se différencier selon les différents types cellulaires dans un lignage donné. Cette cellule, nommée cellule souche cancéreuse (CSC), serait alors à l'origine d'un nombre réduit de cellules, au sein de la masse tumorale et posséderait une capacité de régénération de la

tumeur (Reya et al., 2001). (Figure 6)

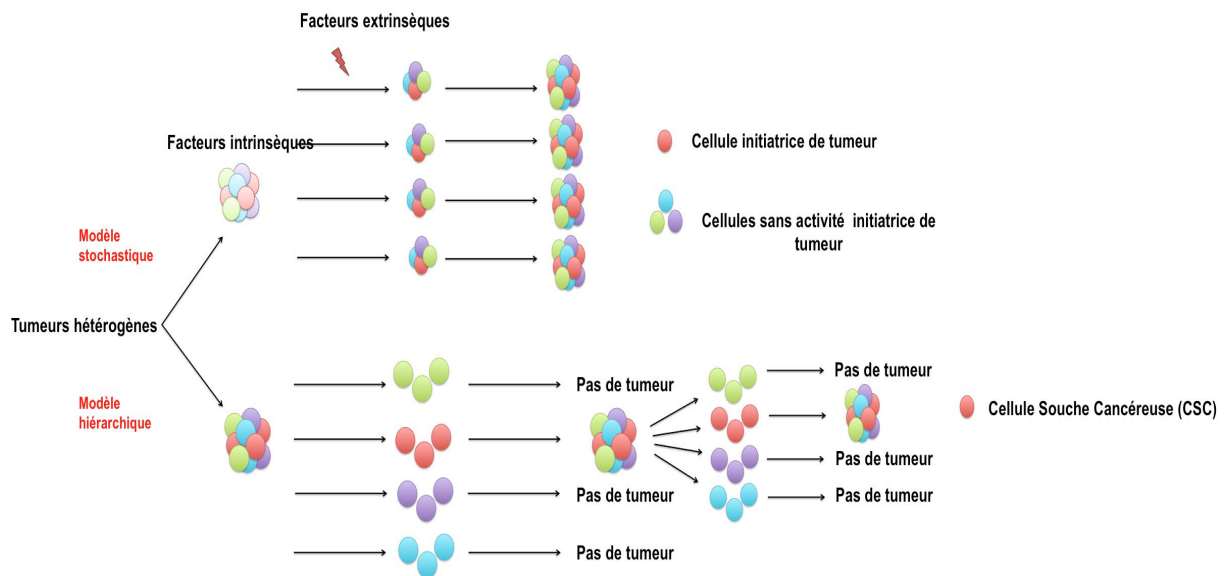


Figure 6: Modèles d'évolutions clonale et hiérarchique.

D'après (Visvader and Lindeman, 2012). Le modèle stochastique ou d'évolution clonale repose sur l'acquisition de mutations (éclair rouge) au sein d'une cellule quel que soit son stade de différenciation. Toutes les cellules tumorales issues de ce clone possèdent un potentiel tumorigène similaire. Le modèle hiérarchique est basé sur l'existence d'une cellule unique appelée cellule souche cancéreuse (CSC), au sein de laquelle surviendrait des mutations, capable de maintenir le clone malin, tandis que ses capacités de différenciation lui permettraient de maintenir l'hétérogénéité tumorale.

La prise en charge habituelle du glioblastome reste complexe malgré le développement de nouvelles stratégies innovantes dans le but immédiat de diagnostiquer de manière efficace la pathologie, d'améliorer la survie des patients. Une meilleure compréhension des mécanismes de développement de ces tumeurs est indispensable. Etant donné le rôle clé des cellules souches cancéreuses et leur intérêt en tant que nouvelles cibles thérapeutiques, la caractérisation de nouveaux marqueurs spécifiques de ces cellules CSC pourrait permettre de faciliter leur diagnostic, de les isoler et de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de les éradiquer.

I.2. Agressivité du GBM

L'agressivité du GBM est due en partie à ses propriétés intrinsèques, telles que la néo-angiogenèse, l'invasion et sa résistance aux thérapeutiques actuelles. D'autre part, le concept des CSCs (cellules souches cancéreuses) et leur ciblage au sein du tissu tumoral reste un élément clé dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la résistance du GBM.

I.2.1. Les cellules souches cancéreuses

I.2.1.1 Découverte des CSC

La notion de CSC a été abordée pour la première fois en 1994, dans les tumeurs hématopoïétiques, puis elle a été étendue aux tumeurs solides (tumeurs cérébrales, tumeurs du sein). En effet, les CSC isolées à partir de patients atteints de leucémie aigüe myéloïde partageaient les mêmes marqueurs ($CD43^+$, $CD38^-$) que les cellules souches hématopoïétiques (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). Ce concept de CSC a été élargi aux tumeurs solides telles que le GBM (Galli et al., 2004; Ignatova et al., 2002; Singh et al., 2004) et par la suite au cancer du sein (Al-Hajj et al., 2003). Des neurosphères provenant de CSC isolées à partir de patients adultes atteints de tumeur gliale corticale ont été mises en culture dès 2002 (Ignatova et al., 2002). Leur pouvoir tumorigénique a été mis en évidence dès 2004 à partir de CSC issues de patients atteints de GBM qui exprimaient le marqueur de surface CD133 (Promin 1) (Singh et al., 2004). En parallèle, des CSC issues de GBMs pédiatriques ont pu être isolées par la méthode du « neurosphere assay » (Galli et al., 2004).

Les CSC constituent une petite sous-population de cellules indifférenciées au sein de la masse tumorale qui possèdent des propriétés analogues à celles des cellules souches normales du SNC. A ces propriétés viennent s'ajouter des caractéristiques propres aux CSC qui dépendent directement de la « niche » dans laquelle ces cellules survivent et prolifèrent.

I.2.1.2 Propriétés et origine des CSC

Dans le cas du GBM, différentes terminologies peuvent être employées pour définir les CSC, telles que Glioma Stem Cells (GSC) ou encore Brain Tumor Stem Cells (BTSC) (Lathia et al., 2015; Modrek et al., 2014). Les CSC représentent une faible sous-population de la masse tumorale (0,5 % à 5 %) qui présentent des caractéristiques particulières, puisqu'elles sont indifférenciées, multipotentes et ont la capacité de s'auto-renouveler. Lors de leur prolifération, elles peuvent subir, soit une division symétrique qui donne naissance à deux cellules filles identiques, soit une division asymétrique qui génère simultanément une cellule souche et un progéniteur multipotent. Ce progéniteur conserve la capacité de se diviser rapidement mais de façon limitée. Il peut alors s'engager dans une voie de différenciation, afin de donner des cellules matures et fonctionnelles.

Les CSC possèdent un caractère indifférencié ce qui rend leur caractérisation et leur isolement difficiles à réaliser. Elles expriment à leur surface des marqueurs similaires à ceux des cellules souches neurales normales comme CD133 (marqueur controversé des CSC), intégrine $\alpha 6$, nestine (Tabatabai and Weller, 2011) ainsi que des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'auto-renouvellement et dans le maintien du phénotype souche tels que Oct4 (POU5F1, POU class 5 homeobox 1), Nanog, Sox2 (SRY (sex determining region Y)-box 2) (Huang et al., 2010).

Le potentiel d'auto-renouvellement des CSC peut être étudié grâce à la méthode de Colony Forming Units (CFU) *in vitro* et *in vivo*. En effet, ces cellules sont isolées à partir de biopsies de tumeurs, dissociées et mises en culture dans un milieu de culture spécifique dit « défini », identique à celui utilisé pour amplifier les cellules souches neurales, à savoir sans sérum et supplémenté en facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor) et le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (Reynolds et al., 1992). Dans ces conditions, les cellules poussent en suspension sous forme d'agrégats sphériques nommés neurosphères ou gliomasphères qui sont, elles-mêmes par la suite, isolées, dissociées et remises en culture dans les mêmes conditions de façon à valider leur capacité d'auto-renouvellement et de prolifération illimitée (Yuan et al., 2004). La multipotence des

CSCs est caractérisée par leur capacité à se différencier dans les 3 lignages du SNC. Le caractère multipotent peut être étudié en plaçant les neurosphères dans un milieu différenciant contenant du SVF10% et sans EGF et bFGF. Les CSCs perdent alors les principaux marqueurs souches au profit de marqueurs de différenciation tels que la GFAP, la β III-tubuline ou la Galactocérébroside-C exprimés respectivement par les astrocytes, les neurones et les oligodendrocytes (Singh et al., 2003).

La capacité des CSCs, issues d'un GBM, à régénérer la masse tumorale peut être déterminée par la réalisation de xénogreffes orthotopiques chez des souris immunodéprimées. Dans ce contexte, l'identification et le tri des CSCs basés sur l'expression du marqueur CD133 (marqueur des CSCs) ont permis de montrer que seule une petite sous-population de cellules CD133+ (environ 100 cellules) étaient capables de former des tumeurs identiques à la tumeur d'origine. A l'inverse, un nombre élevé de cellules CD133- (100 000 cellules) ne permettait pas le développement de tumeurs (Singh et al., 2004).

Deux concepts sont proposés pour expliquer l'origine des CSCs. La première hypothèse supporte l'idée d'une dédifférenciation où les CSCs proviendraient de cellules tumorales différenciées ayant subi une succession d'altérations génétiques alors que la seconde hypothèse, plus probable, supporte l'idée d'une transformation maligne où les CSCs proviendraient de cellules saines telles que des CSNs ou des progéniteurs gliaux plus ou moins engagés dans une voie de différenciation (Galli et al., 2004; Singh et al., 2003).

Enfin, les CSCs seraient déterminantes dans l'initiation des récives et dans l'échec des thérapies actuelles. Plusieurs études ont mis en évidence la résistance des CSCs à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Bao et al., 2006; Liu et al., 2006b). Ces travaux mettent en évidence une sensibilité plus importante aux rayonnements ionisants et à certains agents anti-cancéreux comme le TMZ, pour des cellules CD133- en comparaison avec des cellules CD133+. La radorésistance des CSCs serait due à une activation exacerbée des points de contrôle des dommages à l'ADN, dépendant des protéines ChK1 et ChK2 (pour checkpoint kinases 1 et 2), ainsi qu'à une augmentation de l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN (Cheng et al., 2009; Rich, 2007). De plus, la surexpression des gènes appartenant à la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) impliqués dans l'efflux des principes

actifs dont les agents de chimiothérapie et l'expression de la MGMT sont des éléments importants dans la résistance au TMZ (Liu et al., 2006b).

I.2.1.3 Marqueurs des CSC

Une multitude de marqueurs membranaires de surface tels que CD133, A2B5, intégrine $\alpha 6$, CXCR4 ou de marqueurs intracellulaires tels que la nestine, Sox2, Tlx (tailless), ALDH1 (aldéhyde déhydrogénase 1) sont utilisés pour caractériser et isoler les CSC et parmi eux, CD133 est le marqueur le plus décrit et le plus controversé. Son utilisation a permis notamment de déterminer les propriétés de ces cellules à savoir la progression tumorale et la résistance aux chimio et radiothérapies.

➤ CD133

La protéine CD133 pour Cluster of Differentiation est une glycoprotéine de surface à cinq domaines transmembranaires de 97 kDa considérée comme marqueur de CSC dans de nombreux cancers et initialement utilisé pour identifier les cellules souches hématopoïétiques (Yin et al., 1997). Le développement d'un anticorps monoclonal ciblant spécifiquement l'épitope glycosylée extracellulaire AC133 de 120 kDa a donc permis d'isoler les CSCs au sein d'une population hétérogène de cellules de GBM (Campos et al., 2011; Singh et al., 2003). Cependant l'utilisation de CD133 comme marqueur d'identification spécifique des CSCs est controversée puisque différents travaux montrent que, lors de xénogreffes, une forte concentration de cellules CD133- est également capable de reformer une tumeur *in vivo*. D'autre part, les travaux de Kemper en 2010, montrent que le statut d'indifférenciation des cellules de GBM n'est pas dû au variation d' expression du récepteur CD133 mais à son statut de glycosylation (Kemper et al., 2010). Le récepteur CD133 est en effet conservé au cours de la différenciation des CSCs tandis que la glycosylation de ce récepteur disparaît au cours de ce processus (Kemper et al., 2010). Au final, l'expression de CD133 permet de distinguer trois types de cellulaire au sein des neurosphères. Le premier type CD133- et le deuxième type CD133+ donne naissance à des cellules CD133+ et CD133-, alors que le troisième type CD133- donne uniquement naissance à des cellules CD133- (Chen et al., 2010). Lottaz en 2010, confirme

l'existence de deux groupes distincts de CSCs dérivant d'une cellule d'origine différente. L'analyse basée sur l'étude de 24 gènes, distingue les CSCs de type I qui ressemblent aux CSNs fœtales, présentent une signature « proneurale », expriment le marqueur CD133 et poussent en neurosphère alors que les CSCs de type II ressemblent aux CSNs adultes, présentent une signature « mésenchymateuse », n'expriment pas CD133 et sont semi-adhérentes (Lottaz et al., 2010).

Les CSCs représentent donc une sous-population tumorale particulièrement agressive et hétérogène qui s'avère être déterminante dans la récurrence tumorale et pourraient représenter une cible privilégiée pour les thérapies anti-cancéreuses. Leur hétérogénéité rend malheureusement complexe leur ciblage et les marqueurs utilisés ne peuvent à eux seuls définir les CSCs. Différentes stratégies thérapeutiques contre ces CSCs pourraient être développées en ciblant les voies impliquées dans l'auto-renouvellement, la prolifération et l'invasion ou en sensibilisant ces cellules à la radiothérapie et à la chimiothérapie notamment en induisant leur différenciation. Il n'existe actuellement pas de marqueurs clairement définis qui interviennent dans les mécanismes précédemment cités. Cependant notre équipe a caractérisé plusieurs marqueurs de CSC dans le glioblastome. Parmi eux, un gène est déjà connu pour participer à l'agressivité tumorale dans plusieurs cancers solides.

I.2.2. YKL-40 (CHI3L1)

I.2.2.1 Découverte de YKL-40

YKL-40 est une glycoprotéine sécrétée qui a été découverte pour la première fois dans le milieu d'une lignée d'ostéosarcome humain, la lignée MG-63. Son nom, YKL-40 est basé sur les trois premiers acides aminés situés dans la partie N-terminale de la protéine, tyrosine (Y), lysine (K) et leucine (L) et sur son poids moléculaire de 40 kDa (Johansen et al., 1992). En 1993, la séquence d'ADNc de YKL-40 ainsi que sa séquence protéique complète est identifiée et publiée (Hakala et al., 1993). YKL-40 est aussi connu sous le nom de human cartilage glycoprotein-39 (HC-gp39) (Hakala et al., 1993), 38-kDa heparin-binding glycoprotein (gp38k) (Shackelton et al., 1995), chitinase-3-like-1 (CHI3L1) (Rehli et al., 1997) et chondrex (Harvey et al., 1998).

CHI3L1 fait partie de la famille des homologues des chitinases, des endo- β -1,4-N-acétylglucosaminidases qui dégradent la chitine, un polysaccharide qui constitue la paroi de certains insectes, crustacés et nématodes (Bleau et al., 1999). Lors de leur morphogenèse, ces organismes produisent des chitinases pour remodeler la chitine. Les chitinases sont également produites par certaines bactéries et plantes ce qui constitue un mécanisme de défense lors de leur invasion par les organismes contenant la chitine. Chez les Mammifères, CHI3L1 fait partie des chitinases de la famille 18 (Bussink et al., 2007) et la protéine est très conservée entre les espèces telles que l'homme (Hakala et al., 1993), le chimpanzé, le cochon (Shackelton et al., 1995), la vache, le cochon d'Inde (Mohanty et al., 2003), le mouton, le rat et la souris (Morrison and Leder, 1994). Malgré l'absence de chitine chez les mammifères, deux chitinases, la chitotriosidase (ChTRase), et la chitinase acide (AMCase), ainsi que leur homologue, CHI3L1, ont été clonées chez l'homme. Contrairement aux deux autres chitinases, CHI3L1 ne possède pas, dans sa structure chimique, le domaine de liaison à la chitine caractérisé par la présence de six résidus cystéines ce qui induit une perte de son activité catalytique (Bleau et al., 1999).

Le gène *CHI3L1* codant pour la protéine YKL-40 est isolé en 1997, il est localisé sur le chromosome 1q32.1, a une taille de 7948 paires de base et comporte 10 exons (Rehli et al., 2003). Deux variants sont reportés dans la littérature, l'isoforme 1 qui est constitué de l'exon 1 à 10 alors que l'isoforme 2 est délété de l'exon 8. La protéine YKL-40 humaine est composée d'une simple chaîne polypeptidique de 383 acides aminés et a un poids moléculaire de 40 kDa (Hakala et al., 1993).

En condition physiologique, les principales sources de YKL-40 sont les chondrocytes, les cellules synoviales et musculaires lisses vasculaires, les macrophages différenciés et les polynucléaires neutrophiles (Johansen et al., 1999; Junker et al., 2005; Recklies et al., 2002; Shackelton et al., 1995; Volck et al., 1999). D'autre part, YKL-40 est retrouvée de façon abondante dans les cellules souches embryonnaires humaines et leurs progéniteurs (Schultz and Johansen, 2010) ainsi que dans tous les stades précoces de développement du muscle et du squelette.

En condition pathologique, des travaux regroupant analyses génomiques et dosage immunoenzymatique à partir de sérum de patients montrent une surexpression de la protéine et de son ARN messager dans différentes maladies inflammatoires

chroniques telles que l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou la fibrose hépatique caractérisées par un remodelage tissulaire (Michelsen et al., 2010). De même, une surexpression de YKL-40 dans le sérum de patients atteints d'asthme, de diabète et de maladies cardio-vasculaires a pu être observé (Johansen et al., 2007; Lee and Elias, 2010; Rathcke et al., 2010). Plusieurs hormones et cytokines semblent réguler la production de YKL-40 telles que l'IL6, l'IL13 ou l'IFN γ (Johansen, 2006).

Concernant l'asthme, la concentration de YKL-40 circulante est positivement corrélée avec la sévérité de la maladie, l'épaississement de la membrane basale et la détérioration de la fonction pulmonaire (Chupp et al., 2007). Ainsi YKL-40 pourrait être un biomarqueur sérique de l'asthme et de la présence d'un remodelage.

I.2.2.2 Rôle de YKL-40 dans le GBM

Depuis 10 ans, une attention particulière est portée sur le rôle potentiel de YKL-40 dans le développement d'une multitude de cancers. Des analyses transcriptomiques différentielles ont montré des taux d'expression significativement plus élevés de YKL-40 dans les tissus de carcinome de l'ovaire, du sein et de cerveau que celles observées dans les tissus normaux adjacents (Lal et al., 1999; Lau et al., 2006). YKL-40 est déjà considéré comme un marqueur d'agressivité dans le cancer du sein (Shao et al., 2011), de l'ovaire (Høgdall et al., 2003), dans le cancer colorectal (Cintin et al., 2002) où dans le cancer du poumon à petites cellules (Johansen et al., 2004). Dans le cancer de l'ovaire, la surexpression de YKL-40 est associée à la résistance des cellules aux traitements radio ou chimio-thérapeutiques ainsi qu'à la diminution du taux de survie des patientes (Gronlund et al., 2006). Dans le cancer bronchique, YKL-40 régule la TEM (Transition Epithélio-mésenchymateuse) et augmente l'invasion tumorale (Jefri et al., 2015). Cependant, la fonction réelle de YKL-40 n'est pas encore déterminée.

D'autre part, des niveaux particulièrement élevés de YKL-40, dans le sérum de patients atteints de carcinomes semblaient refléter l'agressivité tumorale (Cintin et al., 2002; Jensen et al., 2003; Johansen et al., 2004). De la même façon, chez des patients atteints de GBM, les niveaux d'ARNm et protéiques (sériques et tissulaires)

de YKL-40 étaient sensiblement plus élevés et ces taux sont associés à une radiorésistance et à un mauvais pronostic (Hormigo et al., 2006; Iwamoto et al., 2011; Ku et al., 2011; Nigro et al., 2005; Pelloso et al., 2005; Tanwar et al., 2002). Toutes ces données suggèrent que YKL-40 serait un bon biomarqueur diagnostique et pronostique.

Son rôle dans l'angiogenèse est largement documenté dans de nombreux cancers. Il agirait également sur le remodelage et la dégradation de la matrice extracellulaire, ce qui suggère qu'il puisse être impliqué dans les processus d'invasion tumorale. YKL-40 a pu être identifié, dans le GBM et le cancer du sein, comme un facteur pro-angiogénique puissant capable d'induire l'angiogenèse des cellules endothéliales indépendamment du VEGF (Figure 7). Cette angiogenèse est dépendante de l'interaction entre le récepteur membranaire syndecan-1 et l'intégrine $\alpha\beta3$ qui induit l'activation de FAK (Focal adhesion kinase) et de la voie des MAP Kinase (Shao et al., 2009, 2011, 2015). Dans la lignée de GBM humain U87-MG, la sécrétion de YKL-40 par les cellules induit la néo-vascularisation tumorale en régulant positivement l'expression du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Dans ce dernier cas, YKL-40 induit l'interaction du récepteur membranaire syndecan-1 et de l'intégrine $\alpha\beta5$ déclenchant ainsi une cascade de signalisation passant par FAK et ERK1/2 qui aboutit à l'augmentation du VEGF et à l'activation de l'angiogenèse (Figure 7).

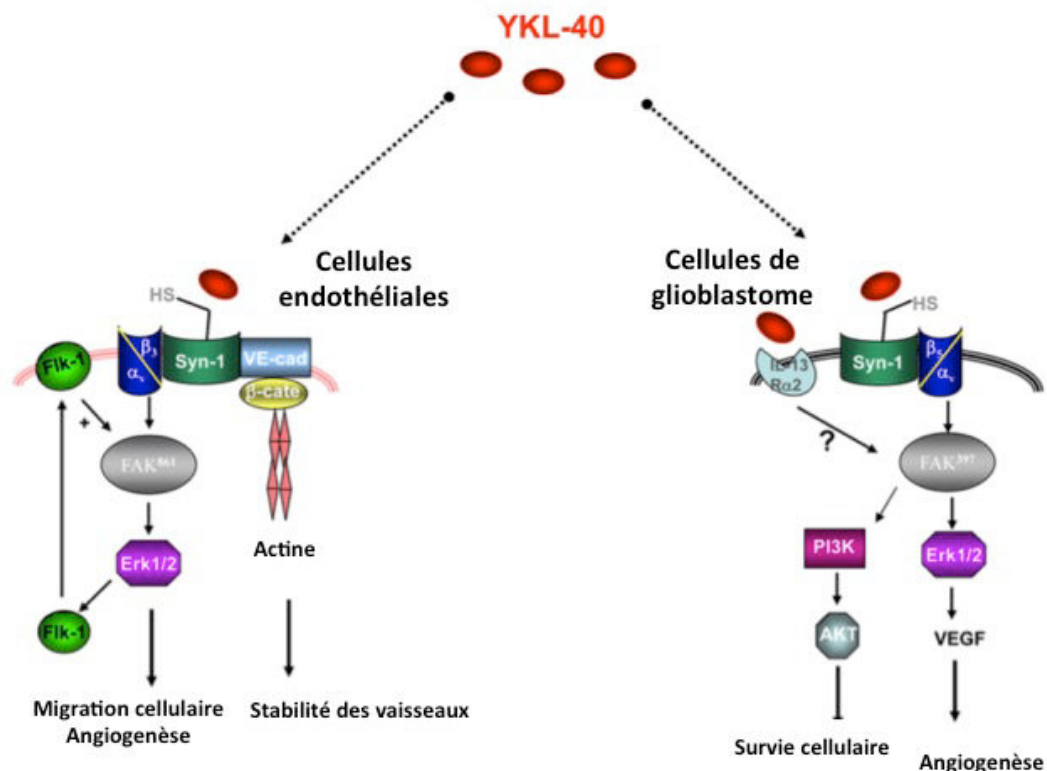


Figure 7 : Voies de signalisations activées par YKL-40 dans les cellules de glioblastome et endothéliales.

D'après (Shao et al., 2015). Dans les cellules endothéliales, la fixation de YKL-40 sur les sulfates d'héparane (HS) active l'interaction de Syn-1 (syndecan-1) et de l'intégrine $\alpha\beta3$ qui induit l'activation de FAK et de la voie des MAP Kinase permettant l'angiogenèse et la migration cellulaire. L'activation de VEGFR2 (Flk-1) induite par YKL-40 améliore les réponses angiogéniques. YKL-40 favorise aussi l'interaction de Syn-1 avec cadhérine vasculaire (VE-cad), qui recrute alors la β -caténine (β -cat) et le cytosquelette d'actine permettant la stabilité des vaisseaux. Dans les cellules tumorales, YKL-40 induit l'interaction de Syn-1 avec l'intégrine $\alpha5\beta1$ déclenchant ainsi une cascade de signalisation passant par FAK et ERK1/2 qui aboutit à l'augmentation du VEGF et à l'activation de l'angiogenèse. YKL-40 permet la survie cellulaire via l'activation de la voie PI3K-AKT.

YKL-40 joue également un rôle dans les mécanismes de résistance aux traitements ionisants. Ainsi, après irradiation, une augmentation de l'expression de YKL-40 dans des cellules de GBM les protège de la mort cellulaire et favorise l'angiogenèse.

tumorale (Francescone et al., 2011a). L'inhibition de YKL-40 via l'utilisation d'anticorps bloquants, de siRNA ou de shRNA ralentit la croissance tumorale, l'angiogenèse ainsi que l'invasion *in vivo* (Ku et al., 2011; Shao et al., 2009). De plus, une étude récente montre qu'une combinaison thérapeutique associant un anticorps anti-YKL-40 et des irradiations inhibent la vascularisation et la progression tumorale des cellules de GBM (Shao et al., 2014).

Au sein de l'équipe, des travaux précédant ont permis d'identifier une signature spécifique des CSC de GBM (Cheray et al., 2011). Nos résultats montrent des gènes spécifiquement exprimés, dont *CHI3L1*, dans des cellules indifférenciées par rapport à des cellules différenciées. Cette étude repose sur une analyse transcriptomique différentielle, à l'aide de la technique de Taqman Low Density Array (ou TLDA), du niveau d'expression des gènes impliqués dans la glycosylation selon l'état de différenciation des cellules issues de 2 lignées de GBMs. En effet, le niveau d'expression relatif des gènes a été comparé dans des cellules cultivées en conditions différenciantes (en présence de SVF) comparativement à celles cultivées en milieu défini favorisant l'enrichissement et l'émergence de cellules souches cancéreuses. La surexpression de *CHI3L1* a pu être confirmée à partir de neurosphères issus de tumeurs de patients. Une surexpression de la protéine YKL-40 a également pu être démontrée dans les lignées cellulaires soumises aux mêmes conditions.

Le rôle de la protéine YKL-40 dans le caractère agressif des cellules tumorales était déjà reconnu dans de nombreux cancers. Dans le cas des glioblastomes, les taux élevés d'ARNm de YKL-40 sont associés à la diminution du taux de survie des patients et à la diminution de la réponse aux traitements (Iwamoto et al., 2011; Ku et al., 2011; Pelloski et al., 2005; Tanwar et al., 2002). Néanmoins, ces données, associées aux connaissances sur les CSCs et aux résultats de l'analyse TLDA, suggèraient pour la première fois que YKL-40 pourrait être un bon marqueur des CSCs de glioblastomes (Cheray et al., 2011).

Des travaux récents démontrent que YKL-40 pourrait agir sur différents mécanismes oncogéniques tels que l'angiogenèse et l'invasion tumorale. Ces différents mécanismes peuvent être contrôlés via le relargage de microvésicules (50-100 nm) appelés exosomes.

I.2.3. Les exosomes

Les exosomes correspondent à des nanovésicules extracellulaires qui permettent la communication inter-cellulaire et participent au processus de tumorigénèse.

I.2.3.1 Découverte des exosomes

Le terme exosome apparaît en 1981 avec Trams (Trams et al., 1981) qui montre, pour la première fois, *in vitro*, la sécrétion dans le milieu extracellulaire de microvésicules hétérogènes contenant une activité 5'-nucléasique par plusieurs lignées cellulaires tumorales (Gliome C-6, neuroblastome N-18). Ces microvésicules ont une composition lipidique, enrichie en phospholipides polyinsaturés, et en sphingolipides, et protéique différente de celle de la membrane plasmique suggérant alors une origine différente (Trams et al., 1981). Quelques années plus tard, deux équipes avancent l'origine endocytaire de ces microvésicules après observation, en microscopie électronique, de l'exocytose de microvésicules de 50 nm de diamètre dans des cultures de réticulocytes de rat et de mouton (Harding et al., 1983; Pan et al., 1985).

Différentes études montrent que les exosomes sont produits, *in vitro*, par tous les types cellulaires et peuvent aussi être retrouvés dans divers fluides biologiques (Lakkaraju and Rodriguez-Boulan, 2008) tels que le sang (Caby et al., 2005), l'urine (Pisitkun et al., 2004), la salive (Ogawa et al., 2008), le liquide céphalo-rachidien (Street et al., 2012), le lait maternel (Admyre et al., 2007), ou encore le liquide amniotique (Mincheva-Nilsson and Baranov, 2010). Cependant le terme de vésicules extracellulaires regroupe les exosomes, d'origine endocytaire mais aussi d'autres types de vésicules, d'origine membranaires, telles que les microvésicules, les ectosomes, les particules membranaires ou les corps apoptotiques (Akers et al., 2013).

Les exosomes sont hétérogènes par leur taille, leur composition et leurs fonctions qui varient selon le type de cellules dont ils proviennent. Aujourd'hui, ils sont définis comme des microvésicules mesurant 30 à 150 nm de diamètre, de forme concave, sédimentant après une centrifugation à 100 000 g, flottant sur un gradient de sucrose à une densité de 1,13 à 1,19 g/mL et ayant une composition protéique, lipidique et en acides nucléiques particulière.

I.2.3.2 Biogenèse des exosomes

La principale caractéristique des exosomes réside dans leur origine endosomale puisqu'ils correspondent aux vésicules intraluminales (ILVs) qui sont contenues dans les corps multivésiculaires (MVBs) intracellulaires.

➤ Voie de formation des ILVs:

Lorsque la cellule décide de recycler ou de dégrader des molécules extracellulaires ou transmembranaires, elle fait appel à une voie de transport particulière, la voie d'endocytose. Celle-ci se déroule en différentes étapes (Figure 8) ; tout d'abord la membrane plasmique s'invagine pour former une vésicule d'endocytose. Ensuite ces vésicules fusionnent avec les endosomes précoces qui fusionnent à leur tour avec les endosomes tardifs. Puis la formation d'invagination au niveau de la membrane limitante des endosomes tardifs conduit à la formation de vésicules intraluminales (ILVs). A ce stade, les endosomes tardifs correspondent aux corps multivésiculaires ou endosomes multivésiculés. Les MVBs peuvent alors soit fusionner avec les lysosomes, processus qui aboutira à la dégradation de leur contenu, soit fusionner avec la membrane plasmique (Harding et al., 1983; Pan et al., 1985; Raposo et al., 1996), pour libérer les ILVs dans le milieu extracellulaire. Les vésicules relarguées prennent le nom d'exosomes, et leur bicouche lipidique conserve la même orientation que la membrane plasmique des cellules. Concernant le choix de la destination d'un MVB, la littérature démontre l'existence de différentes populations, aux destins distincts, dans une même cellule. Dans les lymphocytes B, au moins deux populations de MVBs sont présentes dans la même cellule : des MVBs enrichis

en cholestérol et d'autres non (Möbius et al., 2003). De plus, l'EGF (Epidermal Growth Factor) et son récepteur, l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) une fois internalisés, sont uniquement transportés dans la cellule via des MVBs marqués négativement pour l'acide lyso-bisphosphatidique (LBPA), un marqueur d'endosomes tardifs (White et al., 2006). Pourtant les deux sous-populations, marquées ou non pour le LBPA expriment CD63, un marqueur spécifique des exosomes, et sont morphologiquement identiques en microscopie électronique.

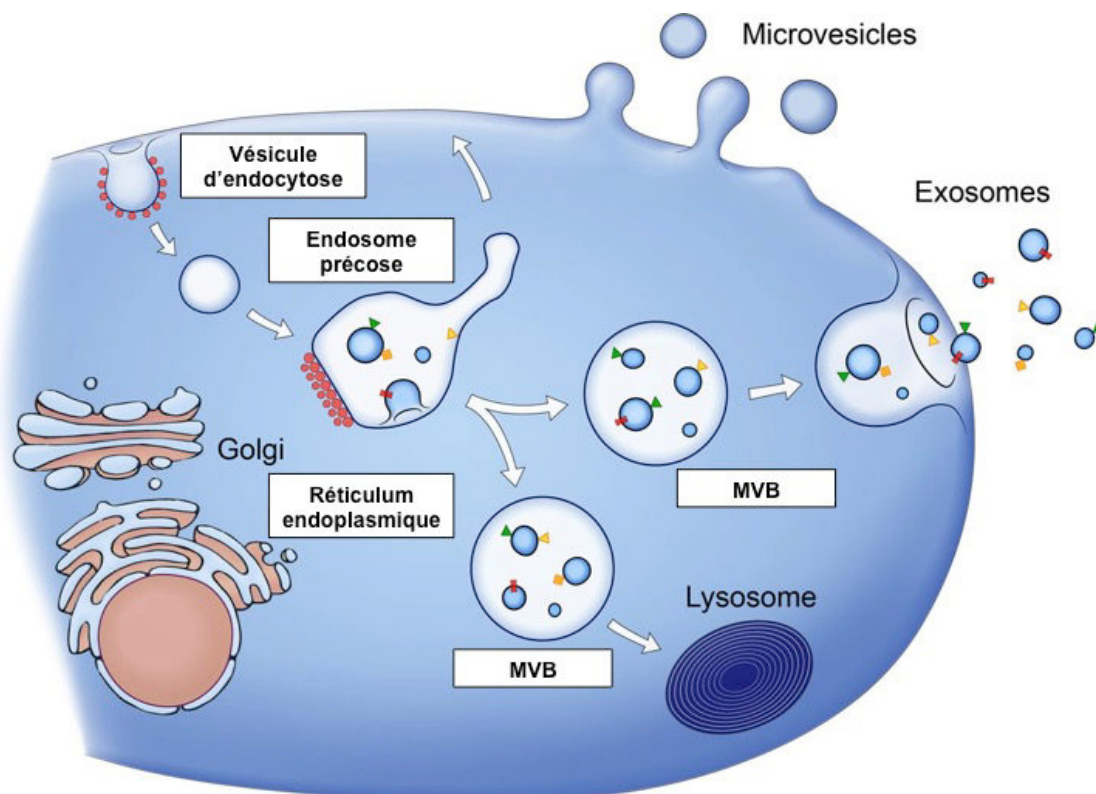


Figure 8: Formation des MVB.

D'après (Raposo and Stoorvogel, 2013). Les vésicules d'endocytose, nouvellement formées, peuvent fusionner avec des endosomes précoces ou être recyclées à la membrane plasmique, et le contenu réexposé au milieu extracellulaire. L'endosome précoce peut subir une maturation en un endosome tardif avec une accumulation de vésicules intraluminales (ILVs) dans les endosomes ou les corps multivésiculés (MVBs). Les MVBs et leurs contenus peuvent fusionner avec le lysosome induisant leurs dégradations grâce à l'activité enzymatique lysosomale, ou alors fusionner avec la membrane plasmique, libérant leurs contenus, notamment les vésicules intraluminales (ILVs), appelées exosomes une fois sécrétées.

Tous les acteurs moléculaires impliqués, soit dans la formation des MVBs et des ILVs, soit dans la sécrétion des exosomes ne sont pas connus. La formation des

exosomes ne résulterait pas d'une seule et unique machinerie mais de différents mécanismes indépendants en fonction du type cellulaire ou de la molécule adressée (Keller et al., 2006).

➤ Mécanisme ESCRT-dépendant:

L'ubiquitinylation d'une protéine, ajout d'une ubiquitine sur une lysine, joue plusieurs rôles majeurs dans la cellule en particulier celui de favoriser la dégradation. Au niveau de l'endosome, la partie cytosolique ubiquitinylée de la protéine va permettre la formation des complexes ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) qui vont ensuite agir de manière séquentielle. Les protéines ESCRT sont impliquées dans le processus d'invagination membranaire (déformation + scission) aboutissant à la formation des ILVs et dans la sélection des protéines contenues dans ces vésicules (Williams and Urbé, 2007) (Figure 9).

Dans un premier temps, le phospholipide PI(3)P présent à la membrane endocytaire va recruter, via sa liaison avec la protéine adaptatrice HRS (Hépatocyte Receptor tyrosine kinase Substrate), le complexe ESCRT 0 qui est alors constitué de la protéine HRS (Vps27) et des protéines STAM 1 et 2 (Signal Transducing Adaptor Molecule). L'amarrage du complexe va permettre de concentrer les cargos d'ubiquitine dans des micro-domaines membranaires formés de manteaux plats de clathrine (Katzmann et al., 2001, 2003). En effet, HRS contient deux motifs UIM (Ubiquitin Interaction Motifs) qui lui permettent d'interagir avec l'ubiquitine et la clathrine au niveau de son extrémité C-terminale (Raiborg et al., 2001). Le complexe ESCRT 0 va ensuite permettre le recrutement du reste de la machinerie ESCRT. HRS recrute Tsg101 (Tumour Susceptibility Gene) et permet ainsi l'assemblage du complexe ESCRT I (Bache et al., 2003). Le complexe ESCRT I se forme suite au recrutement de Tsg101 à la membrane de l'endosome par Hrs (Bache et al., 2003). ESCRT I est composé des protéines Tsg101, Vps37 A,B,C,D (Vacuolar protein sorting) qui permettent la fixation du complexe à la membrane, et de Vps28 (Katzmann et al., 2001). La protéine Tsg101 semble indispensable au processus de formation d'ILVs puisque son inhibition, via l'utilisation de siARN, diminue de 40% leur formation. De même, la protéine Alix semble jouer un rôle de régulateur de cette

formation d'ILV (Falguières et al., 2008). Les complexes ESCRT II (Babst et al., 2002a) et III (Babst et al., 2002b) s'assemblent ensuite par une cascade d'interactions protéiques.

ESCRT II va pouvoir se fixer aux cargos d'ubiquitine grâce à ses protéines EAP30 (ELL-associated protein of 30 kDa) et SNF8 (Vacuolar protein sorting SNF8) (ou Vps22). La protéine EAP45 (ELL-associated protein of 45 kDa) (ou Vps36) s'associe à la protéine Vps28 permettant de lier les complexes ESCRT I et ESCRT II (Babst et al., 2002b). Cette association induit une courbure de la membrane endocytaire piégeant alors les cargos.

ESCRT-III est un complexe dynamique, capable de polymériser au niveau de la membrane des endosomes (Babst et al., 2002a). Contrairement à ESCRT-I et ESCRT-II, le complexe ESCRT-III ne constitue donc pas un ensemble stable. Les protéines CHMP2 (ou Vps2), CHMP3 (ou Vps24), CHMP4 (ou Vps32) et CHMP6 (ou Vps20) forment le noyau central du complexe ESCRT-III. Le complexe ESCRT-III va recruter les désubiquitinyases dont l'action est de cliver l'ubiquitine des protéines cargos. Puis la déformation et la scission de la membrane par ESCRT III aboutit à la libération de la vésicule dans la lumière du MVB (Rusten et al., 2012). La dissociation du complexe ESCRT III nécessite à terme l'action de l'ATPase Vps4/SKD1, de la famille des AAA-ATPases (ATPase associated with diverse cellular activities), qui est recrutée à la membrane endosomale par son interaction avec CHMP3 et CHMP2 (Babst et al., 1998; Saksena et al., 2009). Les protéines CHMP sont connues pour leur rôle dans la déformation membranaire (Figure 9).

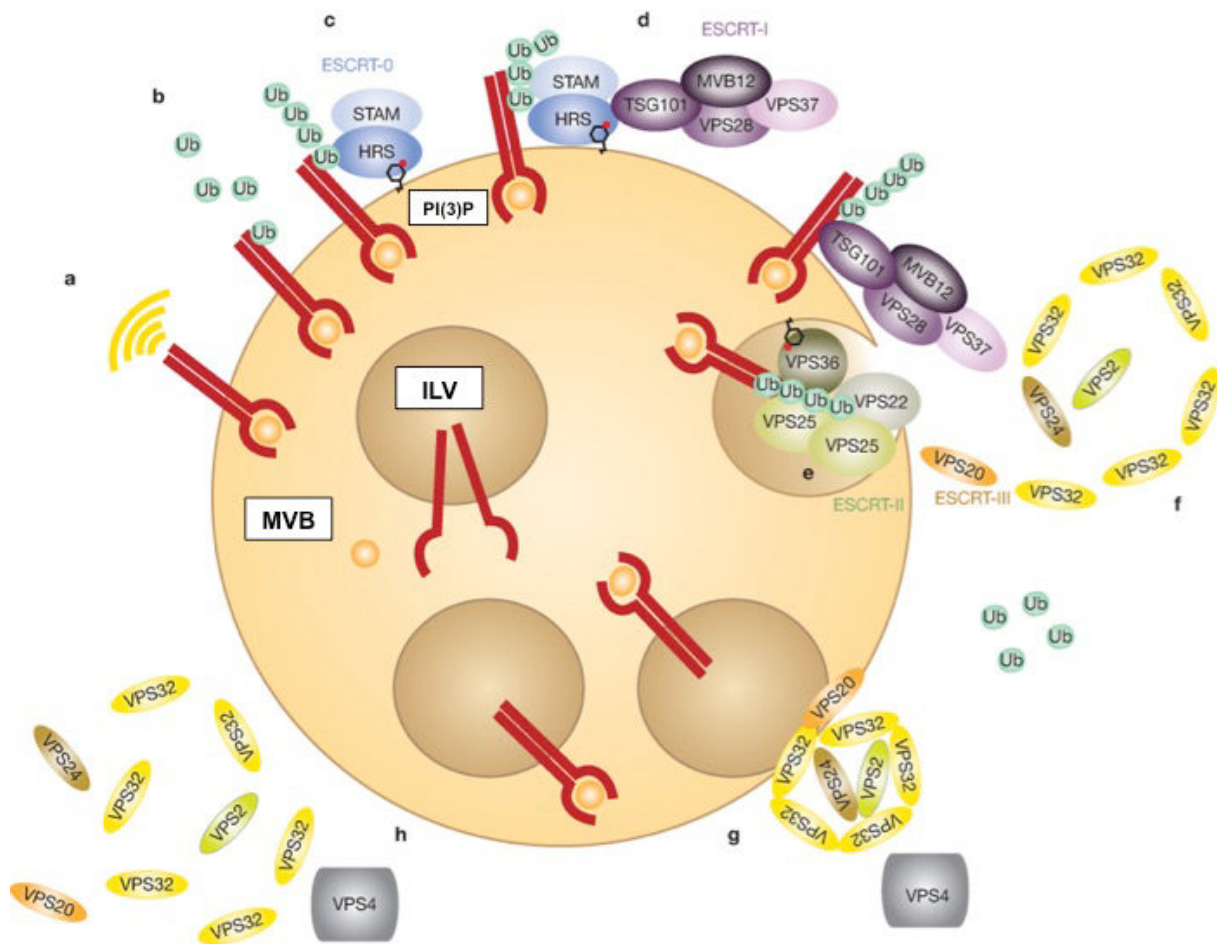


Figure 9: Les complexes ESCRT et la formation d'un endosome multi-vésiculaire.

D'après (Rusten et al., 2012). Les molécules du complexe ESCRT-0 (bleu), permettent l'initiation de la formation des complexes de la voie ESCRT et la formation des MVBs. Elles se lient au PI3P (Phosphatidyl Inositol-3 Phosphate), et participent au regroupement des protéines ubiquitynilées, Ub (vert). Les molécules du complexe ESCRT-I (rose) sont recrutées par ESCRT-0, notamment par la protéine Vps27. Le complexe ESCRT-II (vert) interagit *via* la protéine Vps36 avec le complexe ESCRT-I, le PI3P et les domaines ubiquitynilés. La sous-unité Vps25 sert de support au complexe ESCRT-III (Orange), qui va séquestrer les protéines ubiquitynilées vers l'intérieur du bourgeonnement de la vésicule en formation. Le complexe Vps4 formé (gris), grâce à son activité ATPasique, catalyse la déstructuration du complexe ESCRT-III, induisant une scission de la vésicule d'environ 50 nm de diamètre chez l'Homme.

Cependant, d'autres mécanismes, indépendant des ESCRT peuvent conduire à l'adressage des protéines dans les exosomes. Ces différents mécanismes font appel soit aux tétraspanines (Buschow et al., 2009; van Niel et al., 2011), soit à l'agrégation

de protéines (Fang et al., 2007), soit à un lipide, la céramide (Trajkovic et al., 2008).

➤ Mécanisme tétraspanine-dépendant :

Les tétraspanines sont une famille de protéines à 4 domaines transmembranaires enrichies dans les endosomes et les exosomes. Elles peuvent servir de marqueurs exosomaux spécifiques. Parmi elles, on retrouve les protéines CD63, CD9, CD81 qui semblent participer à plusieurs niveaux de la voie de sécrétion des exosomes. En parallèle, ces protéines jouent un rôle de récepteurs de surface et interviennent dans l'adhérence cellulaire. Leur association permet la formation de réseaux protéiques au sein de la bicouche lipidique appelées TEM (tetraspanin-enriched microdomain) qui lient le cholestérol et l'actine (Delaguillaumie et al., 2004). Les TEM interviendraient dans le clustering de certains récepteurs à la membrane plasmique et influenceraient ainsi leur trafic (Hemler, 2003). Plusieurs travaux effectués sur des cellules dendritiques immatures montrent que les tétraspanines forment des complexes multimoléculaires avec différentes molécules notamment le CMH II, chargées de présenter les antigènes. Ces dernières sont ubiquitinylées, incorporées dans les ILVs et dégradées dans les lysosomes via un mécanisme ESCRT dépendant. Le phénomène d'ubiquitylation et donc de dégradation des molécules de CMH II prend fin dans les cellules dendritiques activées, induisant alors une augmentation de leur expression à la surface cellulaire. Malgré l'arrêt de leur dégradation, les molécules de CMH II se retrouvent enrichies dans les exosomes via un mécanisme alternatif, ESCRT indépendant (Segura et al., 2005). La présence de ces molécules au sein des TEM indique que l'adressage de ces protéines dans les exosomes fait intervenir les tétraspanines (Buschow et al., 2009). Dans les mélanocytes, CD63 participe à la formation des ILVs et à l'adressage de la protéine PMEL (pigment cell-specific type I integral membrane protein) dans les ILVs de façon indépendante des protéines ESCRT (van Niel et al., 2011).

➤ Fusion des MVBs avec la membrane plasmique et sécrétion des exosomes :

Les protéines de la famille Rab sont des petites GTPases (Guanosyl tri-phosphatase) monomériques de 20 à 25 kDa qui font partie de la super-famille des Ras (*Ras sarcoma*). Ces protéines, présentes à la surface cytosolique des compartiments intracellulaires alternent entre deux états, un état actif lié au GTP (Guanosine tri-

phosphate) et un état inactif lié au GDP (Guanosine di-phosphate). Chaque protéine Rab est associée à un compartiment spécifique nommé Rab domains.

Elles participent au contrôle du trafic intracellulaire et interviennent à différentes étapes de la biogenèse des exosomes. Les protéines Rab11, Rab27 et Rab35 participent à la sécrétion des exosomes dans certains types cellulaires (Figure 10), Rab11 dans la lignée érythrocytaire K562 humaine (Savina et al., 2002), Rab27 a et b dans des cellules HeLa (carcinome utérin humain) (Ostrowski et al., 2010) et Rab35 dans la lignée Oli-neu (lignée oligodendrogliale murine) (Hsu et al., 2010). Rab11 est un marqueur des endosomes de recyclage et semble intervenir dans la sécrétion exosomale puisque cette protéine favoriserait la fixation et la fusion des MVB à la membrane plasmique d'une manière calcim-dépendante (Savina et al., 2005).

Une surexpression de Rab35 entraîne une augmentation de la sécrétion exosomale alors que son inhibition la diminue induisant l'accumulation des compartiments endosomaux tardifs dans les cellules (Hsu et al., 2010). Rab35 serait impliquée dans l'ancrage des MVBs à la membrane plasmique.

Concernant Rab27, les deux isoformes Rab27a et Rab27b n'ont pas la même localisation cellulaire mais elles semblent importantes dans sécrétion des exosomes (Ostrowski et al., 2010) (Figure 10). Rab27b participe au transfert des MVBs, à leur maintien en périphérie cellulaire et à leur ancrage à la membrane plasmique. Rab27a est moins connus mais semble participer à l'inhibition de la fusion des MVBs entre eux ou avec d'autres compartiments cellulaires et semble lui aussi participer à l'ancrage des MVBs à la membrane plasmique. D'autre part, son inhibition, dans des cellules de carcinome mammaire, diminue la sécrétion exosomale (caractérisés par des marqueurs spécifiques : CD63, Tsg101, Alix, Hsp70). *In vivo*, l'inhibition de Rab27a conduit à une diminution de la croissance tumorale et à la dissémination de métastases mais est sans effets sur une tumeur non-métastatique (Bobrie et al., 2012a). Cependant les différents rôles et mécanismes imputés au Rab restent dépendants du type cellulaire.

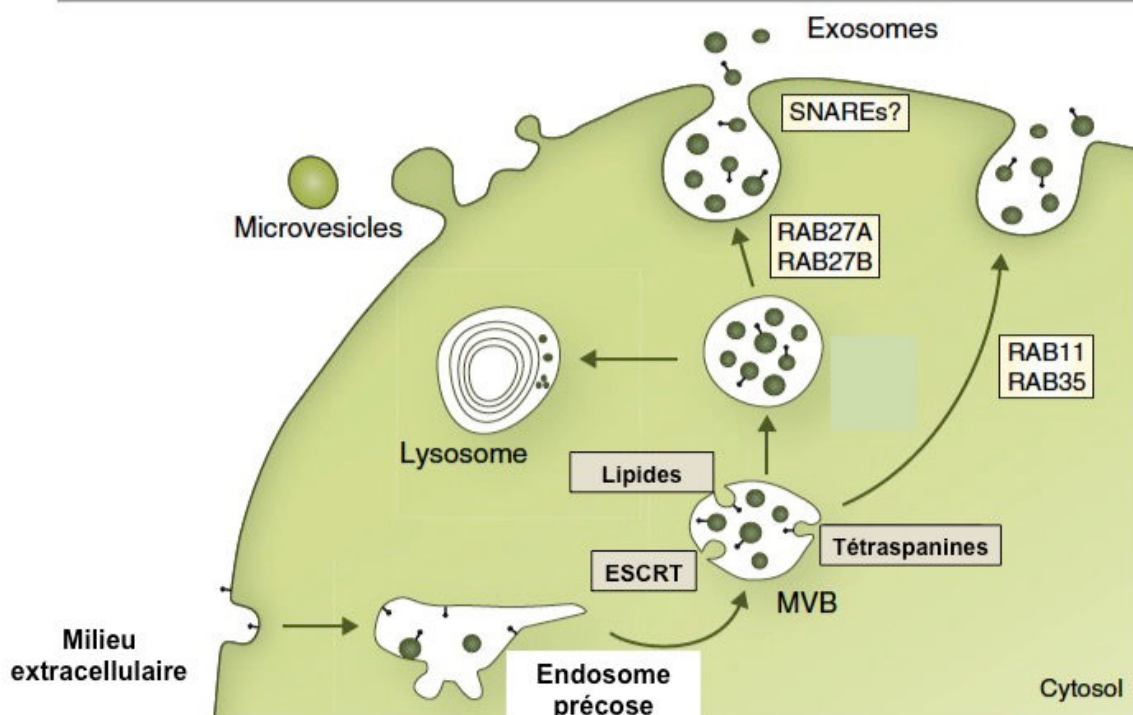


Figure 10 : Sécrétion exosomale et implication des Rab.

D'après (Kowal et al., 2014). Plusieurs molécules sont impliquées dans la biogenèse des vésicules intraluminales, tels que la machinerie ESCRT, les lipides (tels que céramide) et les tétraspanines. On ignore encore si ces mécanismes agissent simultanément sur le même corps multivésiculé (MVB) ou sur différents MVBs. Le MVB peut fusionner soit avec les lysosomes soit avec la membrane plasmique, ce qui permet la libération de leur contenu au milieu extracellulaire. Plusieurs protéines RAB (Rab11, Rab27 et Rab35) se sont révélées être impliquées dans le transport des MVBs à la membrane plasmique et dans la sécrétion d'exosomes. De plus, les protéines SNAREs (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) sont probablement impliquées dans la fusion de ces MVBs avec la membrane plasmique. D'autres types de vésicules peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire par bourgeonnement de la membrane plasmique, et sont appelés microvésicules.

Pour résumer, la sécrétion exosomale met en jeu des mécanismes complexes faisant intervenir une multitude d'acteurs. Cette sécrétion même si elle est présente en condition physiologique (ex : sécrétion neuronale), semble pouvoir être régulée par un stimulus externe, le calcium, le cholestérol, le stress, par l'état d'activation des cellules ou lors d'une pathologie comme le cancer.

I.2.3.3 Composition des exosomes

Les exosomes contiennent des protéines, des lipides et des acides nucléiques (ADN, ARN et microARN) (Figure 11). Une base de donnée, « Exocarta » (<http://www.exocarta.org/>), permet de répertorier toutes les données accumulées ces dernières années comprenant les différents modes de purification et de caractérisation des exosomes ainsi que leurs propriétés biophysiques et moléculaires.

➤ Composition lipidique

La composition lipidique des exosomes est différente de celle de la membrane plasmique puisque leur membrane est spécifiquement enrichie en cholestérol, en sphingolipides dont le ganglioside GM3 et la sphingomyéline, en céramide et en glycérophospholipides dont le phosphatidylinositol, la phosphatidylcholine, la phosphatidylsérine, la phosphatidyléthanolamine et l'acide phosphatidique (Subra et al., 2007; Trajkovic et al., 2008; Wubbolts et al., 2003). Cependant, le cardiolipide et le LBPA (acide lysobisphosphatidique) y sont absents. Les exosomes ont une composition proche de celles des rafts lipidiques et présentent une résistance à la solubilisation par différents détergents (de Gassart et al., 2003).

➤ Composition en acide nucléique

L'échange de matériel génétique, grâce aux exosomes, a été montré pour la première fois par Valadi et son équipe (Valadi et al., 2007). Cette étude révèle que des ARN sont présents dans des vésicules, qui flottent sur un gradient de sucrose à une densité comprise entre 1,11 et 1,21 g/mL, tout comme le marqueur exosomal CD63. Les exosomes de mastocytes murins contiennent 1272 ARNm dont la plupart sont intacts et fonctionnels puisqu'ils peuvent être traduits, *in vitro* et *in vivo*, dans les cellules cibles (Valadi et al., 2007) et 121 microARN capables de réguler l'expression génique de la cellule réceptrice.

En 2008, Skog *et al* démontrent que des cellules de glioblastome en culture sécrètent des exosomes contenant des ARNm (Skog et al., 2008). Ces derniers peuvent être internalisés par des cellules vasculaires endothéliales qui expriment

alors les protéines codées par ces ARNm. Le transfert de l'ARNm codant pour l'EGFR, enrichi dans les exosomes de GBM, semble provoquer une augmentation de la prolifération des cellules vasculaires endothéliales et de ce fait, favoriser la néo-angiogénèse tumorale (Skog et al., 2008).

De plus, dans le cancer colorectal, 241 ARNm ont été retrouvés en quantité plus importante dans les exosomes que dans les cellules donneuses dont 27 étaient associés au cycle cellulaire et induisaient la prolifération des cellules endothéliales (Hong et al., 2009).

Les microARN, certes moins nombreux, sont aussi présents dans les exosomes de GBM et montrent des profils similaires à ceux de la cellule d'origine (Skog et al., 2008). A l'inverse, dans les cellules de cancer gastrique métastatique, une famille de miR est particulièrement enrichie dans les exosomes et reflète le potentiel oncogénique des cellules sécrétrices (Ohshima et al., 2010).

Ces données indiquent que le contenu exosomal ne reflète pas systématiquement le contenu cellulaire et pourrait refléter un enrichissement spécifique de certains ARNm ou familles de miR en fonction de la pathologie et du type cellulaire (Pigati et al., 2010).

D'autre part, la présence de séquences d'ADN, correspondant soit à des retrotransposons soit à des séquences oncogéniques amplifiées ou mutées, a aussi été retrouvé dans des exosomes issus de cellules de GBM (Balaj et al., 2011).

➤ Composition protéique

La composition protéique des exosomes a été déterminée grâce à l'analyse d'exosomes de différents types cellulaires (lymphocytes B, cellules dendritiques, neurones et cellules tumorales) (Raposo et al., 1996, 1997; Zitvogel et al., 1998) par analyse protéomique, western-blot, immuno-histochimie, microscopie électronique, cytométrie de flux (Niel et al., 2006). Suite à ces découvertes, des analyses ont été effectuées sur des exosomes, issus de différents types cellulaires, sécrétés *in vitro* dans le surnageant de culture ou *in vivo* dans différents fluides biologiques (sérum, urine...) (Bard et al., 2004; Pisitkun et al., 2004; Skog et al., 2008). La composition du cargo exosomal peut varier en fonction de la cellule d'origine, mais les exosomes

transportent aussi dans leurs membranes des protéines spécifiques, qui peuvent être utilisées comme marqueurs exosomaux (Théry et al., 2002). Parmi celles-ci, on retrouve essentiellement (Figure):

- des protéines impliquées dans le transport vésiculaire dont les protéines Rab et les annexines
- des protéines impliquées dans la formation des MVB telles que Tsg101, Alix et la clathrine
- des tétraspanines comme CD63, CD9, CD82 et CD81
- des protéines du cytosquelette ou associées au cytosquelette: actine, tubuline, myosine
- des molécules impliquées dans l'adhésion comme les intégrines
- des protéines associées aux radeaux lipidiques comme la flotiline 1 (Street et al., 2012)
- des protéines chaperonnes : HSP70, HSP90
- des molécules de signalisation intracellulaire et du métabolisme
- des protéines impliquées dans la présentation des antigènes comme les molécules du CMH de classe I et II (Lamparski et al., 2002).

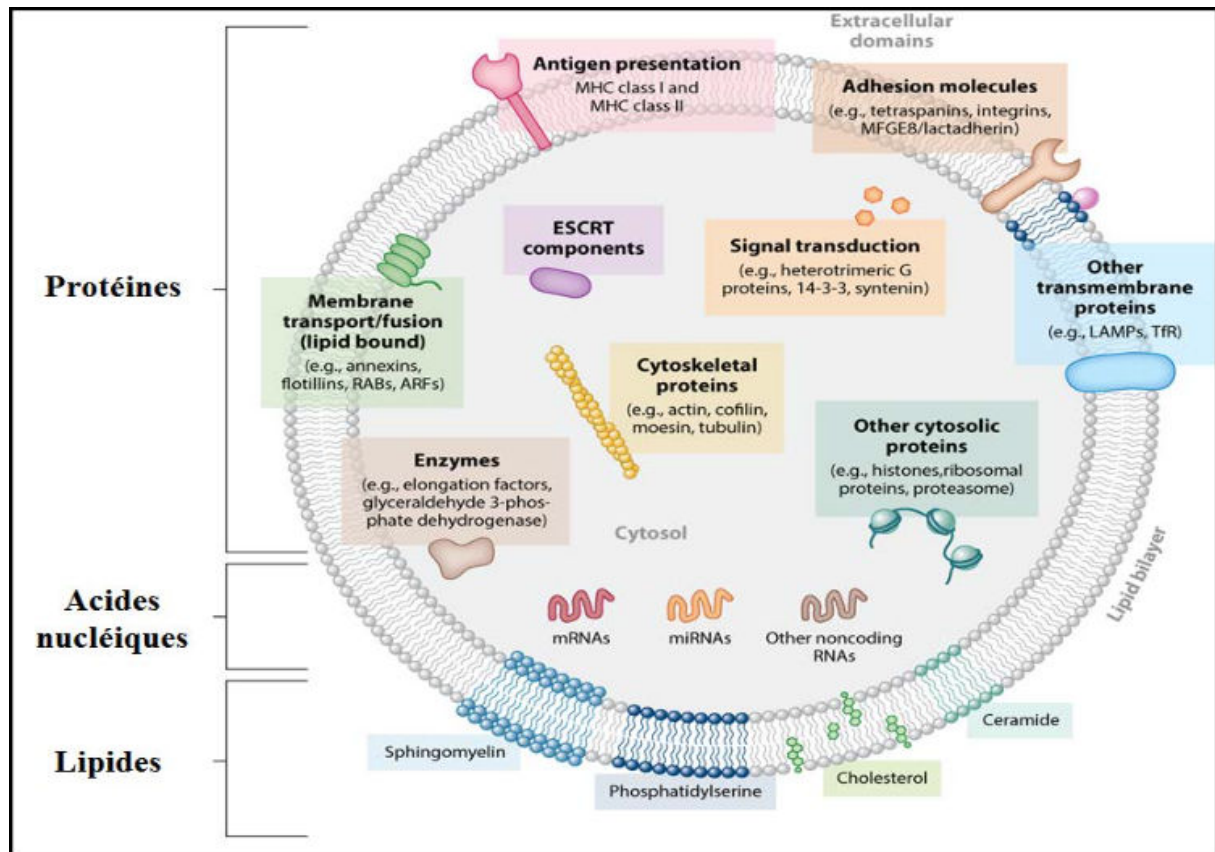


Figure 11 : Composition d'un exosome.

D'après (Colombo et al., 2014). Les exosome sont composés de lipides (sphingomyéline, céramide, phosphatidylsérine..), d'acides nucléiques (ARN, microARN...) et de protéines (enzyme, récepteur membranaire, protéine cytosolique...). Ils sont enrichis en marqueurs endosomaux spécifiques permettant leur caractérisation (CD63, CD81, Tsg101...)

Parmi les protéines contenues dans les exosomes, on utilise celles qui sont spécifiquement enrichies dans les fractions exosomales, Alix, CD63 et Tsg101, par rapport aux autres vésicules sécrétées comme marqueurs exosomaux. Ces protéines sont directement impliquées dans les mécanismes de formation des ILV à l'intérieur des MVB.

D'autre part, un même type cellulaire peut produire différentes sous-populations d'exosomes qui présentent un enrichissement spécifique pour certaines protéines tout en partageant des protéines communes. C'est le cas notamment pour les cellules polarisées épithéliales de l'intestin (van Niel et al., 2001), du rein

(Kapsogeorgou et al., 2005), de la glande salivaire (Pisitkun et al., 2004) et pour les cellules de mastocytes murins (Laulagnier et al., 2005).

I.2.3.4 Recapture des exosomes

Les exosomes jouent un rôle clé dans la communication intercellulaire. Une fois relargés par la cellule émettrice dans le milieu extracellulaire, les exosomes peuvent interagir avec des cellules réceptrices présentes dans l'environnement via différents mécanismes (Figure 12). Les exosomes sont complexes à étudier par microscopie à fluorescence compte tenu de leur taille qui se trouve dans la limite de résolution. Cependant l'utilisation de colorants lipophiles fluorescents (PKH26 ou 67), qui se concentrent dans la membrane des exosomes, permet de les suivre et de visualiser leur mode d'interaction avec la cellule réceptrice. La microscopie électronique permet elle aussi de les visualiser mais elle reste une technique couteuse et difficile à mettre en place.

Dans le cas d'interaction en surface, des molécules d'adhésion ou des récepteurs membranaires contenus dans les exosomes peuvent suffire à activer une signalisation au niveau de la cellule réceptrice, sans nécessiter une étape d'internalisation de ces derniers. C'est le cas pour les exosomes des lymphocytes B portant à leur surface, des intégrines fonctionnelles qui sont capables de se fixer à des composants de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine) ou à des fibroblastes activés par le TNF- α responsables de variations de calcium cytosolique (Clayton et al., 2004). De la même manière, la fixation d'exosomes porteurs de complexe CMH-antigène sur des cellules dendritiques (CD) permet l'activation des lymphocytes T. Cette fixation résulte de l'interaction entre ICAM-1 présent sur les exosomes et son récepteur LFA-1 exprimé à la surface des cellules dendritiques (Segura et al., 2007).

Les exosomes peuvent aussi libérer leur contenu intraluminal directement dans le cytoplasme de la cellule réceptrice (Figure 12). Cette internalisation requiert la fusion complète ou partielle de la membrane exosomale avec la membrane plasmique et dépend de la présence de microdomaines lipidiques enrichis en cholestérol au

niveau des membranes exosomale et plasmique (Montecalvo et al., 2012; Parolini et al., 2009).

D'autre part les exosomes, et de ce fait leur contenu, peuvent être endocytés par la cellule réceptrice. Des travaux montrent, que des exosomes sécrétés par les cellules dendritiques, *in vitro*, peuvent être endocytés par d'autres cellules dendritiques environnantes (Morelli et al., 2004). L'internalisation de ces exosomes, marqués au PKH67, et incubés avec des cellules dendritiques a pu être suivie en microscopie confocale et électronique et montre que ces derniers réintègrent le système endosomal de la cellule cible puisqu'ils sont localisés, dans un premier temps, au niveau des compartiments endosomaux précoces et intègrent les compartiments plus tardifs par la suite (colocalisation avec Lamp1 après 20 minutes). Des résultats similaires ont été retrouvés dans des cellules cancéreuses (Tian et al., 2013), mais également *in vivo*, après injection d'exosomes chez la souris (Morelli et al., 2004).

Enfin, les exosomes peuvent être captés par la cellule réceptrice via un mécanisme de phagocytose. C'est le cas pour les exosomes issus de cellules K562 où l'internalisation de ces derniers est inhibée après une perte d'expression de la dynamine 2 connue pour jouer un rôle primordial dans le mécanisme de phagocytose (Feng et al., 2010). Ce mécanisme semble être aussi utilisé par les cellules dendritiques où une partie des exosomes est retrouvée dans les phagosomes (Montecalvo et al., 2012). (Figure 12)

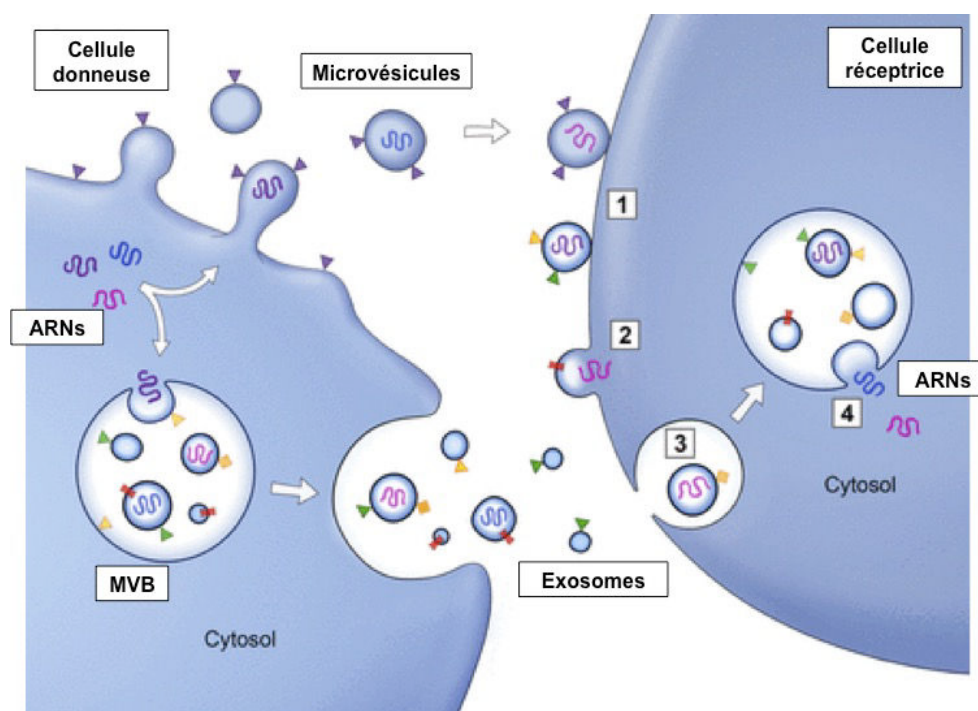


Figure 12: Mécanismes d'internalisation des exosomes.

D'après (Raposo and Stoorvogel, 2013). Les mécanismes d'interaction des exosomes avec la cellule cible sont encore à l'étude mais les exosomes pourraient soit (1) interagir avec un constituant de la membrane plasmique (ex : récepteur membranaire) de la cellule réceptrice et induire une réponse cellulaire soit (2) fusionner avec la membrane de la cellule réceptrice, soit (3) être endocyté ou phagocyté aboutissant à la libération de protéines et ARNs dans la membrane ou le cytosol de la cellule cible.

I.2.3.5 Rôles des exosomes dans le processus tumoral

Les exosomes ont tout d'abord été considérés comme un mécanisme d'élimination des protéines indésirables ou inutiles (Johnstone, 2006). Puis, ils se sont avérés être des acteurs clés dans la communication intercellulaire (Pap et al., 2009).

- Rôles dépendants du système immunitaire :

Diverses études ont étudié l'influence des exosomes produits par les tumeurs sur le système immunitaire et leur action dans la croissance tumorale (Bobrie et al., 2011). Selon leurs propriétés, et principalement leur composition protéique et nucléique, les

exosomes peuvent influencer la réponse immunitaire vers un rôle anti ou pro-tumorale (Bobrie et al., 2011). Ainsi, en 1998, une étude démontre que des exosomes produits *in vitro* par des cellules dendritiques (Dex) exposées préalablement à des antigènes tumoraux, induisent lorsqu'ils sont administrés à l'animal un rejet de la tumeur (Zitvogel et al., 1998). Ces exosomes présentent à leur membrane des complexes CMH I ou II, lié à l'antigène, capables d'activer les LT ainsi que des facteurs de co-stimulation nécessaires pour déclencher une réponse immunitaire. La présence d'antigènes tumoraux au sein des exosomes peut induire une réponse immunitaire anti-tumorale qui pourrait être utile dans la vaccination et dans les processus anti-cancéreux comme cela est suggéré par la présentation des antigènes tumoraux au système immunitaire via les exosomes des cellules dendritique (Greening et al., 2015).

A l'inverse, les cellules cancéreuses, comme tout autre type de cellules, produisent des exosomes. Ils sont appelés Tex pour « Tumor-derived exosomes » ou « oncosomes » et contiennent entre autres des protéines chaperonnes Hsp70, des complexes CMH I et des antigènes. Les exosomes agissent comme des agents de l'immunité capables de moduler les effets anti-tumoraux des lymphocytes T en transférant leurs antigènes aux cellules dendritiques (Wolfers et al., 2001). D'autre part, la présence de la chaperonne Hsp70 à leur surface induit l'activation de la migration et de l'activité cytotoxique des cellules tueuses NK (Natural Killer). Les cellules NK pré-incubée avec les exosomes Hsp70 positif sont alors capables d'initier l'apoptose via le relargage de granzyme B (Gastpar et al., 2005). A l'inverse, les Tex transportent des molécules immunosuppressives ou pro-apoptotiques (TNF pour Tumor Necrosis Factor ou Fas-ligand) leur conférant un rôle pro-tumoral immunosuppresseur (Kunigelis and Graner, 2015; Muller et al., 2016). Ces exosomes peuvent *in vitro* diminuer la prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8 (Andreola et al., 2002; Huber et al., 2005), ou inhiber le pouvoir cytotoxique des cellules NK (Natural Killer) (Liu et al., 2006a). *In vivo*, l'activité cytotoxique des NK est inhibée par la présence de Tex (Liu et al., 2006a). Les Tex seraient ainsi à la fois capables d'activer et d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale.

- Rôles des exosomes dans la tumorigénèse:
 - Transfert de protéines oncogéniques impliquées dans la survie et la croissance tumorale:

Les Tex ne jouent pas seulement un rôle dans la régulation du système immunitaire. En contact avec des cellules tumorales *in vitro*, les exosomes issus de cancer gastrique sont capables d'induire la prolifération cellulaire via une activation de la voie de la PI3K/AKT et de la voie des MAPK/ERK (Qu et al., 2009). Les exosomes issus des cellules tumorales sont capables d'amplifier le processus tumoral via les molécules cargo qu'ils contiennent. En effet, la sécrétion d'exosomes permet le transfert de protéines oncogéniques et de matériel génétique (ARNm, miRNA) de la cellule productrice d'exosomes vers une cellule cible (tumorale ou non). Ces protéines sont biologiquement fonctionnelles et donc capables de détourner les cellules du microenvironnement tumoral. Comme précédemment décrit, chez les patients atteints d'un GBM, certaines des cellules tumorales expriment une isoforme tronquée oncogénique du récepteur à l'EGF : EGFRvIII, qui est considérée comme un marqueur de mauvais pronostic. Les exosomes sécrétées par les cellules de glioblastome expriment ce récepteur *in vitro* (Al-Nedawi et al., 2008; Skog et al., 2008). Le transfert d'EGFRvIII par les exosomes a également été montré dans le sérum de patients atteints de glioblastome (Skog et al., 2008). Dans ce dernier cas, les exosomes exprimant l'EGFRvIII sont capables de le transférer à des cellules de glioblastome dépourvues de ce récepteur, et ainsi d'activer les voies de signalisation passant par les MAPK et Akt (Al-Nedawi et al., 2008). Le rôle des exosomes dans l'angiogenèse a pu être démontré par le transfert de protéines (angiogénine, VEGF ou l'IL-8) aux cellules endothéliales induisant la formation de nouveaux tubules. Ainsi, les exosomes favorisent la croissance tumorale via le transfert d'un cargo oncogénique et modulent le phénotype des cellules cibles au profit de la tumeur.

- Facilitation de l'invasion tumorale et des métastases :

L'inhibition de la sécrétion des exosomes par l'inactivation du gène *Rab27a* bloque les propriétés tumorigéniques des cellules de carcinomes mammaires, de mélanomes et de gliomes (Bobrie et al., 2012a).

Les exosomes produits par des cellules de glioblastomes de patients contiennent de nombreux facteurs pro-angiogéniques : IL-8, IL-6, angiogénine, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Skog et al., 2008). Lorsque les exosomes sont mis en contact avec des cellules endothéliales du système microvasculaire cérébral humain (HBMEC), une induction de la prolifération des HBMECs et un accroissement du réseau vasculaire sont observés. Ces changements sont similaires à ceux induits par l'ajout de facteurs angiogéniques (Skog et al., 2008). Ainsi, les exosomes de GBM induisent l'angiogenèse tumorale. D'autre part, en stimulant l'angiogenèse, la modulation des cellules stromales, et le remodelage de la matrice extracellulaire, les exosomes tumoraux (cancer du poumon ou du sein) peuvent être considérés comme des facteurs déterminants dans la mise en place d'une niche pré-métastatique, en générant un microenvironnement approprié dans les sites métastatiques éloignés (Peinado et al., 2011). De plus, il a été démontré que des souris pré-traitées avec des exosomes de mélanome ont une augmentation significative du développement de métastases pulmonaires (Liu et al., 2010).

Par ailleurs, les exosomes sécrétés par les cancers du sein et de l'ovaire se sont révélés contenir des métalloprotéinases qui contribuent à la dégradation de la matrice extracellulaire et augmentent ainsi l'invasion tumorale dans le stroma (Nieuwland et al., 2010).

Etant donné l'importance des exosomes et de leur contenu dans la communication entre la tumeur et son microenvironnement, de leur implication dans de nombreux processus tumorigéniques (l'initiation tumorale jusqu'au processus métastatiques), ces derniers représentent une source potentiel de biomarqueurs tumoraux circulant dans le sang des patients.

➤ Exosomes et modifications du microenvironnement

Les exosomes tumoraux sont aussi capables de refléter une réalité environnementale. En conditions d'hypoxie les exosomes présentent un contenu différent de celui des exosomes produits par ces mêmes cellules dans des conditions de normoxie. Ces exosomes hypoxiques auraient alors la capacité d'activer l'angiogénèse et le développement de la tumeur (Kucharzewska et al., 2013; Park et al., 2010).

D'autre part, ils peuvent également témoigner d'un stress extérieur et jouer un rôle de communication en modifiant le contenu de la matrice extracellulaire. Les exosomes provenant de cellules HeLa (cancer du pancreas) transportent la survivine, une protéine à la fois présente sur leur surface membranaire et dans leur espace intra-vésiculaire. La survivine qui est active a la capacité, tout comme la survivine extracellulaire, d'inhiber la mort cellulaire (Khan et al., 2010). De plus, après irradiation cellulaire, la quantité d'exosomes produite n'est pas affectée mais le contenu en survivine est très fortement augmenté. La sécrétion d'exosomes enrichis en survivine pourrait donc entraîner une radiorésistance cellulaire (Khan et al., 2010).

➤ Exosomes et cellules souches

Les cellules souches cancéreuses secrètent, elles aussi, des exosomes qui peuvent être transférés aux cellules environnantes modulant ainsi la progression tumorale (Hannafon and Ding, 2015). Dans le cancer du rein, les exosomes produits par les cellules souches cancéreuses activent le switch angiogénique et facilitent la production de métastases (Grange et al., 2011). De plus, les travaux de Kumar indiquent que les cellules souches cancéreuses provenant de cancers du sein et de la prostate pourraient communiquer avec les cellules néoplasiques disséminées dans leur microenvironnement via la sécrétion d'exosomes (Kumar et al., 2014). Les exosomes issus de cellules souches de glioblastome participent à l'invasion tumorale, à la croissance des neurosphères et à la formation des tubules endothéliaux (Bronisz et al., 2014).

A l'inverse, les cellules cancéreuses et les cellules stromales libèrent également des exosomes qui peuvent être recaptés par les cellules souches conduisant alors à des altérations de leur phénotype (Hannafon and Ding, 2015). Des cellules souches non-tumorigéniques associées au gliome sont capables d'augmenter l'agressivité des cellules initiatrices de gliome via le relargage d'exosomes (Bourkoula et al., 2014).

Les exosomes ont donc un rôle clé dans le processus de tumorigénèse soit en ayant un effet néfaste, tumorigène et prémétastatique soit en ayant un effet anti-tumoral par stimulation du système immunitaire.

Il existe un autre type de cellule souche présente dans le microenvironnement des GBM, les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Les liens entre ces cellules et

les cellules cancéreuses commencent à être bien établis (Niemoeller et al., 2011). Les cellules souches mésenchymateuses sont capables sous l'effet de différents facteurs d'acquérir de nouvelles caractéristiques. En effet, le traitement de CSM par des vésicules extracellulaires produites par des cellules tumorales d'origines différentes (cancer de la prostate, cholangiocarcinome) résulte en une modification des CSM vers un phénotype fibroblastique positif pour l' α -SMA (alpha Smooth Muscle Actin) avec des effets favorisant la progression de la maladie (Chowdhury et al., 2015; Haga et al., 2015). Les cellules ainsi modifiées vont sécréter des facteurs de croissance avec une action en faveur de la progression tumorale. Il a été néanmoins montré que des CSM exogènes pouvaient migrer et présenter un tropisme spécifique pour les tumeurs gliales *in vitro* (Pendleton et al., 2013a) et *in vivo* (Hong et al., 2014; Liu et al., 2014; Nakamizo et al., 2005). De plus, l'activation du comportement migratoire des CSM serait dépendante de l'activité proliférative des cellules souches cancéreuses. Ces cellules favorisent, *in vitro*, le maintien de l'état souche des CSC, leurs capacités prolifératives et leur tumorigénicité bien que les CSM ne soient pas intrinsèquement tumorigéniques (Hossain et al., 2015a). Cependant l'implication des exosomes sécrétés par les cellules de GBM dans le contrôle des CSM reste encore à établir. Récemment, une étude montre que le transfert fonctionnel, aux cellules tumorales de GBM, d'un anti-MiR-9 via des exosomes issus de CSM modifiées dans un but thérapeutique confère une chimiosensibilité aux cellules réceptrices (Munoz et al., 2013a) et de ce fait pourrait améliorer la réponse thérapeutique. Une publication récente d'un travail réalisé *in vitro* montre un effet différent des exosomes de CSM sur une lignée cellulaire de glioblastome en fonction de l'origine tissulaire de ces CSM (Del Fattore et al., 2015). En fonction de l'origine des CSM (Tissu adipeux, cordon ombilical ou moelle osseuse), leur exosomes ont un rôle anti-prolifératif et pro-apoptotique sur les cellules de GBM.

- Utilisation des exosomes comme biomarqueurs :

La composition lipidique des exosomes joue un rôle protecteur et permet de conserver l'intégrité des diverses molécules (protéines, ARNm et microARN) transportées au sein des fluides biologiques (sang, plasma, sérum, urine). Les marqueurs présents au sein des exosomes peuvent donc être analysés après avoir été prélevés dans le sang.

Dans le cancer de la prostate, les cellules sénescents sécrètent à la suite de l'irradiation des exosomes surexprimant certaines protéines qui pourraient constituer de bons biomarqueurs possédant une valeur pronostique sur la réponse thérapeutique (Lehmann et al., 2008).

L'utilisation des miRNAs contenus dans les exosomes en tant que biomarqueurs est également abondamment rapportée dans la littérature. Dans le cancer de l'ovaire, les exosomes extraits du sérum de patientes permettraient le diagnostic, puisque ces derniers transportent 8 miRs spécifiques exprimés uniquement dans les cellules tumorales. Les mêmes auteurs apportent la preuve que deux miRs, miR-200c et miR-214, permettraient de suivre la progression tumorale puisqu'ils sont retrouvés surexprimés dans des exosomes de patientes atteintes d'un stade de cancer avancé (Taylor and Gercel-Taylor, 2008).

Dans le cancer du poumon, 12 microRNAs sont uniquement exprimés dans les exosomes circulants des patients. Ces miRNAs seraient potentiellement des biomarqueurs permettant un diagnostic de la pathologie (Rabinowits et al., 2009). Dans le cancer de l'œsophage, c'est le miR-21 qui est enrichi dans les exosomes contenu dans le sérum des patients et est corrélée avec l'évolution de la tumeur (Tanaka et al., 2013). Pour les cancers de la tête et du cou, la salive contient des exosomes tumoraux transportant les biomarqueurs CD44 et CD95L. Ce fluide est à proximité des tumeurs et est facilement récoltable (Principe et al., 2013).

Dans le cas des glioblastomes, le miR-21 est un biomarqueur potentiel de l'agressivité de la tumeur transporté par les exosomes tumoraux dans le sang. Le liquide cérébro-spinal contiendrait lui aussi des exosomes tumoraux provenant du tumeur du SNC (Balaj et al., 2011).

L'étude du cargo exosomal pourrait donc aider au diagnostic de différentes pathologies, notamment cancéreuses. Ce diagnostic, à distance, par simple prélèvement sanguin constitue un moyen d'étude non invasif et peu coûteux qui pourrait épargner aux patients des biopsies répétées à l'origine de lourds effets secondaires. Dans le cas du GBM, cette méthode permettrait, dans le cadre d'un protocole clinique, de mettre en évidence l'échappement thérapeutique. La recherche de nouveaux biomarqueurs permettrait de connaître rapidement les

caractéristiques moléculaires des tumeurs dans le but d'améliorer le traitement ou le pronostic (Al-Nedawi et al., 2009). Les exosomes pourraient aussi constituer de nouveaux vecteurs thérapeutiques biocompatibles capables de protéger les molécules en leur sein et de libérer leur contenu directement dans le cytoplasme des cellules cibles ou à éliminer.

I.3. Les neurotrophines

I.1.1. Découverte des neurotrophines

En 1986, Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen reçoivent le prix nobel de médecine pour la découverte d'une protéine, le Nerve Growth Factor (NGF) capable de stimuler la croissance neuritiques (Cohen et al., 1954; Levi-Montalcini, 1987). Leurs travaux reposent sur l'induction de la croissance de fibres nerveuses après implantation d'une tumeur de souris chez un embryon de poulet. L'hypothèse sur l'existence d'un facteur soluble sécrété par la tumeur qui permettrait son innervation est alors avancée (Cohen et al., 1954; Levi-Montalcini, 1987). Par la suite, d'autres protéines structurellement homologues au NGF sont identifiées et purifiées ; le Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Barde et al., 1982) favorise la survie des neurones sensoriels et la neurotrophine-3 (NT-3) participe à la survie neuronale et au développement embryonnaire du tube neural (Maisonpierre et al., 1990). Chez les mammifères, le dernier membre découvert et isolé chez l'homme est la neurotrophine-5 (Ip et al., 1992), orthologue de la neurotrophine-4 chez le xénope (Hallböök et al., 1991) et nommé neurotrophine 4/5 (NT-4/5).

I.1.2. Structures des neurotrophines

Les gènes humains des neurotrophines proviennent de duplications successives d'un gène ancestral (Hallböök, 1999). Les gènes codant pour le NGF, le BDNF, la NT-3 et la NT-4/5 sont localisées respectivement sur les chromosomes 1, 11, 12 et 19 et les différentes protéines synthétisées partagent un certain nombre de caractéristiques chimiques telles que des poids moléculaires très proches (Hallböök, 1999), des points isoélectriques similaires et la présence de 6 cystéines permettant la formation de trois ponts disulfures (Seidah et al., 1996a).

Les quatre gènes des NTs codent pour des précurseurs protéiques glycosylés ou pré-proneurotrophines de 31-35 kDa qui sont ensuite clivés par des protéases, pour donner naissance aux formes matures (de 13,2 à 15,9 kDa) (Figure 13). Ces protéines précurseur sont composées d'un peptide signal, permettant la séquestration dans le réticulum endoplasmique. Le clivage du peptide signal donne

lieu à la formation de Pro-Neurotrophines (Pro-NT) (Figure 13). Celles-ci peuvent s'homodimériser de façon non covalente, par des ponts disulfures grâce à la présence de résidus cystéine conservés dans toutes les neurotrophines (Lessmann et al., 2003). Ces protéines sont ensuite distribuées dans le réseau trans-golgien (*Trans-Golgi Network*, TGN) et pourront par la suite;

- soit subir un clivage par des protéases intracellulaires telles que les furines et les proconvertases 1 et 2 (PC1 et PC2) avant d'être sécrétées (Seidah et al., 1996a, 1996b).
- soit être sécrétées puis clivées par des protéases extracellulaires telles que la plasmine ou certaines MMPs (Lee et al., 2001).
- soit être sécrétées sans clivage ultérieur (Lu et al., 2005).

Une fois sécrétées les pro-neurotrophines ainsi que les neurotrophines matures vont pouvoir s'homodimériser et se fixer sur leurs récepteurs de fortes ou de faibles affinités (Lessmann et al., 2003).

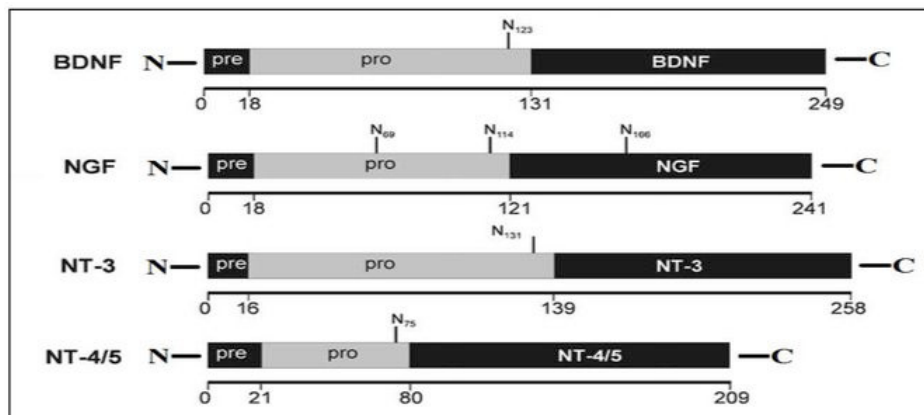


Figure 13: Structure primaire des neurotrophines.

D'après (Lessmann et al., 2003). Le peptide signal situé du côté N-terminal de la protéine (pre) est clivé au niveau du réticulum endoplasmique (RE); la partie progénitrice (pro) possédant un ou plusieurs sites de N-Glycosylation potentiels est clivée par des protéases spécifiques à différents niveaux, au niveau du réseau trans-golgien, au niveau des vésicules de sécrétion ou au niveau extracellulaire, donnant naissance au peptide mature (neurotrophine mature) localisé dans la région C-terminale.

I.2. Les récepteurs aux neurotrophines

Les NTs peuvent se fixer sur deux types de récepteurs ; les récepteurs tropomyosine-related kinase (Trk) de haute affinité (figure 14) et le récepteur neurotrophine p75 (p75^{NTR}) de faible affinité (Chao and Hempstead, 1995). Au cours du développement neuronal, les NTs sont des facteurs essentiels à la survie, la différenciation et à la myélinisation des neurones (Nykjaer et al., 2005). Le devenir de la cellule cible dépend de la dualité fonctionnelle des NTs et du récepteur avec lequel elles vont interagir (Chao and Hempstead, 1995; Lu et al., 2005).

I.2.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase

➤ Découverte des Trk

En 1986, le premier membre de la famille Trk est découvert, dans le cancer du colon, comme un oncogène dans lequel la tropomyosine est fusionnée aux domaines transmembranaires et cytoplasmique d'une protéine kinase (Martin-Zanca et al., 1986). Ce proto-oncogène est donc nommé Tropomyosine-related kinase (Trk). En 1991, des études montrent que le le *trk* proto-oncogene code pour une protéine à activité tyrosine kinase, gp140*trk* ou *TrkA* (*NTRK1*), et sert de récepteur pour certains facteurs neurotrophiques dont le NGF (Kaplan et al., 1991; Klein et al., 1991a) et la NT-3 (Cordon-Cardo et al., 1991). Deux autres membres de la même famille, *TrkB* (*NTRK2*) et *TrkC* (*NTRK3*), sont ensuite rapidement isolés et sont exprimés dans différentes structures du SNC suggérant qu'ils peuvent aussi codés pour des récepteurs neurogéniques (Klein et al., 1989, 1990, 1991b; Lamballe et al., 1991). Le ligand du récepteur TrkB est le BDNF (Klein et al., 1991b) alors que la NT-3 se fixe sur le récepteur TrkC (Lamballe et al., 1991) mais possède aussi une affinité réduite pour TrkA et TrkB (Cordon-Cardo et al., 1991; Klein et al., 1991b) (Figure 14). Comme pour les neurotrophines, les récepteurs Trk sont issus du même gène ancestral expliquant ainsi leurs très fortes homologues de séquence et de structure. Les récepteurs Trks, récepteurs à activité tyrosine kinase, lient les NTs matures avec une forte affinité et sont essentiels pour induire une réponse

fonctionnelle. Les protéases qui participent à la maturation des NTs régulent aussi l'activation des récepteurs Trk puisque ces derniers ne peuvent pas être activés par les pro-NTs (Lee et al., 2001).

➤ Structure protéique des récepteurs

Les récepteurs sont constitués de trois domaines ; une région extracellulaire, un domaine transmembranaire et une région cytoplasmique (Figure 14). La région extracellulaire, fortement glycosylée, comprend certains motifs dont un domaine riche en leucine entouré de deux régions riches en cystéines et suivis de deux domaines analogues à ceux des immunoglobulines (Ig-like domain (IgC2)). Seuls 4 sites de glycosylation sont conservés entre les différents récepteurs Trk, il s'agit d'asparagine en position 26, 90, 174 et 223. La N-glycosylation pourrait jouer un rôle majeur dans le contrôle de l'activation de ces récepteurs en régulant l'interaction avec le ligand.

La région intracellulaire comprend le domaine catalytique constitué de cinq tyrosines (Y490, Y785, Y670, Y674, Y675) essentielles pour la signalisation des récepteurs car une fois phosphorylées, les tyrosines constituent des sites de liaisons pour des protéines adaptatrices et des enzymes (Huang and Reichardt, 2003). En effet, les tyrosines Y670, Y674 et Y675 sont situées dans la boucle d'activation du domaine kinasique, leur phosphorylation potentialise l'activité tyrosine kinase. La tyrosine Y490 est située dans la partie juxtamembranaire et constitue un site de fixation pour les protéines Shc ou FRS2 et permet l'activation de Ras et de la PI3 kinase (PI3K). La tyrosine Y785 située à l'extrémité C-terminale de la protéine constitue un site de fixation pour la PLCγ. Il existe d'autres résidus tyrosine capables de fixer d'autres protéines adaptatrices impliquées dans les voies PI3K et MAPK (Huang and Reichardt, 2003). D'autre part, cette région intracellulaire est fortement conservée entre TrkA, TrkB et TrkC (Nakagawara et al., 1995). L'activation du récepteur nécessite une étape de dimérisation induite par la fixation de la NTs mature, puis une étape d'autophosphorylation. Cette autophosphorylation induit alors la phosphorylation de substrats cytosoliques impliqués dans la cascade de signalisation intracellulaire (Reichardt, 2006). Les quatre neurotrophines présentent chacune une spécificité dans leurs interactions avec les différents membres des récepteurs Trk. NGF active TrkA, BDNF et NT-4 activent TrkB, et NT-3 active TrkC. En outre, NT-3 peut activer les autres récepteurs Trk mais avec moins d'efficacité. Les NTs

interagissent avec ces récepteurs au niveau d'un site particulier, dans le domaine de type immunoglobuline proche de la membrane (Reichardt, 2006). Les différentes régions du domaine extracellulaire des Trk contrôlent les « dimérisations indépendantes du ligand » puisque des délétions des domaines immunoglobulines accentuent le potentiel de dimérisation et l'activation spontanée des récepteurs TrkA indiquant qu'ils inhibent la dimérisation du récepteur en absence de NGF (Arevalo et al., 2000).

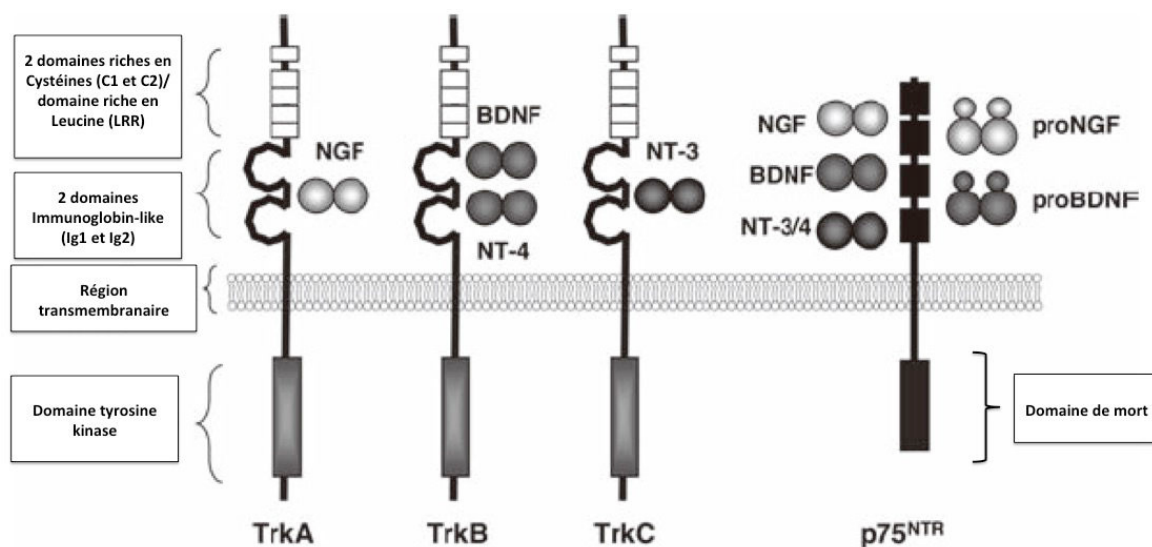


Figure 14 : Structure des différents récepteurs aux neurotrophines.

D'après (Arévalo and Wu, 2006). Les Neurotrophines matures se lient à deux types de récepteurs transmembranaires : *i)* soit de haute affinité aux récepteurs Trk, TrkA fixe le NGF, TrkB le BDNF et la NT4/5, et le récepteur TrkC la NT-3, *ii)* soit de faible affinité au récepteur p75^{NTR}, p75^{NTR} appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF et possédant une séquence de domaine de mort (Death Domain) dans sa partie intracellulaire. p75^{NTR} est également capable de fixer avec une haute affinité les pro-Neurotrophines (pro-NT).

➤ Isoformes des récepteurs

Les Trk sont soumis à un épissage alternatif conduisant à de nombreux isoformes de fonctions biologiques diverses.

- TrkA

Le prototype de la famille des Trk est le produit du gène *TrkA* initialement appelé *trk*. Le proto-oncogène *TrkA* code pour une protéine transmembranaire de 790 acides aminés qui partage les mêmes caractéristiques que les récepteurs tyrosine kinases (Martin-Zanca et al., 1989). Trois isoformes de *TrkA* nommés *TrkA-I*, *TrkA-II*, *TrkA-III* sont produits suite à un épissage alternatif de l'exon 9 (Barker et al., 1993). (Figure 15) Ces isoformes diffèrent par la présence d'un insert de 6 acides aminés supplémentaires dans le domaine extracellulaire de *TrkA-II* qui n'affecte pas l'affinité de liaison du ligand et la transduction du signal (Barker et al., 1993). Cependant, sa présence jouerait un rôle dans la sélectivité du récepteur *TrkA* pour la NT-3 qui ne se lie pas à la forme *TrkA-I*. Ces 2 isoformes *TrkA-I* et *TrkA-II* sont exprimés de façon différentielle dans les tissus ; *TrkA-I* (originellement cloné comme *TrkA*) est exprimé de façon ubiquitaire, préférentiellement dans les tissus non-neuronaux alors que *TrkA-II* l'est dans les tissus neuronaux (Barker et al., 1993). L'expression de l'isoforme *TrkA-III*, régulée par l'hypoxie a été découverte dans des cellules de neuroblastome (Tacconelli et al., 2004). Ce variant, déplété des exons 6,7 et 9, du domaine extracellulaire IG-C1 et des sites de N-glycosylations, est majoritairement exprimé dans les progéniteurs neuronaux à un stade indifférencié, dans le thymus humain et murins (Tacconelli et al., 2007) ainsi que dans des tumeurs dérivées des crêtes neurales. *TrkA-III* a un pouvoir oncogénique, via la voie PI3K-AKT-NFκB et indépendamment du NGF, dans les cellules NIH3T3 et des cellules de neuroblastome (SH-SY5Y) en favorisant la survie des cellules, l'angiogenèse et la croissance tumorale (Tacconelli et al., 2004).

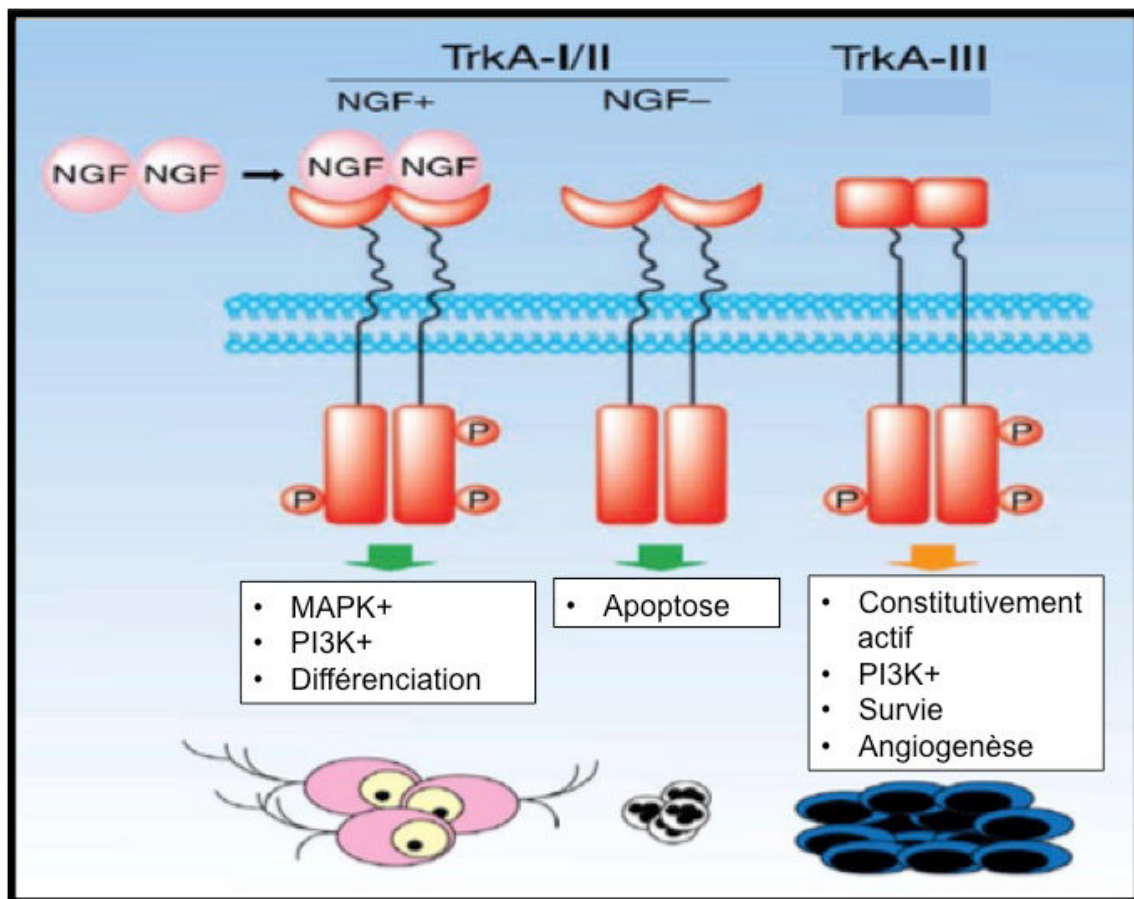


Figure 15 : Principales isoformes issues de l'épissage alternatif du transcrit du gène de TrkA (NTRK1).

D'après (Brodeur et al., 2009). L'isoforme TrkA-I lie le NGF et son activation induit la différenciation cellulaire via la voie des MAP Kinase et de la PI3K. L'isoforme TrkA-II induit l'apoptose alors que l'isoforme TrkA-III est constitutivement actif et induit la survie cellulaire et l'angiogenèse via l'activation de la PI3K.

- TrkB

Plus d'une centaine d'isoformes d'ARN de TrkB sont décrits dans la littérature cependant, seul 10 protéines sont codées et 3 sont retrouvées majoritairement chez l'homme (Stoilov et al., 2002) (Figure 16). L'isoforme TrkB entier ou Full-length (FL) est épissé des exons 16 et 19, l'isoforme TrkB-T1 contient un codon stop dans l'exon 16 et l'isoforme TrkB-T-shc est épissé de l'exon 16 et contient un codon stop dans l'exon 19 (Luberg et al., 2010) (Figure 16). En 1991, les protéines TrkB FL (145 kDa), TrkB-T1 (95 kDa) et TrkB-T-shc (105 kDa) sont retrouvées dans du cerveau de rat adulte. Les transcripts TrkB-T1 et TrkB-T-shc codent pour des protéines possédant une courte région intracellulaire alors que les régions extracellulaires et

transmembranaires sont intactes (Middlemas et al., 1991) (Figure 16). Chez l'homme seul l'isoforme TrkB-T1 est retrouvée dans les tissus neuronaux et non-neuronaux tels que le cœur, les poumons, les reins, le pancréas ou la moelle osseuse (Labouyrie et al., 1999; Ricci et al., 2004). TrkB-T1 est dépourvu du domaine catalytique tyrosine kinase mais a conservé le domaine de liaison du ligand extracellulaire lui permettant de lier le BDNF et la NT-3 (Biffo et al., 1995). Plusieurs hypothèses ont été avancées concernant son rôle, les plus probables proposent un rôle en tant que dominant négatif qui inhiberait la signalisation induite par la protéine TrkB FL (Fryer et al., 1997). En effet, TrkB-T1 pourrait soit piéger le ligand et l'empêcher de se fixer au récepteur TrkB FL (Fryer et al., 1997), soit former un hétérodimère avec le récepteur TrkB FL et empêcher la phosphorylation et donc l'activation de ce dernier (Knüsel et al., 1994). Finalement, TrkB-T1 s'est révélé être plus qu'un simple dominant négatif. En effet, dans les neurones corticaux pyramidaux, les isoformes tronquées et entières ont des effets différents sur l'arborisation dendritique puisque TrkB-T1 est impliqué dans l'élongation des dendrites distales alors que le TrkB FL augmente les dendrites proximales suggérant un mode différent de croissance des dendrites en fonction de l'expression du récepteur (Yacoubian and Lo, 2000). De plus, dans les astrocytes, une signalisation intracellulaire induite suite à la stimulation de TrkB-T1 par le BDNF aboutie à une entrée de calcium (Rose et al., 2003). Le rôle de TrkB-T1 n'est pas encore bien défini mais il semble pouvoir réguler et moduler des effets biologiques.

Contrairement à l'isoforme TrkB-T1, l'isoforme TrkB-T-shc conserve un court domaine cytoplasmique permettant la liaison aux protéines shc. Cette isoforme membranaire est retrouvée exclusivement dans le cerveau. TrkB-T-shc ne peut être phosphorylé par le récepteur entier indiquant qu'il pourrait être un régulateur négatif de la signalisation induite par TrkB dans le cerveau (Stoilov et al., 2002).

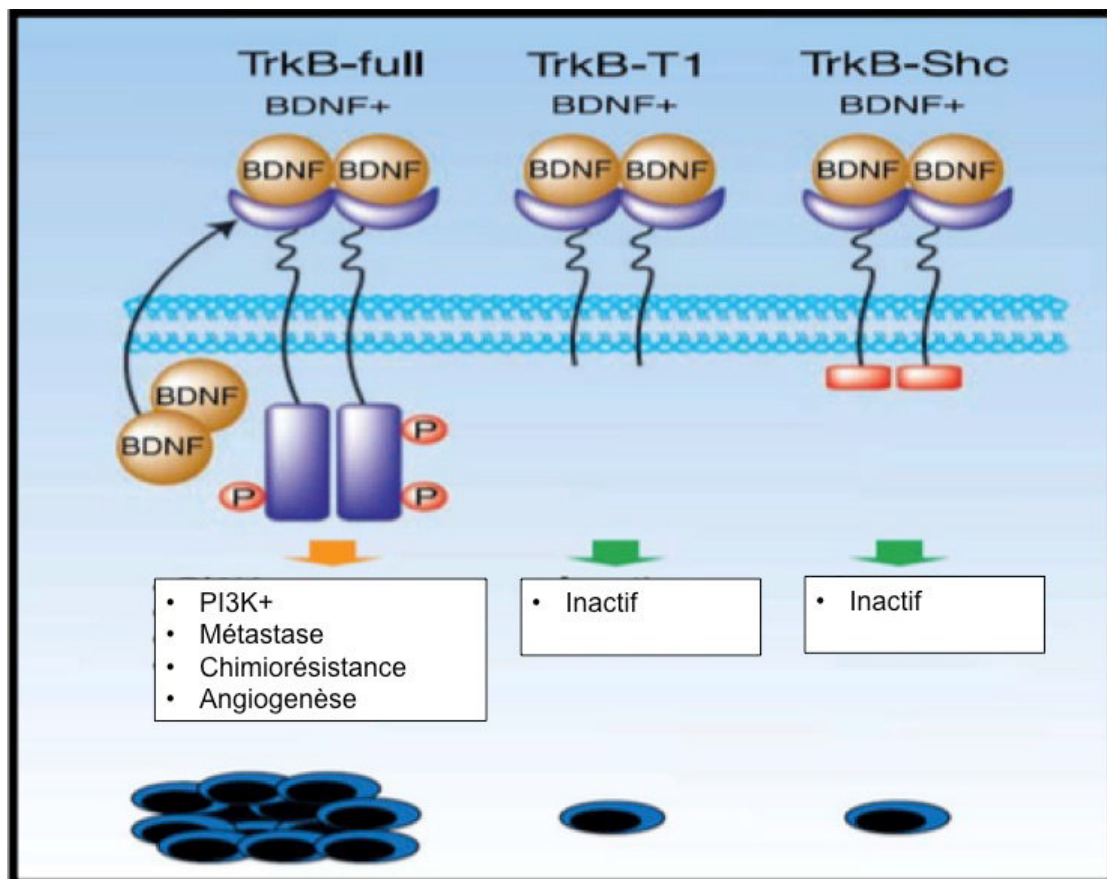


Figure 16 : Principales isoformes issues de l'épissage alternatif du transcrit du gène de TrkB (NTRK2).

D'après (Brodeur et al., 2009). Les trois isoformes de TrkB lient le BDNF cependant seule l'activation de l'isoforme TrkB-FL induit l'angiogenèse, les métastases et la chimiorésistance, les deux autres isoformes étant inactifs.

- TrkC

TrkC présente chez l'homme 4 isoformes issus de l'épissage alternatif présentant pour certaines des séquences d'insertion (Figure 17). En effet, pour l'un des variants, une insertion de 14 acides aminés située dans le domaine protéine kinase modifie la reconnaissance par le substrat et de ce fait altère la réponse cellulaire (Tsoulfas et al., 1996). Il existe aussi une forme non-catalytique du récepteur TrkC humain dépourvue du domaine consensus tyrosine kinase et qui est remplacé par un domaine intracellulaire de 83 acides aminés (Shelton et al., 1995). Les animaux portant une invalidation de ce TrkC (Knock-out, KO) ont un développement postnatal normal. Cependant, peu après la naissance, ces animaux présentent des modifications posturales qui reflètent un défaut de la proprioception, dues à une

perte de certains neurones des ganglions des racines dorsales, ainsi que des défauts cardiaques. Ce récepteur pourrait avoir un effet inhibiteur type dominant négatif (Palko et al., 1999).

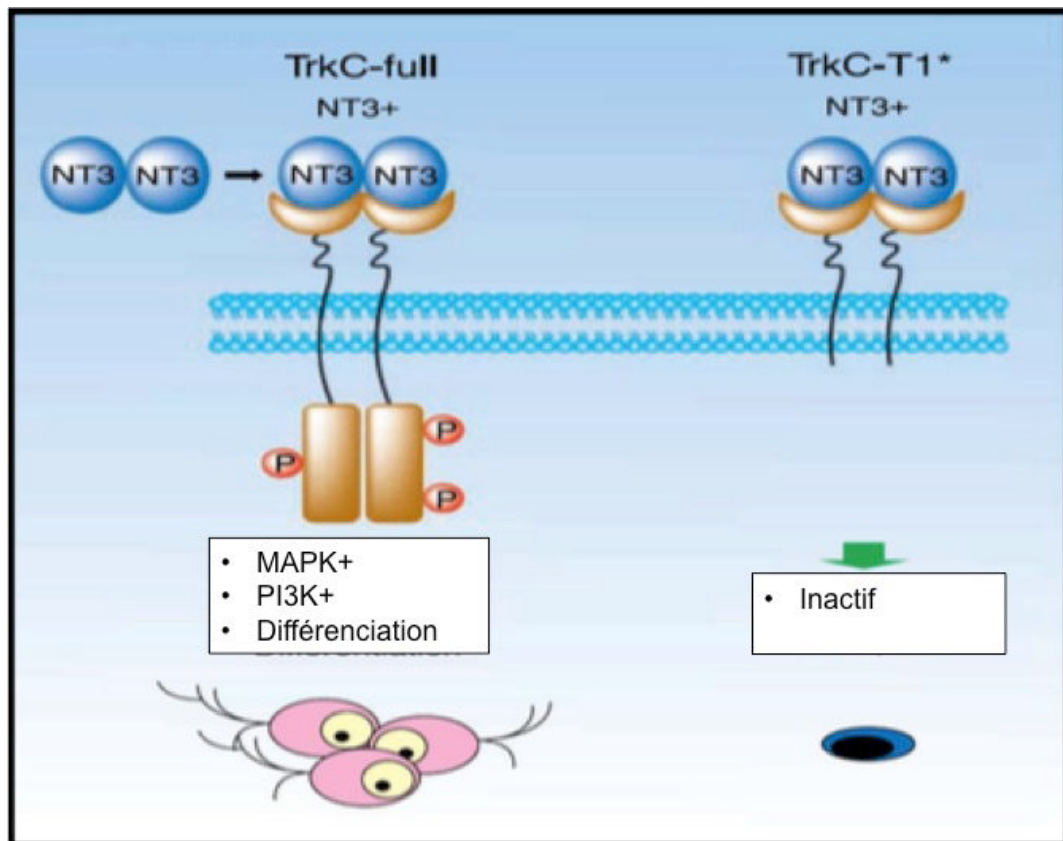


Figure 17 : Principales isoformes issues de l'épissage alternatif du transcrit du gène de TrkC (*NTRK3*).

D'après (Brodeur et al., 2009). La forme complète TrkC-FL possède une partie intracellulaire dotée d'un domaine Tyrosine Kinase, capable d'activer les voies PI3K en faveur de la survie et de la différenciation cellulaire. Plusieurs isoformes tronquées sont connues ; l'isoforme TrkC-T1 reste la forme majoritaire, tronquée de sa partie intracellulaire contenant le domaine Tyrosine Kinase, et jouerait un rôle de dominant négatif. (* : Isoforme majoritaire des TrkC tronqués).

➤ Voies de signalisation induites par les neurotrophines

L'interaction des neurotrophines et de leur récepteur se fait par l'intermédiaire de 2 régions spécifiques appelées «conserved patch» qui constitue un motif de liaison conservé pour tous les membres de la famille et « specificity patch » qui est plutôt un motif spécifique à chaque NT (Wiesmann et al., 1999).

Différentes voies peuvent être activées par les récepteurs Trk. Il s'agit principalement de voies activatrices de la survie et prolifération cellulaire (Huang and Reichardt, 2003; Reichardt, 2006) (Figure 18);

- la voie des Ras-MAP kinases (mitogen-activated protein Kinases) incluant les ERK (extracellular signal-regulated) kinases
- la voie de la (PI3K)-Akt
- la voie de la Phospholipase C (PLC)- γ

La transmission du signal déclenchée par l'activation du domaine catalytique tyrosine kinase a été beaucoup étudié pour le récepteur TrkA et le NGF (Kaplan and Stephens, 1994). De plus, la plupart des études concernant l'activation des voies de signalisation dépendantes des Trk ont été réalisées sur une lignée de fibroblaste embryonnaire de souris NIH3T3 et la lignée PC12.

- La voie Ras/MAPK/ERK

La fixation du ligand sur le récepteur entraîne, après homo- et/ou hétérodimérisation, l'activation de ce dernier par phosphorylation de la tyrosine 490. La fixation de la protéine Shc *via* son domaine PTB sur la tyrosine 490 phosphorylée de Trk induit sa phosphorylation, puis, le recrutement de la protéine adaptatrice (Rozakis-Adcock et al., 1992). Les domaines SH3 (domaine d'homologie à Src) de Grb2 interagissent avec la protéine SOS, un facteur activateur de la petite protéine G Ras (Margolis and Skolnik, 1994). En effet, l'échange de GDP en GTP par SOS active Ras qui à son tour active la kinase Raf. La cascade de phosphorylation des MAPK peut alors avoir lieu, avec les phosphorylations de MEK1/2 puis Erk1/2 et de p38 (Loeb et al., 1992; Moodie et al., 1993). De façon similaire à shc, la protéine FRS2 se fixe *via* son domaine SH2 à la Y490 et est phosphorylée par le Trk activé (Kao et al., 2001). FRS2 recrute les protéines adaptatrices Grb2 (Figure 18).

La phosphorylation de ERK1/2 va conduire à l'activation et à la translocation dans le noyau de facteurs de transcription comme CREB (cAMP Response Element Binding) ou Elk-1 (membre de la famille ETS) qui vont pouvoir activer la transcription de gènes essentiels pour la différenciation neuronale (Reichardt, 2006).

- La voie PI3K/AKT

La voie de la PI3K peut être activée soit par RAS, soit dans les PC-12 par l'intermédiaire de la protéine GAB qui est recrutée par le complexe shc-Grb2 après activation du récepteur par son ligand (Holgado-Madruga et al., 1997). Dans une culture de neurones corticaux, l'activation du récepteur TrkB par le BDNF permet la phosphorylation de IRS1 (Insulin-Receptor Substrate) et le recrutement et l'activation de la PI3K. La PI3K participe à la formation du phosphatidyl inositol 3,4-bisphosphate (PI3,4,5)P3 qui recrute la sérine/thréonine kinase AKT à proximité de la membrane plasmique, où elle est alors phosphorylée et activée par la PDK1 (*phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1*). AKT permet de réguler la survie neuronale (Dudek et al., 1997). D'autre part, AKT est un proto-oncogène, qui a de nombreuses cibles protéiques et qui peut agir soit directement sur la transcription génique ou soit sur les protéines impliquées dans la cascade apoptotique (Patapoutian and Reichardt, 2001) (Figure 18).

- La voie de la PLC- γ

L'activation des récepteurs TrkA par le NGF peut aussi induire la fixation de la PLC- γ sur la tyrosine phosphorylée Y785 ou au niveau de sites équivalents sur TrkB et TrkC. L'activation de la PLC- γ entraîne l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate en l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et en diacylglycerol (DAG) (Obermeier et al., 1993a, 1993b). L'IP3 provoque le relargage du calcium, ce qui entraîne une augmentation de sa concentration intracellulaire (Berninger et al., 1993) et qui active les enzymes dépendante du calcium telles que la calmoduline et la protéine kinase C (PKC) alors que le DAG stimule les différents isoformes de la PKC (Figure 18) (Corbit et al., 1999). Cette voie module la plasticité synaptique neuronale et la croissance des neurites.

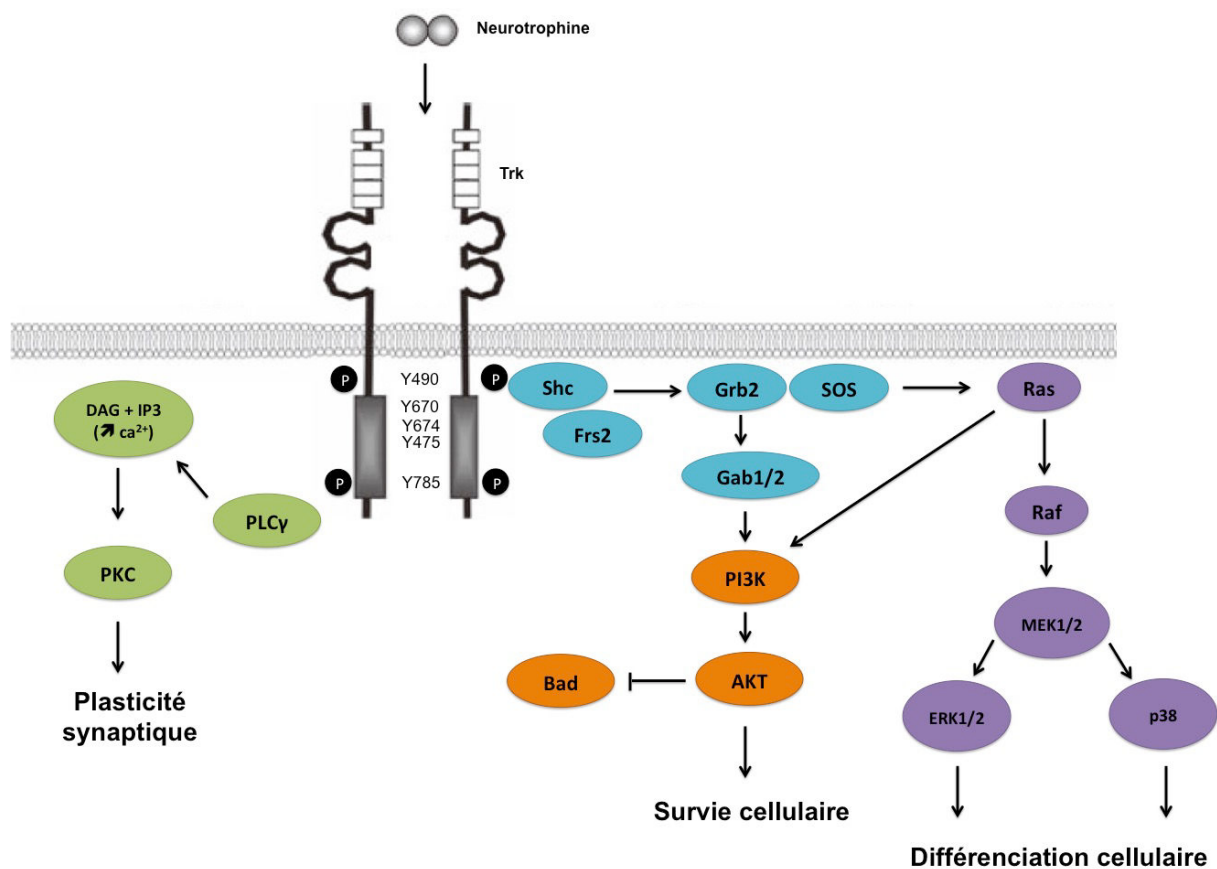


Figure 18 : Voies de signalisation des Trk.

D'après (Brodeur et al., 2009)). La fixation des neurotrophines sur leur récepteur tyrosine kinase les active par dimérisations et phosphorylation des tyrosines Y490, Y670, Y674, Y675 et Y785 (nomenclature des tyrosines de TrkA). Les tyrosines phosphorylées, recrutent des adaptateurs et activent les voies de signalisation Ras / Raf / MAPK, PI3 kinase / AKT et PLCγ (Phospholipase C γ). Shc : Src homology-2 containing protein ; Grb-2 : Growth factor receptor-bound protein ; GAB 1/2 :GrB2 Associated Binding Protein 1/2; FRS2: Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2; SOS : Son Of Sevenless ; Ras : Ras GTPase activating protein ; Raf : Raf kinase; ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinase ; MEK : MAP ERK Kinase ; PKC : Protein Kinase C ; DAG : Diacylglycerol ; PI3K : Phosphatidyl Inositol Tri-Phosphate Kinase P38 : P38 MAP Kinase.

I.2.2. Le récepteurs p75^{NTR}

➤ Découverte de p75^{NTR}

En 1973, un récepteur capable de lier le NGF est découvert et est appelé NGFR (NGR receptor) (Herrup and Shooter, 1973). Il est cloné en 1986 et est appelé low affinity NGF receptor car il lie le NGF avec une faible affinité (Johnson and Taniuchi, 1987). Puis, ce récepteur prend le nom de P75^{NTR} pour Neurotrophin Receptor p75 puisqu'il est capable de lier toutes les NTs, avec la même affinité ($K_d=10^{-9}M$) et ce quel que soit le type cellulaire (Rodriguez-Tébar et al., 1990; Rodríguez-Tébar et al., 1992).

➤ Le récepteur p75^{NTR} : gène et protéine

Le gène du récepteur p75^{NTR} contient 6 exons et est localisé sur le chromosome 17. La protéine p75^{NTR} est constituée, après clivage de son peptide signal, de 399 acides aminés et comprend un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire (Figure 19). Son domaine extracellulaire possède des sites de N- et O-glycosylations qui lui confère une masse moléculaire de 45 à 75 kDa. De plus, la présence dans le domaine extracellulaire de quatre régions riches en cystéine et dans la région cytoplasmique, un domaine de mort DD (Death Domain) permet d'inclure le P75^{NTR} dans la superfamille des récepteurs du TNF (tumor necrosis factor) (Chapman, 1995). Son domaine extracellulaire est impliqué à la fois dans la fixation du ligand et dans la dimérisation du récepteur. Le court domaine intracellulaire est dépourvu d'activité enzymatique, est très conservé entre les espèces et possède un site de palmitoylation (Barker et al., 1994) et des résidus sérine et thréonine susceptibles d'être phosphorylés (Taniuchi et al., 1986). Ces modifications post-traductionnelles pourraient être impliquées dans l'interaction protéine-protéine, dans la maturation et la localisation de la protéine au niveau des rafts lipidiques, dans l'endocytose et le transport vésiculaire ou dans la régulation de la signalisation de p75^{NTR} (Bronfman and Fainzilber, 2004).

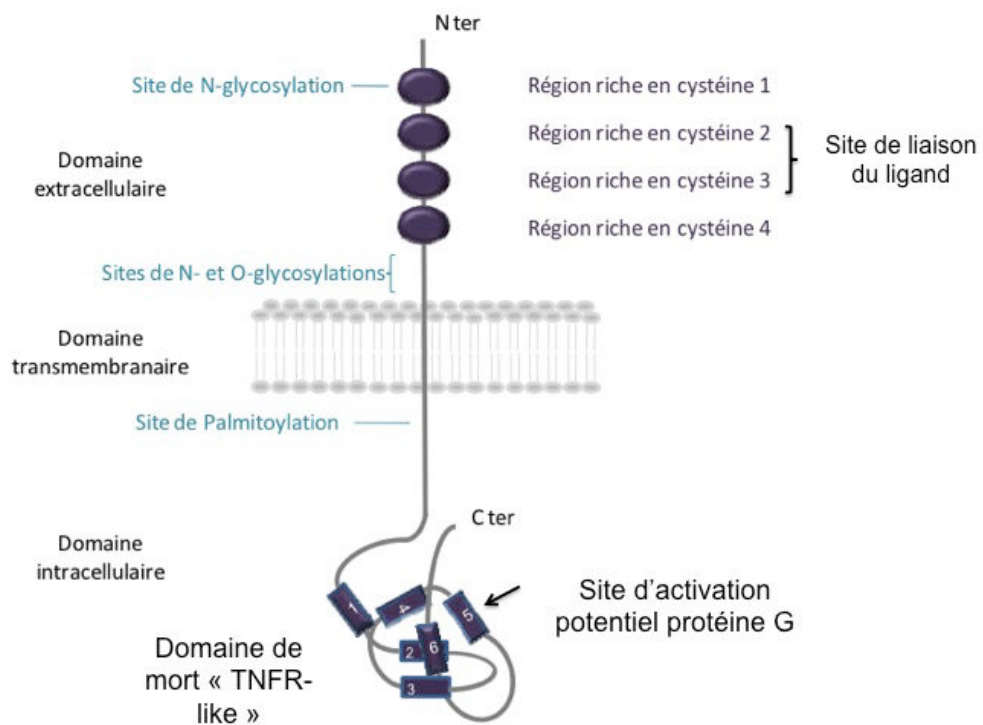


Figure 19 : Structure du récepteur des neurotrophines p75^{NTR}.

D'après (Roux and Barker, 2002) La partie extracellulaire est composée de 4 domaines riches en cystéines permettant la liaison des neurotrophines matures et des pro-neurotrophines, comportant plusieurs sites de O- et de N- glycosylation. La partie intracellulaire comporte un domaine de mort ainsi qu'un domaine d'activation des protéines-G.

L'épissage alternatif de ce gène donne lieu à plusieurs isoformes (Dechant and Barde, 1997); cependant ces variants tronqués peuvent aussi être le produit d'une protéolyse (Figure 20). En effet, le clivage du p75^{NTR} par une protéase permet de produire un fragment extracellulaire composé des 4 régions riches en cystéines, appelé p75-ECD (Extracellular Cell Death Domain) capable de lier les NTs et un fragment C-terminal P75-CTF (carboxiterminal fragment) qui pourra subir un second clivage, via l'action d'un complexe γ -sécrétase, qui génère un fragment intracellulaire appelé p75-ICD (Intracellular Domain) pouvant induire une signalisation (Bronfman, 2007).

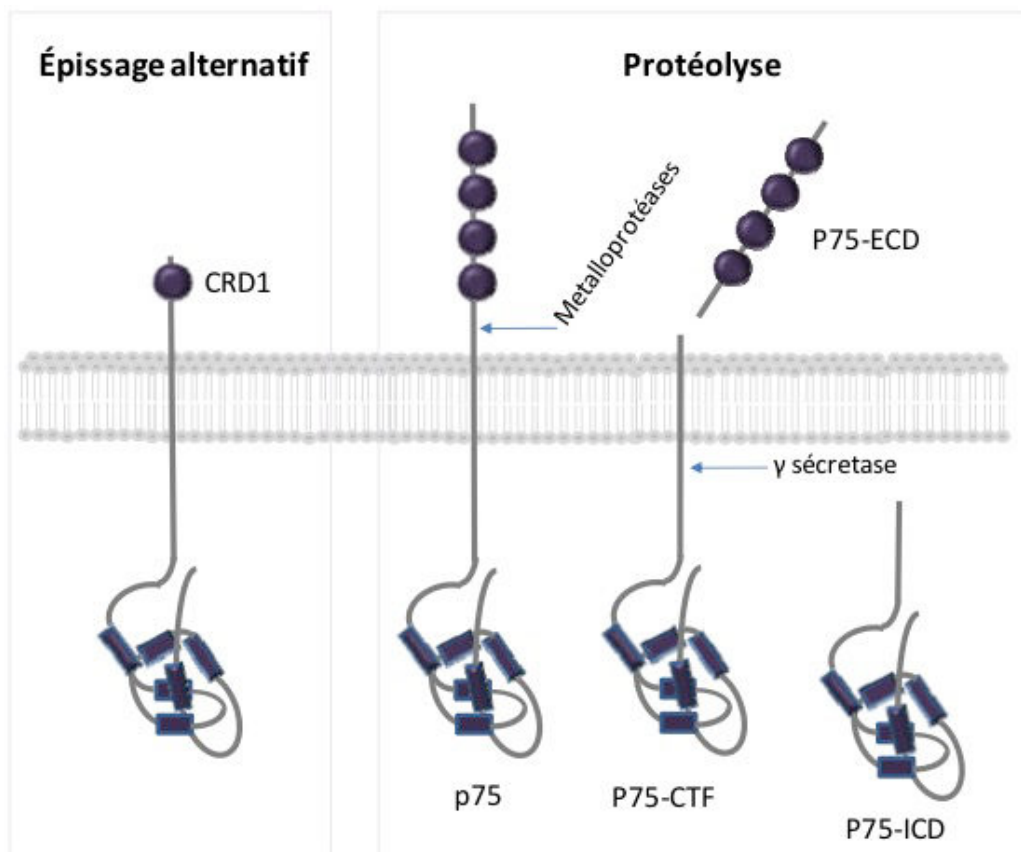


Figure 20 : Les différentes formes du récepteur p75^{NTR}.

D'après (Roux and Barker, 2002). Les formes de p75^{NTR} sont générées par épissage alternatif ou protéolyse. p75-ECD (Extracellular Domain), p75-CTF (C Terminal Fragment), p75-ICD (Intracellular Domain).

➤ Signalisation induite par le récepteur p75^{NTR}

De nombreux rôles sont attribués au récepteur p75^{NTR} à la suite de son activation. Comme les autres membres de la famille des récepteurs au TNF, il ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque et sa signalisation est donc possible grâce à des protéines adaptatrices intracellulaires. Celle-ci induisent majoritairement 2 voies de signalisation antagonistes selon le contexte cellulaire: la survie et la mort cellulaire (Figure 21). Par ailleurs, contrairement à d'autres récepteurs de mort, p75^{NTR} ne nécessite pas de molécules adaptatrices pro-apoptotiques comme FADD (Fas-associated death domain) ou TRADD (TNFR-associated death domain) pour induire l'apoptose dans les cellules neuronales (Wang et al., 2000). Cependant, dans le

cancer du sein, l'interaction entre $p75^{\text{NTR}}$ et TRADD est nécessaire pour activer NF κ B, qui induire l'effet anti-apoptotique du NGF (El Yazidi-Belkoura et al., 2003).

- Les voies apoptotiques

Concernant l'induction de la mort cellulaire programmée ou apoptose, la fixation du NGF sur le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ peut permettre l'activation de certains membres de la famille des caspases, comme les caspases 1, 2 et 3. C'est par exemple le cas au niveau des oligodendrocytes (Gu et al., 1999). La cascade des JNK joue aussi un rôle important dans le déclenchement de la mort cellulaire programmée (Figure 21). Le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ peut, suite à la fixation du NGF, entraîner l'activation de ces kinases dans les neurones sympathiques (Casaccia-Bonnet et al., 1996). La kinase JNK phosphoryle c-jun, active p53 et la voie apoptotique mitochondriale en activant les membres de la famille « BH3-domain only » Bad et Bim, la translocation mitochondriale de Bax, et la libération de cytochrome c qui stimule à son tour les caspases 9, 6 et 3 (Nykjaer et al., 2005). En amont, la petite protéine G Rac est un activateur établi de JNK, cependant elle ne peut se lier directement au récepteur $p75^{\text{NTR}}$ et requiert des adaptateurs cytosoliques. Le lien entre les adaptateurs directs de la queue intracellulaire de $p75^{\text{NTR}}$ et de Rac reste à démontrer, néanmoins certains des adaptateurs ont été montrés pour initier la mort cellulaire. NRIF, NADE, NRAGE, Sc-1 et les TRAFs ont, seuls ou en combinaison, été décrits pour initier l'apoptose dépendante de $p75^{\text{NTR}}$.

Une voie annexe impliquant les céramides a également été décrite pour son action dans l'apoptose dépendante de $p75^{\text{NTR}}$.

L'interaction de $p75^{\text{NTR}}$ avec un co-récepteur des neurotrophines, la sortiline forme un complexe capable de lier des pro-NTs et d'induire la mort cellulaire (Nykjaer and Willnow, 2012) (Voir chapitre sortiline).

Enfin $p75^{\text{NTR}}$ modifie l'activité de la protéine p53. P53 est une protéine dite suppresseur de tumeurs impliquée dans la mort cellulaire, particulièrement après lésions de l'ADN ou stress cellulaires. Ainsi, l'activation du récepteur $p75^{\text{NTR}}$ par du BDNF conduit à une augmentation de la quantité de protéine p53 dans les neurones sympathiques et à l'induction de la mort des cellules (Aloyz et al., 1998). Ce

phénomène pourrait être activé suite à sa phosphorylation par les JNK.

- Les voies de survie

D'autres études ont montré que le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ pouvait faciliter la survie ou la différenciation cellulaire plutôt que l'apoptose et toujours, indépendamment ou en association avec les Trks.

En effet, dans certaines cellules tumorales (Schwannome vestibulaire) ou non-néoplasiques (cellules de Schwann) quand le récepteur $p75^{\text{NTR}}$ est activé, le facteur de transcription NF- κ B est transloqué dans le noyau. Ce facteur de transcription régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la survie cellulaire (Ahmad et al., 2014). Cette voie de signalisation est activée par le NGF, mais pas par le BDNF ni la NT-3 (Carter et al., 1996), et nécessite plusieurs protéines parmi lesquelles on trouve TRAF-6, p62, IRAK, et RIP2 (Figure 21).

$p75^{\text{NTR}}$ module également une GTPase RhoA, membre de la famille des protéines Rho qui contrôlent l'organisation du cytosquelette d'actine. Dans les neurones, en l'absence de NTs, $p75^{\text{NTR}}$ interagit avec RhoA et l'active pour inhiber la croissance axonale. Cette inhibition est contrôlée par l'association de $p75^{\text{NTR}}$ à d'autres acteurs, le récepteur Nogo-R, et la protéine transmembranaire Lingo-1 (*LRR and Ig-domain-containing Nogo-receptor interacting protein-1*). En revanche, la liaison de NTs provoque la dissociation de RhoA et $p75^{\text{NTR}}$, bloquant ainsi l'activité de RhoA et favorisant la croissance axonale (Figure 21).

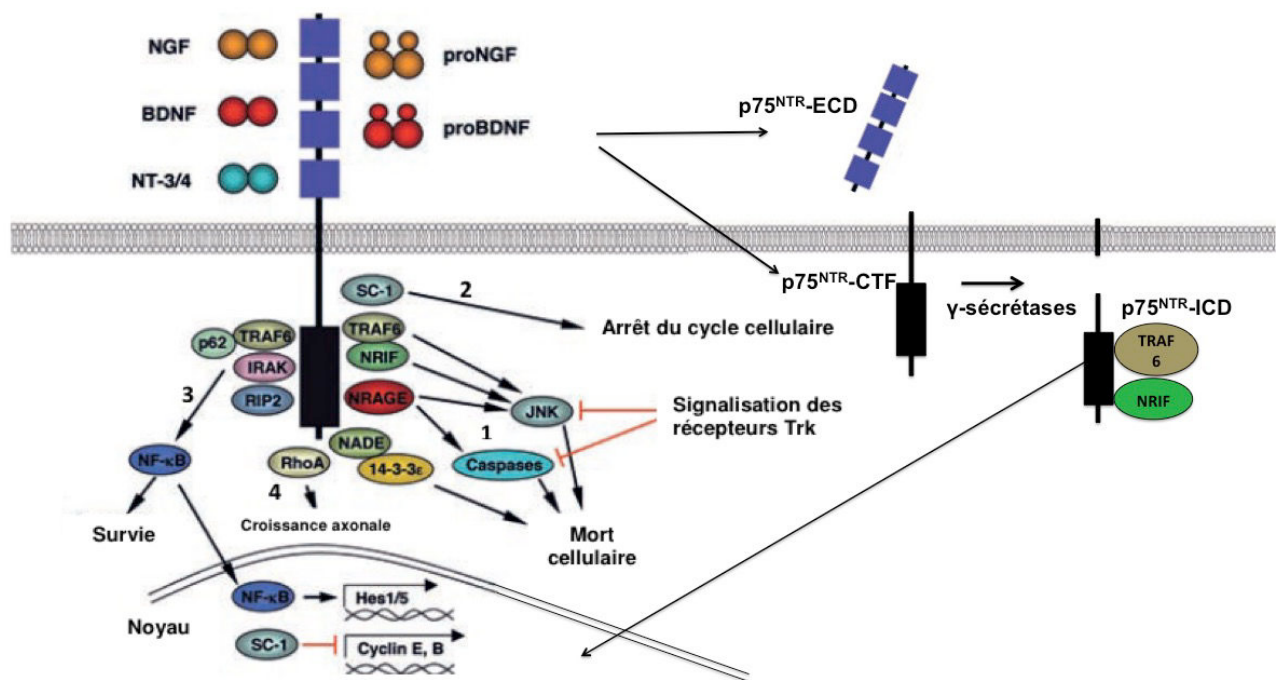


Figure 21 : Voies de signalisation du récepteur p75^{NTR}.

D'après (Arévalo and Wu, 2006). La liaison des NTs matures ou des pro-NTs induit l'activation de différentes voies de signalisation. Elles peuvent conduire vers l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, la survie cellulaire ou la croissance axonale. 1 : Les protéines adaptatrices NRAGE et NRIF induisent l'activation de la signalisation JNK, puis la phosphorylation des facteurs pro-apoptotiques Bim, Bid, Bax et p53 stimulant la libération de cytochrome c à partir des mitochondries, et ainsi l'activation des caspases -9,-6 et -3 qui conduit à l'apoptose. 2 : L'activation de SC-1 mène vers l'arrêt du cycle cellulaire. 3 : Le NGF induit la l'activation de NFκB par l'intermédiaire de protéines adaptatrices comme TRAF-6, p62, IRAK, et RIP2. 4 : en l'absence de NTs, p75^{NTR} active RhoA pour inhiber la croissance axonale. En revanche, la liaison de NTs provoque la dissociation de RhoA et p75^{NTR}, bloquant ainsi l'activité de RhoA et favorisant la croissance axonale. Le clivage de p75^{NTR} par des métalloprotéases et par des α- et γ- sécrétases entraîne sa translocation dans le noyau, induisant une mort cellulaire. Cyto-c : cytochrome c ; IRAK : interleukine-1-receptor-associated kinase; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase; JNK: c-Jun N-Terminal Kinase ; NRIF: Neurotrophin-Receptor Interacting Factor ; NADE: Neurotrophin-Associated Cell Death Executor ; NRAGE : Neurotrophin-Receptor-Interacting MAGE Homolog; NFκB : Nuclear Factor-kappa B; RIP2 : receptor-interacting protein-2 ; SC-1: Schwann cell factor-1; TRAF6: TNF Receptor-Associated Factor 6.

D'autre part, le récepteur p75^{NTR} peut aussi activer la voie PI-3 kinase/Akt. L'activation de cette voie, est importante pour induire la survie cellulaire de façon

indépendante ou dépendante des Trk (Roux et al., 2001).

Ainsi, l'interaction p75^{NTR}-Trk permet la liaison des NTs et induit la survie cellulaire neuronale, tandis que l'interaction p75^{NTR}-sortiline permet la liaison des pro-neurotrophines et induit la mort cellulaire (Nykjaer and Willnow, 2012) (voir chapitre sortiline).

Parallèlement à ses fonctions d'activateur soit de mort, soit de survie cellulaire, le récepteur p75^{NTR} agit aussi sur le transport axonal des NTs et des Trks. En effet, il existe des mouvements incessants de matériel depuis le corps cellulaire du neurone jusqu'à sa terminaison axonale (transport axonal antérograde) et inversement (transport rétrograde). Le transport axonal est donc vital pour le fonctionnement du système nerveux. Il a été montré que p75^{NTR} jouait un rôle dans l'internalisation et le transport rétrograde du NGF, du BDNF et de la NT-3 (Curtis et al., 1995).

➤ Signalisations induites par l'interaction P75^{NTR}-Trk

Les récepteurs Trk, longtemps considérés comme les récepteurs de haute affinité des neurotrophines, sont aujourd'hui décrits pour avoir une affinité pour les neurotrophines similaire à celle de p75^{NTR} ($K_d=10^{-9}M$) lorsque les récepteurs sont exprimés séparément. Cependant lorsqu'ils sont coexprimés, p75^{NTR} améliore l'affinité ($K_d=10^{-11}M$) et la sélectivité des ligands aux Trk ce qui permet une meilleure réponse des récepteurs Trk aux neurotrophines (Hempstead et al., 1991). Ce site de liaison de haute affinité pour le NGF (Hempstead et al., 1991) disparaît lors de mutations dans les domaines cytoplasmiques ou transmembranaires de l'un des deux récepteurs (Esposito et al., 2001). Le complexe TrkA- p75^{NTR} est alors activé par le NGF et non par la NT-3, et de façon semblable, TrkB- p75^{NTR} répond au BDNF mais moins à la NT-4/5 et peu à la NT-3.

L'association physique des récepteurs donnant lieu au complexe Trk-p75^{NTR} est encore sujette à controverse. Certains travaux basés sur des expériences de co-immunoprécipitation montrent des interactions directes entre les récepteurs TrkA, TrkB, TrkC et p75^{NTR} (Bibel et al., 1999).

Les domaines transmembranaires et cytoplasmiques de TrkA et de p75^{NTR} seraient responsables de la formation des sites de haute affinité et p75^{NTR} serait en effet

capable d'altérer la conformation de TrkA pour générer un site de haute affinité pour le NGF (Esposito et al., 2001).

Des protéines sont connues pour lier à la fois p75^{NTR} et Trk lors de leur association physique. Parmi ces protéines, on retrouve la protéine ARMS (Arévalo et al., 2004; Roux and Barker, 2002), la cavéoline qui est impliquée dans la formation de plateforme de signalisation au niveau de la membrane plasmique (Bilderback et al., 1999), FAIM (Fas Apoptosis Inhibitor Molecule). De la protéine p62 du complexe p62-TRAF6-IRAK est essentielle pour l'association des 2 récepteurs, TRAF6 assurant la liaison à p75^{NTR} et p62 à TrkA (Wooten et al., 2001).

A l'inverse d'autres travaux proposent une convergence des voies de signalisation des 2 récepteurs plutôt que des interactions directes de leurs domaines extracellulaires (Wehrman et al., 2007).

Enfin l'action de p75^{NTR} peut être modulée par son association à un co-récepteur appelé la sortiline. Ce complexe p75^{NTR} /sortiline fixe avec une grande affinité les pro-NTs et induit le plus souvent un signal pro-apoptotique (Nykjaer and Willnow, 2012) (Figure 22). Ainsi p75^{NTR} agit comme un récepteur dont la signalisation est dépendante du ligand et du co-récepteur auxquels il est associé. Il présente donc une dualité fonctionnelle et permet d'induire tantôt une signalisation pro-apoptotique, tantôt une signalisation de survie (Nykjaer et al., 2005; 2012).

I.2.3. La sortiline

➤ Découverte et structure protéique

La sortiline/NTR3 (gp95) est une glycoprotéine membranaire d'environ 95 kDa avec un seul domaine transmembranaire. Elle fait partie dans la famille des récepteurs à domaine Vps10p et est retrouvée exprimée dans différents tissus tels que le cerveau ou les muscles (Zsürger et al., 1994). La sortiline est synthétisée sous la forme de précurseur puis convertie en protéine mature, par l'action de la furine, au niveau des compartiments golgiens tardifs (Munck Petersen et al., 1999). Du fait de la petite taille de sa queue carboxyterminale cytoplasmique, ne peut transmettre seule un signal intracellulaire. En effet, cette protéine est capable de s'associer avec de

multiples partenaires et de servir de co-récepteur. En 1997, son association avec la RAP (receptor associated protein), de 40 kDa a permis la purification et le clonage du gène codant pour la sortiline (Petersen et al., 1997). Puis en 1998, le récepteur de la neurotensine (NT) est purifiée par chromatographie d'affinité, il est nommé NTR3 et s'avère être identique à la sortiline (Mazella et al., 1998). Plus récemment, il a été démontré que la sortiline était capable de lier et d'internaliser la lipoprotéine lipase (LpL), une protéine de 50 kDa (Nielsen et al., 1999). L'une de ses principales fonctions est le transport de neurotrophines : elle est capable en effet de lier et de transporter les neurotrophines matures mais aussi les pro-neurotrophines (Nykjaer and Willnow, 2012).

➤ Rôles de la sortiline

La sortiline est impliquée dans une multitude de pathologies humaines et neurologiques (Wilson et al., 2014a). Les effets pro-apoptotiques du proNGF passent par une interaction directe entre le $p75^{\text{NTR}}$ et la sortiline (Nykjaer et al., 2004). La sortiline apparaît clairement comme le co-récepteur du $p75^{\text{NTR}}$ et induit une action pro-apoptotique activée par le proNGF alors que l'association du NGF au complexe TrKA- $p75^{\text{NTR}}$ induit plutôt une signalisation de survie cellulaire (Nykjaer et al., 2005). Le NGF et son précurseur semblent capables de réguler l'équilibre mort/survie selon le complexe moléculaire auquel ils se lient. Comme pour le proNGF, en présence de sortiline, le pro-BDNF se lie avec une plus grande affinité à $p75^{\text{NTR}}$ qu'à TrkB (Teng et al., 2005). Par l'intermédiaire du complexe sortiline/ $p75^{\text{NTR}}$ le pro-NGF et le pro-BDNF, vont pouvoir induire l'apoptose (Nykjaer et al., 2004; Teng et al., 2005). En effet, des animaux portant une invalidation de la sortiline (Knock-out, KO) présente une diminution de l'apoptose neuronale (Jansen et al., 2007), suggérant l'implication du complexe proNT- $p75^{\text{NTR}}$ -sortiline dans la régulation de la viabilité neuronale.

Seul 10% de la sortiline exprimée par les cellules est présente à la membrane pour assurer le rôle de récepteur membranaire. Les 90% restants constituent le stock intracellulaire de sortiline situé dans l'appareil de Golgi. Parallèlement à sa fonction de co-récepteur membranaire la sortiline régule le trafic intracellulaire entre différents compartiments cellulaires. Elle a une fonction de protéine de transport notamment pour le transport des récepteurs aux neurotrophines (Trks) (Vaegter et al., 2011). Elle facilite l'adressage de nombreuses protéines vers différents compartiments

intracellulaires. La queue cytoplasmique de la sortiline interagit avec la protéine de tri cytosolique GGA2 (Golgi-localizing, γ -adaptin ear homology domain, ADP-ribosylation factor-binding protein), via le domaine VHS (Nielsen et al., 2001) et cette interaction permet à la sortiline de contribuer à l'adressage des SAP (sphingolipid activator proteins) dans les lysosomes (Lefrançois et al., 2003). Son implication dans le trafic intracellulaire est confirmée aussi en condition pathologique, puisque dans le cancer du poumon, la sortiline joue un rôle majeur dans la sécrétion des exosomes en agissant, de concert, avec deux récepteurs à tyrosine kinase, TrkB et l'EGFR (Wilson et al., 2014).

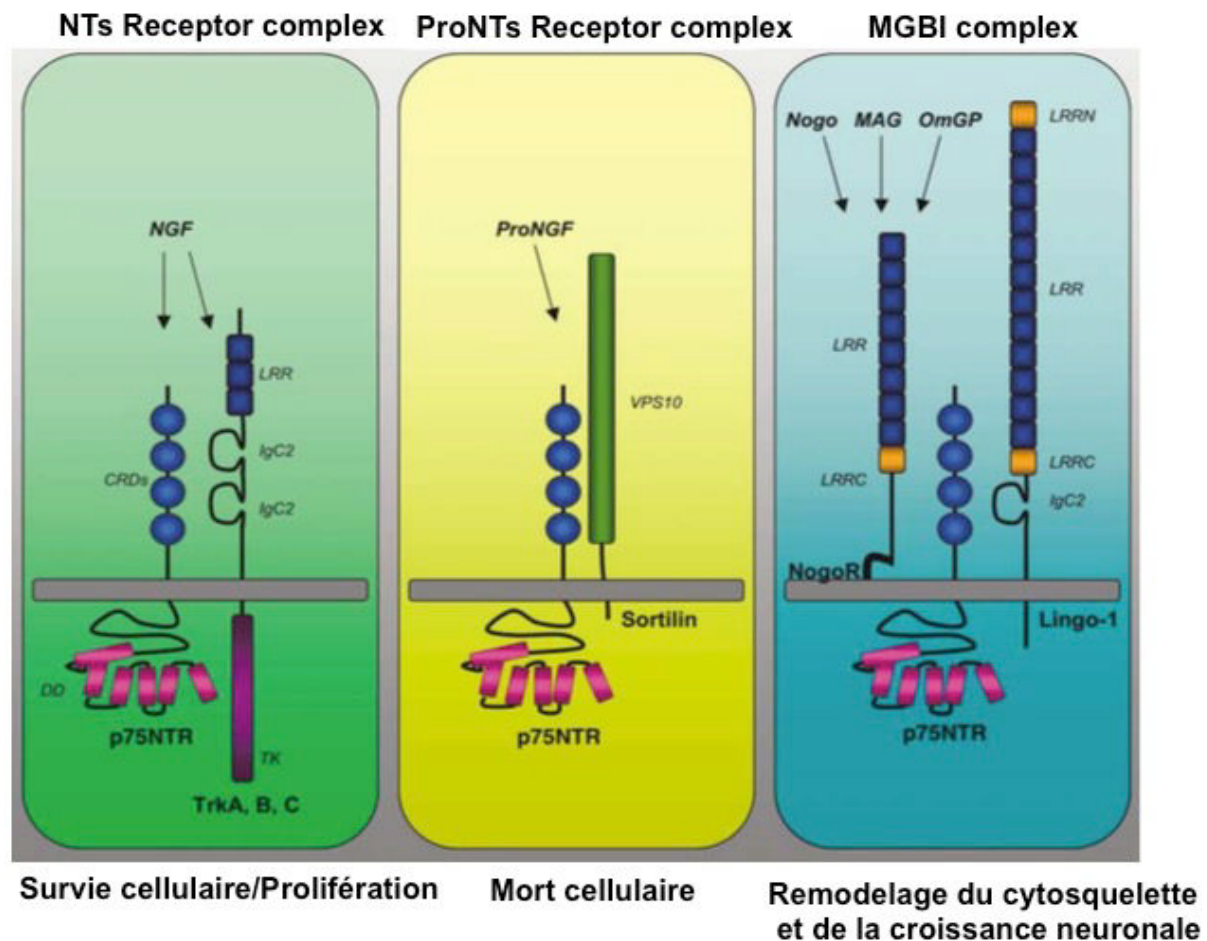


Figure 22 : Les différents co-récepteurs de p75^{NTR} et les conséquences de leur activation selon leurs ligands.

D'après (Barker, 2004). p75^{NTR} interagit avec les récepteurs Trk (TrkA, TrkB et TrkC) et augmente l'affinité et la spécificité du récepteur Trk à sa neurotrophine préférentielle, formant un complexe de récepteurs aux neurotrophines « *NTs Receptor complex* ». La liaison de la NT au récepteur Trk induit l'activation du domaine Tyrosine Kinase et l'activation d'un signal de survie et de prolifération cellulaire. La sortiline est capable de lier les neurotrophines sous leur forme immature (Pro-NT), formant un complexe de récepteurs aux pro-neurotrophines « *Pro-NT Receptor Complex* », grâce à la présence d'un domaine VPS10 (*Vacuolar protein sorting 10*). L'hétérodimérisation de p75^{NTR} avec la sortiline conduit à un signal délivré par l'interaction d'une pro-neurotrophine avec la sortiline, induisant un signal de mort cellulaire médié par le domaine de mort de p75^{NTR}. Finalement, p75^{NTR} peut également former un complexe MBGI « *MBGI-Complex* » (*Myelin-Based Growth Inhibitors Complex*) avec les récepteurs Nogo et Lingo-1. En réponse aux ligands Nogo, MAG et OMgp, on observe un recrutement de la Rho-GDI inhibitrice du remodelage du cytosquelette et de la croissance neuronale.

I.3. Rôles physiologiques et pathologiques des NTs

Les neurotrophines sont capables d'induire des réponses biologiques variées et parfois mêmes antagonistes telles que la mort ou la survie cellulaire, la différenciation, la plasticité synaptique.

I.3.1. Rôles des NTs dans le développement du système nerveux

La réalisation d'animaux transgéniques, porteurs d'inactivation des gènes codant pour les neurotrophines ou leurs récepteurs a permis d'établir le rôle et la sensibilité des populations neuronales aux différentes neurotrophines. Les résultats montrent que l'inactivation des gènes *Trk* entraîne de graves effets sur le développement du système nerveux et conduit à la disparition de populations neuronales. Les exemples suivants démontrent que la famille des récepteurs Trk a un rôle majeur dans les fonctions biologiques telles que la survie neuronale ou la croissance neuritique. Ainsi leur inactivation peut induire des déficits fonctionnels ou être létal pour les individus au cours de la période post-natale.

- Les souris chez lesquelles le gène *TrkA* est invalidé présentent des déficits sensoriels durant la première semaine post-natale. D'autre part, ces animaux sont viables à la naissance mais meurent environ un mois après (Smeyne et al., 1994). L'axe NGF/*TrkA* semble indispensable pour le développement du système nerveux central et périphérique.
- L'inactivation de *TrkB*, qui cible le domaine catalytique, est létale (Klein et al., 1993) dans la première semaine postnatale par suite d'une incapacité des nouveaux-nés de se nourrir et d'un important déficit de neurones sensoriels et moteurs dans le système nerveux central et périphérique.
- Seuls les animaux hétérozygotes survivent à un double KO des gènes codant pour NT-4/5 et BDNF. Les homozygotes meurent dans les 48 heures après la naissance, alors que les homozygotes porteurs d'une seule d'inactivation se développent jusqu'à l'âge adulte. Ces KO ont permis de montrer une dépendance de certaines populations neuronales à la NT-4/5 et au BDNF. Les souris présentent un déficit des neurones sensoriels mais pas des motoneurones (Ernfors et al., 1994; Liu et al., 1995). Par ailleurs le KO de la NT-4/5, seul, provoque des déficits au niveau des ganglions sensoriels mais

les animaux ont un développement adulte normal. Ils sont ainsi capables de se reproduire bien qu'ils présentent des anomalies de développement des ganglions sensoriels (Liu et al., 1995).

- Lorsque TrkC, et NT-3 sont inactivés, le développement postnatal reste normal mais, peu de temps après la naissance, les animaux présentent des mouvements anormaux associés à une posture incorrecte des membres postérieurs suggérant un défaut de la proprioception. Les souris montrent un déficit important en motoneurones qui innervent les muscles. L'axe NT-3/TrkC régule ainsi la survie et la prolifération des précurseurs neuronaux et les branchements collatéraux des axones avec leurs cibles (DiCicco-Bloom et al., 1993; Klein, 1994; Schnell et al., 1994).
- L'inactivation du gène codant pour $p75^{NTR}$ induit un phénotype moins dégénéré que pour les récepteurs Trk (Snider, 1994). Cependant ces souris présentent une diminution de l'innervation sensorielle et sympathique. Il est possible que l'absence de $p75^{NTR}$ soit compensée dans le cerveau par d'autres récepteurs tels que les formes non catalytiques de TrkB ou TrkC.

Les neurotrophines sont donc des facteurs de croissance actifs sur les neurones ou les cellules gliales dont ils contrôlent la croissance, la prolifération et la différenciation (Thoenen et al., 1987). Leurs principaux rôles physiologiques s'exercent à plusieurs niveaux : la croissance neuronale normale, le maintien des capacités de stimulation ou de réponse des neurones ainsi que l'inhibition de l'apoptose. Ces facteurs neurotrophiques ainsi que leurs récepteurs contrôlent le développement du système nerveux et sont essentiels au maintien des fonctions cérébrales ainsi qu'aux phénomènes de plasticité adaptative. La synthèse des neurotrophines et de leurs récepteurs ainsi que leur implication dans la survie et la prolifération cellulaire ne sont pas restreints au système nerveux. Ainsi, notre équipe a montré que le BDNF était impliqué dans la boucle de survie autocrine des lymphocytes B normaux (Fauchais et al., 2008). Cette fonction de survie a également été observée dans différentes pathologies ainsi que dans de nombreux cancers.

I.3.2. Neurotrophines et glioblastome

L'implication des neurotrophines dans les processus de cancérogenèse est largement documentée *via* des expressions dérégulées. En effet, elles participent à la tumorigenèse dans plusieurs cancers du système nerveux tels que le neuroblastome, le médulloblastome ou le GBM (Giraud et al., 2005, 2011; Wadhwa et al., 2003; Washiyama et al., 1996). Ces NTs, selon le récepteur impliqué, participent à différents mécanismes : angiogenèse, invasion tumorale, maintien du caractère « cellules souches » cancéreuses. Quelquefois elles peuvent représenter des facteurs de bon pronostics notamment dans le neuroblastome et le médulloblastome (Grotzer et al., 2000; Nakagawara et al., 1993).

➤ GBM et TrkA

Diverses études montrent que les récepteurs Trk sont exprimés dans les gliomes et que la liaison du NGF à TrkA est de bon pronostic (Hamel et al., 1993; Wadhwa et al., 2003; Wang et al., 1998). Il existe en effet une corrélation entre de l'expression de TrkA et le grade de malignité. Ainsi, dans les astrocytomes de bas grade l'expression de TrkA est significativement plus élevée que dans les glioblastomes (Wadhwa et al., 2003; Wang et al., 1998). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la voie NGF/TrkA favorise la transformation oncogénique vers le GBM. Le NGF induit une inhibition de la croissance et de la différenciation des cellules de gliomes humaines et murins, *in vitro* et *vivo* (Kimura et al., 2002; Kokunai et al., 1999; Pflug et al., 2001; Watanabe et al., 1999). D'autre part, le récepteur TrkA induit la mort cellulaire, *in vitro* dans une lignée de GBM humain, par induction d'un processus d'autophagie (Hansen et al., 2007).

Cependant, des études fonctionnelles de l'axe NGF/TrkA dans les gliomes révèlent des résultats contradictoires. Le NGF stimulerait en effet la prolifération des cellules de gliomes, via une activation du récepteur TrkA (Engebraaten et al., 1993; Oelmann et al., 1995; Singer et al., 1999).

➤ GBM et TrkB

Des analyses immunohistochimiques révèlent que le BDNF et son récepteur de haute affinité TrkB sont surexprimés dans les tissus de gliomes humains (Wadhwa et al., 2003; Xiong et al., 2015). Le BDNF mature ainsi que TrkB, *in vitro*, sont aussi fortement exprimés dans les cellules C6 de gliomes murins (Xiong et al., 2013a).

Concernant le GBM, une étude récente, montre l'importance de TrkB dans la survie des CSC (Lawn et al., 2015). En effet, des tissus humains issus de gliome malin ainsi que des CSC isolées de gliomes malins humains expriment le récepteur TrkB ainsi que son ligand le BDNF. L'activation spécifique de TrkB par le BDNF améliore la survie des CSC via l'activation des voies de signalisation Akt et ERK. Inversement, un KO ou une inhibition pharmacologique de TrkB diminue l'activation de ERK (qui est neurotrophine dépendante) et de ce fait diminue la croissance des CSC (Lawn et al., 2015). D'autre part, une inhibition de la croissance des CSC via l'utilisation d'inhibiteurs de l'EGFR peut être reversée grâce à la signalisation induite par les neurotrophines, ce qui suggère que cette signalisation suffirait à induire la croissance à long terme des CSC sous forme de sphères, en l'absence de FGF et d'EGF (Lawn et al., 2015). Ces données suggèrent que les Trks pourraient représenter une nouvelle cible thérapeutique des gliomes de haut grade.

➤ GBM and TrkC

Dans le GBM, l'expression de TrkC est corrélée à celle de TrkB et favorise la survie des CSC (Lawn et al., 2015). L'activation spécifique de TrkC par la NT3 améliore la survie des CSC via l'activation des voies de signalisation Akt et ERK. Inversement, un KO ou une inhibition pharmacologique de TrkC diminue l'activation de ERK et de ce fait diminue la croissance des CSC (Lawn et al., 2015).

Une grande partie des travaux publiés concernant le rôle de TrkC dans les tumeurs cérébrales portent majoritairement sur le médulloblastome et le neuroblastome.

En effet, TrkC est reconnu pour être un récepteur à dépendance c'est-à-dire qu'il peut transduire deux signalisation différentes en fonction de la disponibilité du ligand (Tauszig-Delamasure et al., 2007). En absence de son ligand NT-3, son clivage protéolytique entraîne le relargage d'un fragment pro-apoptotique qui va induire l'apoptose des cellules de neuroblastomes immortalisées via un mécanisme caspase 9 dépendant. A l'inverse, cette activité pro-apoptotique est inhibée en présence de NT-3 (Tauszig-Delamasure et al., 2007).

➤ GBM et p75^{NTR}

L'axe proBDNF / p75^{NTR} induit la mort cellulaire et inhibe la croissance et la migration

des cellules de gliome C6 *in vitro*, tandis que le BDNF mature induit l'effet inverse sur les cellules de gliome C6 suggérant ainsi le rôle essentiel du BDNF dans le développement des gliomes malins (Xiong et al., 2013a, 2013b).

D'autre part, la séquestration de p75^{NTR} dans l'appareil de Golgi participe à la résistance à l'apoptose des cellules favorisant la formation de tumeurs à partir de la lignée U87-MG de GBM humain (Giraud et al., 2011).

p75^{NTR} a été identifié dans le glioblastome comme un régulateur de l'invasion gliale (Johnston et al., 2007; Wang et al., 2015) et de la prolifération (Forsyth et al., 2014) des cellules souches cancéreuses.

Les CSC de gliomes, expriment les récepteurs aux neurotrophines (p75^{NTR}, TrkA, TrkB et TrkC) ainsi que leurs ligands (NGF, BDNF, et NT-3) et sécrètent du NGF. Une inhibition de p75^{NTR}, via l'utilisation de siRNA, diminue significativement la prolifération de ces cellules. Inversement, une stimulation avec du NGF exogène stimule leur prolifération via le clivage de p75^{NTR} par des α - et γ -secrétases libérant le domaine intracellulaire (ICD) (Forsyth et al., 2014). Ces résultats suggèrent que la protéolyse de p75^{NTR} est nécessaire pour la prolifération des CSC (Wang et al., 2008b). De plus, l'inhibition de la signalisation Trk bloque la prolifération des CSC, dépendante d'une stimulation du NGF et du clivage de p75^{NTR}, soulignant l'importance du rôle de la signalisation de Trk-p75^{NTR} dans les gliomes. Une autre étude montre que dans les CSC de gliomes issus de patient, p75^{NTR} interagit avec la protéine adaptatrice PDLIM1 (PDZ And LIM Domain 1) (Ahn et al., 2015). Une inhibition de PDLIM1 via l'utilisation de shRNA *in vitro* et *in vivo* bloque l'invasion médiée par le p75^{NTR} (Ahn et al., 2015). Ces données indiquent que l'invasion gliale médiée par p75^{NTR} nécessite une interaction avec la protéine PDLIM.

Objectifs

Objectifs de la thèse

Les glioblastomes (GBMs) sont des tumeurs d'origine astrocytaire particulièrement agressives. Malgré les thérapies existantes combinant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie, les GBMs restent à l'heure actuelle des tumeurs incurables avec une médiane de survie d'environ 15 mois (Kesari et al., 2008; Louis et al., 2007). L'échec des thérapies actuelles (chimio- et radiothérapies) est d'origine multifactorielle, et pourrait mettre en jeu des mécanismes de résistance dus à la présence de cellules souches cancéreuses (CSC) ou encore des changements du microenvironnement tumoral (Eramo et al., 2006).

La très grande hétérogénéité cellulaire du GBM contribue à l'agressivité tumorale. Les CSC représentent une petite sous-population cellulaire au sein de cette masse cellulaire tumorale très hétérogène dont les propriétés sont similaires à celles des cellules souches normales (Reya et al., 2001). Les données actuelles indiquent que les CSC seraient à l'origine des mécanismes de résistance et des récidives constatées dans le GBM. Ces mécanismes pourraient dépendre de leur capacité à communiquer et à contrôler leur microenvironnement via le relargage de nanovésicules ; les exosomes (Grange et al., 2011; Nakano et al., 2015). Ces exosomes sont capables de transférer des protéines oncogéniques telle que l'EGFR (Al-Nedawi et al., 2008), des ARNm et des microARN impliqués dans différents processus tels que l'angiogenèse (Kucharzewska et al., 2013), l'invasion tumorale et les métastases (Soung et al., 2015) ou la transformation oncogénique des cellules du stroma (de Vrij et al., 2015). Les exosomes transportent dans la circulation générale des marqueurs tumoraux qui pourraient permettre de détecter la présence de CSC chez les patients ou encore de cibler ces cellules en les utilisant comme vecteur thérapeutique afin de les éradiquer. Des travaux récents ont permis de démontrer que le variant tronquée de l'EGFR (EGFRvIII) était transporté par les exosomes issus de patients atteints de GBM et qu'il pouvait constituer un nouveau biomarqueur. Notre équipe s'intéresse à d'autres types de récepteurs oncogéniques, les récepteurs aux neurotrophines ainsi qu'aux fonctions de ces dernières dans la survie cellulaire tumorale.

L'intérêt de l'étude des neurotrophines et de leurs récepteurs s'explique par le fait qu'ils jouent un rôle crucial dans l'agressivité d'un grand nombre de cancers dont le

GBM. Les modifications d'expression des neurotrophines et de leur récepteur, au sein des cellules de GBM, influencent la prolifération ou l'invasion gliale (Johnston et al., 2007; Wang et al., 1998). Plus particulièrement, les récepteurs TrkB, TrkC ainsi que p75^{NTR}, régulent la prolifération et la survie des CSCs (Forsyth et al., 2014; Lawn et al., 2015).

Mon projet de thèse a donc porté sur l'étude de la fonction des neurotrophines et de leurs récepteurs dans le transfert d'agressivité au sein du GBM entre les CSCs, les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement. Ce transfert d'agressivité dépend de la sécrétion d'exosomes via ces cellules et permet de mieux comprendre la mise en place des mécanismes de résistance. Les neurotrophines et leurs récepteurs pourraient ainsi représenter de nouveaux biomarqueurs susceptibles d'être utilisés en tant qu'outils diagnostique ou pour leur valeur pronostique sur la réponse thérapeutique.

Pour répondre à notre objectif principal, ce travail de thèse s'articule autour de 3 axes:

Les récepteurs aux neurotrophines apparaissent comme un vecteur d'agressivité des CSC et pourraient constituer une cible thérapeutique majeure dans la résistance du GBM, c'est pourquoi;

- La **première** partie consiste à établir une corrélation entre le stade de différenciation des cellules de GBM, l'expression des neurotrophines et leur interaction avec le microenvironnement tumoral via les exosomes. Dans ce but, et compte tenu des travaux antérieurs du laboratoire, des lignées modifiées de GBM ont été développées afin de moduler l'agressivité et le stade de différenciation des cellules. Au sein de ces lignées, le niveau d'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs, au niveau cellulaire et au niveau exosomal, a été recherché. En parallèle, une analyse comparative, de l'expression de certains récepteurs aux neurotrophines, a été effectuée dans des exosomes issus de sérum de patients sains et atteints de GBM. Enfin, l'impact du transfert des récepteurs aux neurotrophines, au sein des exosomes, dans la modulation de l'agressivité des cellules réceptrices, a été évalué *in vitro* et *in vivo*.

En plus, du caractère tumorigène des exosomes de GBM, leur implication dans les mécanismes de radiorésistance a été recherchée. En effet, le GBM, de par sa forte radiorésistance, présente des récives locales après irradiation. La réponse thérapeutique semble largement influencée par des facteurs biologiques tumoraux intracellulaires et par le microenvironnement, c'est pourquoi ;

- La **deuxième** partie consiste à étudier l'implication des exosomes dans la radiorésistance des cellules de GBM. Pour évaluer la capacité des exosomes de GBM à protéger la tumeur des radiations ionisantes, l'état physiologique et les fonctions de cellules irradiées puis traitées avec des exosomes non irradiés ont été évaluées. Enfin, le rôle des récepteurs aux neurotrophines, via leur transfert par les exosomes, dans les mécanismes de radiorésistance a été recherché.

Une communication étroite et complexe entre les cellules souches cancéreuses et le microenvironnement de la tumeur (stroma tumoral), via les exosomes pourrait favoriser la tumorigenèse. Ainsi, appréhender les mécanismes et les acteurs intervenant dans cette communication semble essentiel pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, c'est pourquoi ;

- La **troisième** partie consiste à étudier l'impact des exosomes de GBM sur la modulation des cellules du microenvironnement. Dans le GBM, les mécanismes d'oncogenèse et d'inflammation peuvent conduire au recrutement de Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) au niveau du site tumoral. Etant donné le rôle clé de la sécrétion exosomale dans la communication entre les cellules tumorales et le microenvironnement, nous avons exploré la capacité des CSM à capter puis à intégrer l'information transmise par les exosomes tumoraux. Enfin, l'impact de ces exosomes de GBM sur le phénotype et la fonctionnalité des CSM a été étudié. En parallèle, l'influence d'un stress cellulaire, tel que la radiothérapie, sur l'information transmise par les exosomes de GBM aux CSM a été évaluée.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

I.4. Culture cellulaire

I.4.1. Lignées cellulaires

- Lignée cellulaire de glioblastome humain

Les cellules U87-MG sont des cellules de glioblastome humain (American Type Culture Collection : ATCC). Ces cellules sont cultivées dans du Minimum Essential Medium (MEM) avec sels de Earles (Gibco), supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF ; IDBio, France), 1.5 g/L de bicarbonate, 2 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate sodium, 1% d'acides aminés non essentiels, 50 UI/ml de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine (Gibco), ce qui correspond au milieu complet.

- Les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau ou HBMEC (Human Brain Microvascular Endothelial Cell)

Les HBMEC (Lonza) sont cultivées dans du milieu EBM (endothelial basal medium) supplémenté avec 5% de serum et en facteurs de croissance. Les HBMECs sont utilisées pour les expériences du passage 2 au passage 6.

- Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Les cellules souches mésenchymateuses humaines issues de moelle osseuse humaine (BM-MSC ; *Bone Marrow – Mesenchymal Stem Cells*) ont été préalablement isolées, phénotypées et mises en culture au laboratoire (cf annexes). Elles sont mises en culture dans du DMEM/F12 1 :1 (Gibco) supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate sodium, 1% d'acides aminés non essentiels, 20ng/mL de FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2* ; Miltenyi Biotec), 50 UI/ml de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine (Gibco).

- Culture primaire

Une extraction de cortex issus de rats Sprague Dawley nouveau-nés P1 à P3 (Janvier LABS, Saint Berthevin, France) est réalisé à l'aide d'une solution de Hank's Balance Salt Solution (HBSS, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Les cortex sont alors dissociés mécaniquement. Après centrifugation à 1300 rpm pendant 10 min, les surnageants sont éliminés et les cellules sont reprises dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) avec GlutaMAX™ et 4,5g/L de glucose (Invitrogen) supplémenté de 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF), 1% de pénicilline et streptomycine, 1% d'acides aminés non essentiels et 1% de pyruvate de sodium pour effectuer une culture primaire.

Pour visualiser l'internalisation des exosomes dans les différentes populations astrocytaires, des rats transgéniques dont les cellules expriment la protéine fluorescente verte (« green fluorescence protein » ou GFP) ont été utilisés (Japan SLC, Inc., Hamamatsu, Japon).

I.3.3. Entretien des cultures

Toutes les lignées sont incubées en normoxie (21 % d'O₂ et 5% de CO₂) à 37°C sous atmosphère humide.

Les cellules ont été cultivées dans des flasques de 75 cm² (Falcon) avec 10 ml de milieu complet. Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont rincées au PBS 1X (*Phosphate Buffer Saline*, Gibco) puis décollées à l'aide de 5 mL de Versène (Gibco) pour les lignées U87-MG et de 5 ml de trypsine-EDTA (Gibco) pour les CSM pendant 10 min à 37°C. Le Versène ou la trypsine sont inactivé par addition de milieu supplémenté en SVF. Les cellules sont centrifugées à 300 g pendant 5 à 10 min à température ambiante. Le surnageant est retiré et les cellules du culot sont comptées sur un hématocytomètre de Malassez et remises en culture en flasque de 75 cm² pour l'amplification et le maintien en culture ou dans des supports adéquats pour les expérimentations (cf : ensemencement des cellules pour les expérimentations).

- Culture des cellules en milieu défini

Les cellules U87-MG ont été cultivées en milieu défini dont la composition est présentée dans le tableau 2. Brièvement, après décollement et centrifugation des cellules, celles-ci sont réensemencées à une densité de 500000 cellules par flasque.

Après 4 jours de culture, les cellules organisées en neurosphères flottantes sont reprises et dissociées mécaniquement. 500000 cellules par flasques sont ensuite réensemencées afin d'obtenir des neurosphères secondaires qui seront utilisées lors des différentes expérimentations.

Composés	Fournisseurs	Concentration
DMEM / F12	Gibco	
Bicarbonate de sodium	Sigma Aldrich	1,2%
Glucose	Sigma Aldrich	0,6%
B27	Gibco	2%
HEPES	Sigma Aldrich	5 mM
Putrescine	Sigma Aldrich	9,6 mg/L
ITSS	Roche	10 mg/L
Progesterone	Sigma Aldrich	0,0629 mg/L
EGF	Sigma Aldrich	20 µg/L
bFGF	Sigma Aldrich	20 µg/L
Héparine	Sigma Aldrich	1,83 mg/L

Tableau 2 : Composition du milieu défini

- Irradiation cellulaire par curiethérapie

Lors des expériences d'irradiation, les cellules ont étéensemencées à 250000 cellules par puits dans des plaques 6 puits. Les cellules ont étéensemencées avec du milieu EFM.

Les plaques de 6 puits ont été irradiées à l'aide d'un prototype de contention permettant le passage d'une source haut débit d'iridium 192 au-dessus et au-dessous des puits de la plaque de culture. Ce prototype permet une homogénéisation de la dose au niveau des différents puits à la dose de 7 Gy en une séance.

- Ensemencement des cellules pour les expérimentations

Les différentes cellules sontensemencées en plaques 6 puits (*BD Falcon*) à raison de 250 000 cellules par puits dans du milieu complet pendant 24h, puis le surnageant est retiré et remplacé par du milieu dépourvu en exosomes, EFM (*Exosome Free Medium*) (Cf : purification et isolations des exosomes).

I.5. Extinction de gènes par shRNA

Nous avons utilisé la technique d’extinction de gènes (shRNA) par utilisation de vecteurs lentiviraux. Cette technique utilise des plasmides contenant une séquence permettant l’extinction du gène d’intérêt.

I.5.1. Amplification du plasmide porteur de la séquence d’intérêt

Les plasmides utilisés sont des vecteurs circulaires pLKO.1 commerciaux (Réf. SHC001) (Sigma-Aldrich). La carte de ce plasmide est présentée ci-dessous (Figure 23).

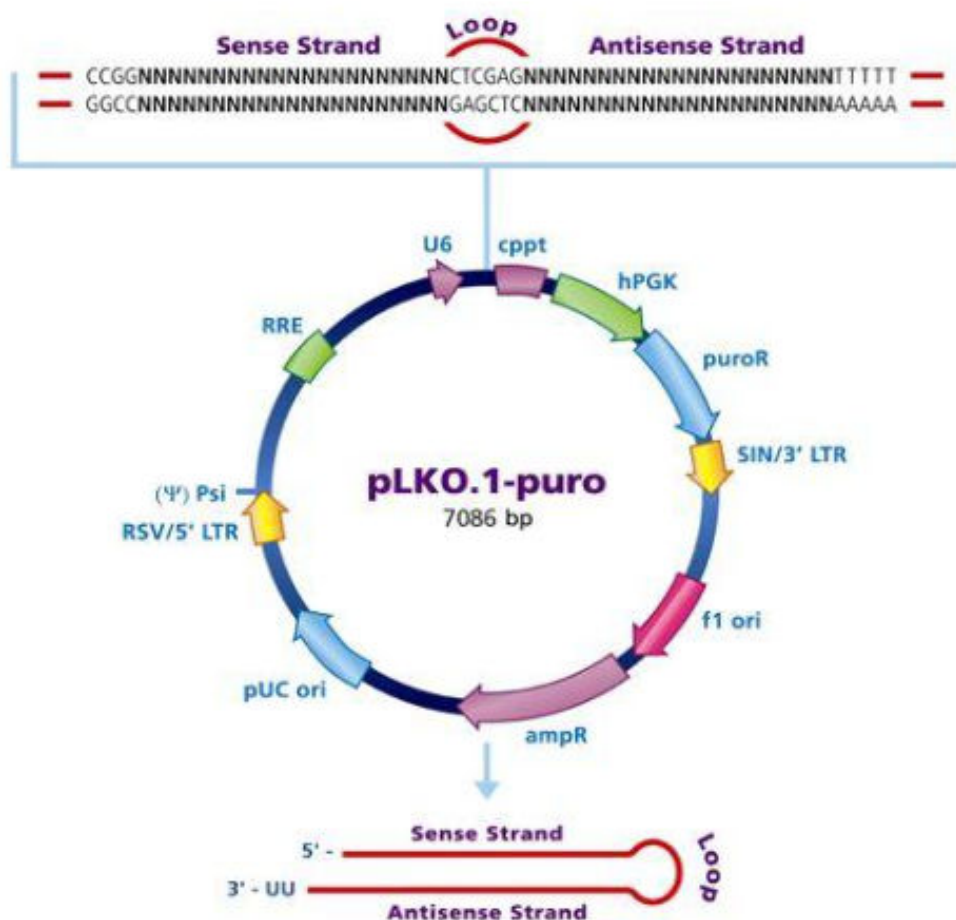


Figure 23 : Carte du vecteur pLKO.1 utilisé pour l'extinction de gènes par shRNA.

Cppt: Central polypurine tract, hPGK: Human phosphoglycerate kinase eukaryotic promoter, puroR: Puromycin resistance gene for mammalian selection, SIN/LTR: 3' self inactivating long terminal repeat, f1 ori: f1 origin of replication, ampR: Ampicillin resistance gene for bacterial selection, pUC ori: pUC origin of replication, 5' LTR: 5' long terminal repeat, Psi: RNA packaging signal, RRE: Rev response element.

Pour chaque gène d'intérêt, plusieurs clones sont testés afin de choisir celui dont l'efficacité d'extinction est optimale. Chaque clone correspond au vecteur pLKO.1 comprenant la séquence spécifique du gène qu'il éteindra.

Les plasmides sont donc dans un premier temps amplifiés par transformation bactérienne. 20ng de plasmide (soit 1µL) sont ajoutés à 50µL de bactéries DH5α compétentes (Invitrogen) préalablement mises sur glace. Le mélange est incubé sur

glace pendant 30 min. L'insertion du plasmide dans les bactéries se fait par choc thermique à 42°C pendant 45s, les tubes contenant les bactéries sont ensuite replacés sur glace pendant 2min. Pour chaque transformation bactérienne, 950µL de milieu Luria Broth sans antibiotique (LB, sigma aldrich) est ajouté et les tubes sont incubés 1h à 37°C sous agitation (225rpm). Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur boîtes de LB gélosé (200µL de bactéries par boîte) contenant un antibiotique de sélection : l'ampicilline (100µg/mL, Invitrogen) (le plasmide pLKO contient un gène de résistance à l'ampicilline, Figure 22). Les boîtesensemencées sont incubées à l'envers à 37°C sur la nuit. Le lendemain, une colonie est repiquée et ensemencée dans 5mL de LB liquide contenant de l'ampicilline et incubée à 37°C sous agitation pendant environ 6h. 200µL de suspension bactérienne (bactéries amplifiées) sont ensuite déposés dans 100mL de LB contenant de l'ampicilline et incubée à 37°C sous agitation toute la nuit.

Après amplification des bactéries transformées, celles-ci sont récupérées et une Midi prep est effectuée avec le kit NucleoBond Xtra Midi kit (Macherey-Nagel, France) afin d'extraire le plasmide amplifié. Brièvement, les bactéries sont centrifugées 5000 x g pendant 10min à 4°C, les culots sont ensuite lysés. Les lysats sont lavés, l'ADN est élué puis précipité dans de l'isopropanol. Après centrifugation (6000 x g, 45min, 4°C) le culot d'ADN est lavé à l'éthanol et centrifugé à nouveau (6000 x g, 10min, température ambiante). Après élimination et évaporation de l'éthanol, l'ADN est reconstitué dans 200µL d'eau ultrapure. La concentration des en ADN plasmidique déterminée par lecture de la densité optique à 260nm avec un Nanodrop (ND1000 Spectrophotometer, Labtech, France).

I.5.2. Transformation des cellules HEK293T

Afin de produire les lentivirus contenant le plasmide d'intérêt pour chaque gène, il est indispensable de passer par une étape de transfection de cellules HEK293T (Human Embryonic Kidney). Ces cellules 293T sont modifiées et possèdent un insert contenant l'antigène SV40 T. Ces cellules permettent donc la production de virions à partir de la transfection au JetPEI des plasmides d'intérêts. Le jetPEI est un polycation linéaire qui forme avec l'ADN des agrégats faiblement toxiques et plus stables que ne le sont les complexes lipides-ADN. Dans la cellule, il se comporte

comme une « éponge à protons » : il induit la rupture des endosomes par gonflement osmotique, provoquant le largage rapide de l'ADN dans le cytoplasme tout en le protégeant des nucléases cytosoliques (figure 24).

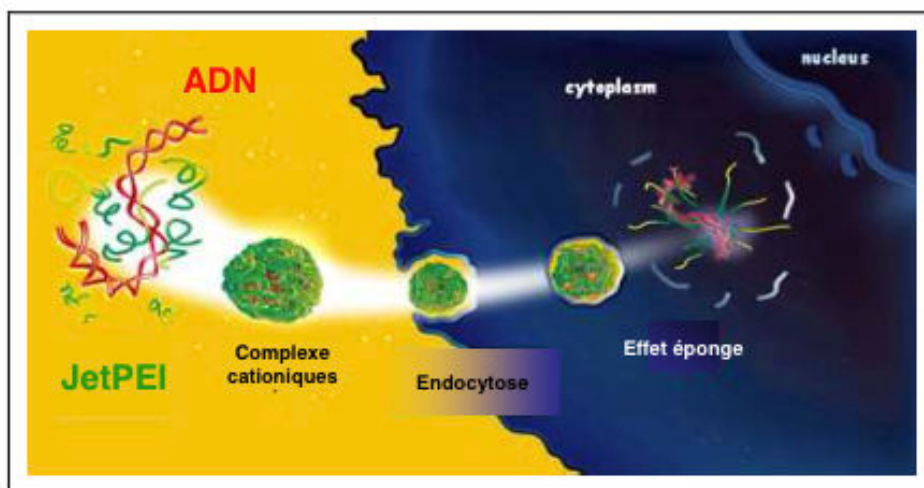


Figure 24 : Principe de la transfection cellulaire par le réactif JetPEI

(Schéma Polyplus Transfection). Le complexe JetPEI-ADN formé pénètre dans la cellule par endocytose. Il est libéré au de l'endosome niveau du cytosol par un effet dit "effet éponge".

Les cellules sontensemencées au jour 1 (J1) à une densité d'environ $2 \text{ à } 2,5 \cdot 10^6$ cellules par flasque de 75cm^2 (falcon) pour chaque transfection contenant 10mL de milieu de culture. A J2, la transfection est effectuée : cette étape est réalisée avec du milieu de culture ne contenant ni SVF, ni antibiotiques pour des cellules ayant une confluence entre 50% et 70% dans les plaques 6 puits. Le plasmide d'intérêt ($3,5\mu\text{g}$) ainsi que le « packaging » sont dilués dans un volume final de $250\mu\text{L}$ de NaCl 150mM et parallèlement le JetPEI ($20\mu\text{L}$) est dilué dans un volume final de $250\mu\text{L}$ de NaCl 150mM. Le mélange s'effectue en ajoutant délicatement $100\mu\text{L}$ de la solution de JetPEI diluée aux $100\mu\text{L}$ de la solution contenant l'ADN (attention, pas l'inverse). L'homogénéisation est réalisée au vortex pendant 3s puis le tout est incubé 20min à température ambiante. Pendant cette incubation, le milieu de culture des cellules est remplacé par 2mL de milieu de culture complet frais dans les puits contenant les cellules. La totalité du mélange de transfection est mise en contact avec les cellules. Après 24h à 48h, les cellules sont analysées.

I.5.3. Infection lentivirale des cellules U87-MG

Le protocole d'infection débute à J4 : le milieu de culture des cellules HEK293T transfectées est récupéré et remplacé par du milieu frais, les cellules sont ensuite replacées à l'incubateur. Le surnagent des cellules HEK293T est ensuite centrifugé pendant 5min à 3000rpm à température ambiante afin de culotter les cellules ou les débris et de garder les virions dans le surnagent. Parallèlement, 2mL de milieu frais sont déposés dans des tubes auxquels sont ajoutés 8µg par mL (pour les 10mL finaux de chaque flasque) de polybrène (Sigma-Aldrich) qui permettra une augmentation de l'efficacité d'infection. Après centrifugation, 8mL de surnagent sont récupérés et ajoutés au 2mL de milieu contenant le polybrène. Enfin, le milieu de culture des cellules U87-MG est éliminé et remplacé par le surnagent des cellules HEK293T additionné de milieu de culture frais et de polybrène. Les cellules sont ensuite replacées à l'incubateur.

Le sixième jour de ce protocole (J6) correspond à la sélection des cellules ayant intégré le plasmide et donc ayant une extinction du gène d'intérêt. Pour cela, le milieu de culture des cellules U87-MG infectées est éliminé et remplacé par du milieu de culture frais contenant 1µg/mL de puromycine. Cet antibiotique permet de tuer les cellules ne possédant pas de gène de résistance à la puromycine. Au contraire, les cellules ayant intégré les virus et donc le plasmide d'intérêt possèdent un gène de résistance à la puromycine présent dans la séquence du plasmide (cf carte du plasmide Figure M1). Les cellules sont alors incubées 72h avec ce milieu de culture de sélection. A J9, les cellules U87-MG sont passées, et le milieu de culture changé et remplacé par du milieu de culture contenant 0,5µg/mL de puromycine afin de toujours maintenir une pression de sélection. Les cellules peuvent alors être utilisées pour différentes expérimentations.

I.6. Analyse transcriptomique par qPCR

I.6.1. Extraction des ARNs totaux

Après culture, les cellules sont récupérées, centrifugées, lavées 1 fois en PBS et

culotées. L'extraction d'ARNs totaux est effectuée sur culot sec avec un kit (Qiagen). La concentration en ARN est ensuite déterminée par lecture de la densité optique à 260 nm avec un Nanodrop (ND1000 Spectrophotometer, Labtech, France).

I.6.2. Retrotranscription des ARNs

L'intégrité des ARNs extraits a été vérifiée par l'utilisation d'une puce RNA 6000 Labchip kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Les ADNc sont ensuite générés par rétrotranscription de 1µg d'ARN total avec le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied biosystems, Courtaboeuf, France).

I.6.3. La PCR quantitative

La q-PCR est réalisée avec le kit *Taqman Universal Master Mix II* (life technologies). Le milieu réactionnel contient l'enzyme, les dNTP, les amorces, les sondes TaqMan et les produits de la RT. L'enzyme utilisée est une ADN polymérase, l'amplification ne peut débuter que lorsque le programme de PCR commence. De plus, les amorces et les sondes sont spécifiques d'ARN. Les réactions sont réalisées en triplicat et plusieurs contrôles sont effectués à chaque expérience tels que des contrôles négatifs contenant seulement de l'eau donc sans échantillon pour chaque paire d'oligonucléotides testée. L'analyse de l'expression génique est faite selon la méthode des $\Delta\Delta CT$.

I.7. Tri cellulaire par la technique de couplage flux/force de sédimentation (SdFFF)

I.7.1. Principe

La SdFFF a été utilisée dans notre étude afin de trier des cellules ainsi que d'analyser des profils de tri de cellulaires en fonction des modifications apportées aux cellules par extinction de gènes. La SdFFF est donc composée de différentes parties (Figure 25) menant à un appareillage permettant de trier des cellules en fonction de leur taille et de leur densité :

- Une pompe permettant de régler un flux constant de la phase mobile (PBS).
- Un injecteur relié par une tubulure au canal de séparation et permettant d'injecter la suspension cellulaire.
- Un joint tournant (Les Ateliers Modernes, Limoges) reliant une tubulure fixe à un axe en rotation.
- Un canal de séparation situé dans un bol de centrifugation.
- Un moteur permettant la rotation du canal.
- Un détecteur mesurant la densité optique des particules à une longueur d'onde de 254nm.

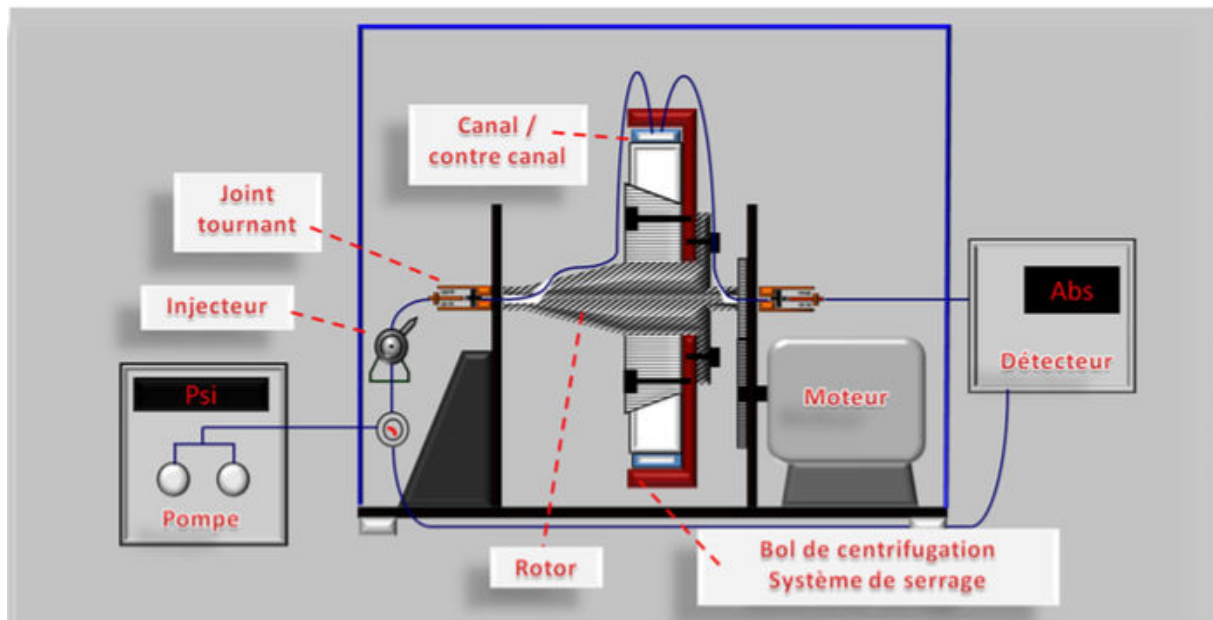


Figure 25 : Représentation de l'appareillage composant la machine de SdFFF.

Avant un tri cellulaire, la machine est nettoyée suivant différentes étapes permettant une stérilisation des tubulures. Ainsi, différents rinçages sont effectués en eau distillée, en Clenz (Beckman Coulter) et en eau de javel pour finir par de l'eau distillée.

I.7.2. Préparation des cellules et tri cellulaire

Les cellules sont ensemencées 72h avant le tri à une densité de 700000 à 1.10^6 cellules par flasques. Les cellules sont décollées en versène, centrifugées, comptées et resuspendues en PBS à une densité de 3.10^6 à $3,5.10^6$ cellules par mL. Parallèlement, la machine de SdFFF est mise en PBS sous un flux d'1mL par min pendant environ 20 min avant le tri.

Les cellules U87-MG sont donc triées selon des conditions particulières à cette lignée cellulaire. Le flux est donc réglé à 1mL par minute et la vitesse de rotation d'environ 400 rpm (soit un champ externe d'environ 25g).

I.8. Purification des exosomes

I.8.1. Centrifugations différentielles

Pour extraire les exosomes à partir des différentes lignées tumorales, les cellules doivent être cultivées dans un milieu dont le sérum est préalablement déplété en exosome « milieu exosome-free » par ultracentrifugation de 18 heures à 200 000g.

A 48 heures, le surnageant de culture est récupéré.

La purification des exosomes tumoraux est adaptée du protocole de Théry *et al*, 2006 et toutes les étapes s'effectuent à 4°C (Théry *et al.*, 2006).

Le surnageant de culture subit une première centrifugation à 200 g pendant 10 minutes afin d'éliminer les cellules mortes, le culot est éliminé et le surnageant subit une deuxième centrifugation à 2000 g pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant obtenu est ensuite filtré avec un filtre de 0,2 μ m de diamètre puis ultracentrifugé à 10 000 g pendant 30 minutes. Le culot n'est pas conservé et le surnageant est ultracentrifugé à 120 000 g pendant 80 minutes. Après élimination du surnageant, le culot de microvésicules est lavé dans du PBS1X et ultracentrifugé à 120000 g pendant 80 minutes.

Le culot contenant les exosomes est alors repris soit :

- dans du PBS1X pour être ajouté sur les différentes cultures cellulaires

- dans du tampon RIPA en vue d'une analyse western blot
- dans 400µl d'une solution de sucrose à 2,5 M pour un fractionnement sur gradient de sucrose.

I.8.2. Fractionnement des exosomes sur gradient continu de sucrose

Cette méthode permet de mesurer la densité des exosomes dans un gradient de sucrose. La littérature indique que les exosomes flottent à une densité comprise entre 1,15 et 1,21 g/ml sur gradient continu de sucrose.

Le culot d'exosomes repris dans une solution de sucrose à 2,5M est déposé au fond d'un tube. Un gradient continu de sucrose 0,4M à 1,8M (dans du PBS 10X + H₂O) est préparé puis coulé en surface dans le tube contenant préalablement le culot d'exosome, la première fraction déposée correspondant à la fraction 1. Le gradient est centrifugé sur la nuit (18 heures) à 210 000 g à 4°C. Des fractions de 600µl sont ensuite prélevées (10 fractions au total), et l'indice de réfraction est mesuré pour chaque fraction à l'aide d'un refractomètre.

Une fois l'indice de réfraction calculé, pour chaque fraction du gradient, les protéines sont précipitées. Dans un premier temps, 120µl d'acide trichloracétique (TCA) et 60µl d'acétone sont ajoutées dans chaque fraction. Après 1 heure à -20°C, un premier lavage est effectué (18000 g pendant 30 min), le surnageant est enlevé et le culot repris dans 200µl d'acétone. Après deux lavages en acétone, le culot est séché à 37°C pendant 15 min et resuspendu dans 15µl de tampon de charge laemmli (2X) (Biorad, France). L'expression des protéines contenues dans chaque fraction exosomale est recherchée par western blot.

I.8.3. Collection de sérum de patients atteints de GBM

Une collection de sérum de patients atteints de GBM et de patients sains (appareillés en âge) a été réalisée après validation du comité d'éthique du CHU de Limoges (Protocole : 141-2014-08). Après centrifugation des tubes SST à 4000 rpm pendant 15 min, le sérum est prélevé et conservé à -80°C. A partir de 1mL de sérum, les exosomes sont purifiés par centrifugations différentielles. Le sérum est centrifugé à 2000g pendant 10 min puis le surnageant est récupéré et ultracentrifugé à 10 000g pendant 30 min. Deux ultracentrifugations à 120 000g pendant 80min sont effectuées

et le culot d'exosomes est repris dans 30 µl de tampon RIPA pour une analyse protéique par western blot.

I.8.4. Test d'internalisation des exosomes

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour visualiser l'internalisation des exosomes :

-La première méthode consiste à marquer le culot d'exosomes avec une sonde fluorescente lipidique ; le PKH67 (Sigma). Comme indiqué dans le protocole du fournisseur, le culot d'exosomes obtenu est repris dans 1ml du diluent C (fourni dans le kit). Le PKH67 est mélangé à 1ml de diluent C, puis ajouté aux exosomes. Les exosomes sont incubés avec le colorant pendant 5 minutes à température ambiante puis la réaction est stoppée par addition de 50% final de sérum de veau fœtal déplété en exosomes. Les exosomes sont à nouveau centrifugés (120 000g pendant 70 min), et repris dans 1mL de PBS stérile avant d'être ajouté sur des cellules. Ensuite, pour les cinétiques d'internalisation, les cellules traitées aux exosomes marqués au PKH67 sont lavées deux fois en PBS puis culotées avant d'être fixée en PFA 4%. Après deux lavages en PBS, les cellules sont reprises dans 500 µl de PBS et l'internalisation des exosomes est quantifiée par cytométrie en flux.

-La seconde méthode pour rendre fluorescents les exosomes sécrétés par les cellules U87-MG a été de transfecter ces cellules avec un plasmide codant pour la protéine de fusion CD63-GFP (environ 55 kDa). Cette construction plasmidique a été réalisée par Thomas Naves, post-doctorant au sein du laboratoire. Nous avons testé en parallèle l'expression et la sécrétion exosomale de cette protéine de fusion (données non montrées). L'internalisation des exosomes exprimant la CD63-GFP dans les cellules cibles a ensuite pu être détectée en immunofluorescence.

I.8.5. Microscopie électronique

Le microscope utilisé pour les observations est un microscope électronique à transmission Jeol JEM 1200EX. Les grilles (Gilder Grids Copper/paladium, Euromedex) sont lavées dans de l'éthanol 100% puis placées sur un film de Formvar 2% (préparé dans du chloroforme). Après séchage, elles sont carbonées puis conservées à l'abri de la poussière.

Les exosomes sont culottés à 100 000 g pendant 2h. Le culot 100 000 g est repris dans de la PFA 2% (diluée dans du PBS). Une goutte de 5µl de l'échantillon est déposée sur une grille carbonée, et incubée à température ambiante pendant 20 minutes. Le surplus d'échantillon est retiré en passant la grille sur un papier buvard (Wattman).

I.9. Tests fonctionnels

I.9.1. Test d'invasion en chambre de Boyden

Une des méthodes les plus décrites pour observer les propriétés invasives des cellules en culture est l'utilisation de chambres de Boyden. Pour notre étude, ce test nous permet d'évaluer les capacités migratoires des HBMEC (Human Brain Microvascular Endothelial Cells) ou des CSM en fonction de nos différentes conditions. Dans ce test, des inserts placés sur un puits de culture sont utilisés, ce qui permet de délimiter deux compartiments superposés, séparés par une membrane microporeuse de 8µm de diamètre (Corning Incorporated, Corning, NY, Etats-Unis). Dans un premier temps, $70 \cdot 10^3$ cellules de chaque condition sontensemencées dans le compartiment inférieur en milieu EFM et traitées ou non avec des exosomes. 24 heures plus tard, $25 \cdot 10^3$ HBMEC ou des CSM sont déposées dans le compartiment supérieur. Les chambres de Boyden sont mises à incuber 16 heures à 37°C. La quantification du test d'invasion est réalisée en comptant le nombre d'HBMEC ou de CSM qui ont migré au travers de la membrane, attirées par les cellules issues des différentes conditions (rôle chimio-attractant). Plus précisément, 12 µl de calcéine (Sigma) est ajoutée dans les chambres supérieures et les

chambres de Boyden sont placées à 37°C pendant 15 minutes. Puis, la face supérieure des membranes est nettoyée avec un coton-tige pour enlever les cellules n'ayant pas traversé la membrane poreuse. Les HBMEC adhérentes à la face inférieure de la membrane ainsi colorées sont ensuite observées au microscope, photographiées et comptées.

I.9.2. Test de prolifération

La prolifération cellulaire étudiée dans chacune de nos conditions nous permettra d'évaluer le rôle des exosomes dans la prolifération tumorale. La prolifération cellulaire est directement corrélée à l'incorporation du BrdU (bromodéoxyuridine), analogue de la thymine, au niveau de l'ADN néo-synthétisé, et quantifiée avec un anticorps anti-BrdU. La mesure de la prolifération cellulaire est proportionnelle à la quantité de BrdU incorporé.

Les différentes cellules sontensemencées en plaque 6 puits à hauteur de 150 000 cellules par puit, après adhésion, le PBS ou les exosomes sont ajoutés. 24h après cet ajout, 1µL de BrdU (1X) (BromodéoxyUridine) par puit est ajouté. Après 4 heures de traitement, l'incorporation de BrdU est étudiée. Les cellules sont décollées, reprises en PBS 1X etensemencées à raison de $10 \cdot 10^3$ cellules / puits en triplicat en plaques 96 puits. Le test est réalisé selon les recommandations du fabricant (Proliferation assay kit, Cell Signaling). La révélation du BrdU s'effectue à l'aide d'un anticorps anti-BrdU après dénaturation de l'ADN par une solution d'HCl 0.1N. La lecture des résultats est effectuée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm (Multiskan FC).

I.10. Analyse protéique

I.10.1. Western blot

- Préparation des échantillons protéiques :

Pour l'analyse cellulaire ; les cellules issues des différentes conditions sont préalablement lavées dans du PBS 1X, culotées à 1500 rpm pendant 10 minutes et lysées dans du tampon de lyse RIPA (composition) pendant 30 min sur glace.

Pour l'analyse exosomale ; après ultracentrifugation, le culot contenant les exosomes est lysé dans du tampon de lyse (RIPA) pendant 30 min sur glace.

Le lysat protéique cellulaire ou exosomal est ensuite homogénéisé puis centrifugé à 10 000 g pendant 25 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines exosomales ou cellulaires totales est alors récupéré.

- Dosage de Bradford :

La concentration en protéines totales est déterminée selon un dosage colorimétrique basé sur l'utilisation du réactif de Bradford (Sigma Aldrich, France). La gamme étalon de la réaction est réalisée à l'aide d'une solution de BSA (Sigma Aldrich) de concentration connue (de 0 µg/mL à 2000 µg/mL). Les densités optiques (DO) obtenues pour chaque solution sont mesurées grâce à un spectrophotomètre à la longueur de 595 nm. La droite étalon permet de mesurer la concentration de chaque solution à partir de la DO obtenue.

- Electrophorèse en gel de polyacrylamide :

30 µg de protéines ont été dilués dans du tampon laemmli (Biorad, France) puis dénaturés 5 min à 95°C. Les lysats protéiques dénaturés sont ensuite déposés dans différents puits du système de migration et un marqueur de poids moléculaire (Fisher, France) est utilisé comme référence pour déterminer les poids moléculaires des protéines d'intérêts.

La séparation protéique est réalisée par migration électrophorétique en gel pré coulé avec gradient de polyacrylamide (4 à 15%) contenant du SDS (10%) (BioRad, France). La migration s'effectue pendant 1h (130 V) dans un tampon de migration (Tris-HCL 25 mM, pH 8,5 /Glycine 250 mM/SDS 0,1%) (BioRad).

- Transfert des protéines sur membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène)

Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Pall) préalablement activée quelques minutes dans un bain de méthanol (Sigma Aldrich, France) puis équilibrée dans le tampon de transfert (Tris/Glycine/méthanol, BioRad). Le gel de polyacrylamide est également équilibré quelques minutes dans le tampon

de transfert avant d'être mis en contact avec la membrane selon les instructions du fabricant (BioRad). Le transfert s'effectue pendant 30 minutes à 20V.

- Immunodétection des protéines :

Afin de bloquer les sites de fixation non spécifiques des anticorps sur la membrane, une saturation des membranes est effectuée avec une solution de TBS1X, 0,1 % tween contenant 5 % de lait écrémé pendant 1h sous agitation à température ambiante. Les membranes de PVDF sont ensuite incubées sur la nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt, dilué soit dans du TBS 1X/Tween 0,1%/lait 5%, soit dans du TBS 1X/Tween 0,1%/BSA 5% (tableau 3). Les membranes sont ensuite rincées en TBS1X/tween 0, 1% 3 fois pendant 5 min puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé HRP (Horseradish Peroxydase) correspondant, à l'hôte de l'anticorps primaire utilisé. Les anticorps secondaires sont dilués dans du TBS1X/tween0.1%/lait 5% (tableau 4) pendant 1 heure à température ambiante.

Les protéines de la membrane sont détectées par chimioluminescence (Millipore, France). La peroxydase en présence d'H₂O₂ permet l'oxydation du diacylhydrazide en un composé lumineux. Les photons émis au cours de cette réaction sont détectés grâce à une Gbox (Genesnap Syngene, Cambridge, UK) qui possède une caméra sensible aux photons. Pour quantifier les protéines contenues dans chaque lysat protéique, les membranes sont réhybridées soit avec un anticorps dirigé contre l'actine (Sigma-Aldrich) pour les lysats cellulaires, soit avec un anticorps dirigé contre CD63 (Biorad) pour les lysats exosomaux.

Une quantification des expressions protéiques de chaque échantillon cellulaire est réalisée en comparant l'intensité d'expression de la protéine d'intérêt à l'intensité de l'actine ou de CD63 grâce au logiciel image J.

Anticorps	Taille kDa	Hôte	Dilution	Fournisseur
EGFRvIII(novocastra)	175	souris	1/125	Leica Biosystem
EGFR	145	souris	1/1000	Cell signaling
CD63	60-70	souris	1/1000	AbD SEROTEC MCA2142
Rab27	25	lapin	1/500	Sigma Aldrich HPA001333
CHI3L1/YKL-40	43	lapin	1/1000	ABCAM
TrKB	145-95	souris	1/200	R&D
P75	75	lapin	1/300	Santa Cruz
Sortiline	95	souris	1/1000	BD Bioscience
CD9	27	lapin	1/500	Sigma
Flotillin	47	lapin	1/1000	Cell signaling
TSG101	45	lapin	1/500	Cell signaling
CD44	80	lapin	1/1000	Sigma
GFAP	50	lapin	1/200	DAKO
N-cadhérine	100	souris	1/500	Sigma
Alpha-SMA	43	souris	1/500	Sigma
Runx2	27	lapin	1/500	Sigma
TrkC	145	souris	1/200	R&D
BDNF	27	lapin	1/500	Sigma
NGF	27	lapin	1/500	Sigma
NT3	27	lapin	1/500	Sigma
HSP90	90	lapin	1/500	Sigma
Actine	42	souris	1/10000	Sigma

Tableau 3 : Liste des anticorps primaires utilisés en western blot.

Anticorps	Hôte	Dilution	Fournisseur
Anti mousse HRP	Mouton	1/1000	DAKO
Anti rabbit HRP	mouton	1/1000	DAKO

Tableau 4 : Liste des anticorps secondaires utilisés en western blot.

I.10.2. Immunofluorescence indirecte

L'internalisation des exosomes a été étudiée par immunofluorescence sur différentes lignées. Les cellules (2×10^5) sont ensemencées par puits en plaque 6 puits où ont été préalablement déposées des lamelles de verre. Après irradiation, 30 $\mu\text{g/mL}$ d'exosomes issus de la lignée U87CD63 GFP sont ajoutés dans chaque puits. Après 48h de culture, le surnageant est retiré et conservé et les cellules sont perméabilisées grâce à l'ajout de méthanol glacé pendant 5 minutes. Après 3 lavages en PBS stérile, une saturation des sites de fixation non spécifique est réalisée par incubation des cellules avec une solution de PBS-BSA 4% pendant 2 heures à température ambiante. Les cellules sont lavées en PBS puis incubées sur la nuit à 4°C avec des anticorps primaires dilués dans la solution de saturation (tableau 5). Après 3 lavages en PBS, l'anticorps secondaire anti-Ig de souris couplé à un fluorochrome est incubé avec les cellules pendant une heure à température ambiante (tableau 6). Un marquage au Dapi dilué au 1/10000 en PBS, pendant 10 min à température ambiante à l'abri de la lumière est effectué. Après lavage, les lames sont montées en mowiol 4-88 puis laissées sécher à 4°C pendant 24h. Les cellules ayant incorporées les exosomes sont analysées en microscopie confocale (LSM 510 META, ZEISS).

Anticorps	Hôte	Dilution	Fournisseur
CD63	souris	1/1000	AbD SEROTEC MCA2142

Tableau 5 : Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence indirecte.

Spécificité	Hôte	Dilution	Fluorochrome	Fournisseur
Ig totale de souris	Chèvre	1/5000	Alexa fluor 594	Invitrogen

Tableau 6 : Liste des anticorps secondaires utilisés en western blot.

I.11. Modèle *in vivo*

I.11.1. Animaux

Les manipulations ont été réalisées chez un modèle de souris immunodéprimées : les souris SCID dont les lymphocytes T ne sont pas fonctionnels (NMRI, Janvier, France) âgées de 6 semaines. Les animaux en cours d'expérimentation sont hébergés dans des cages à couvercles filtrants autoclavés et leur alimentation est stérile. Les cages sont placées dans des armoires dont l'air est filtré, la température de l'isolateur et des armoires est maintenue à 22°C avec un cycle lumineux de 12 heures. La manipulation de ces souris est réalisée sous hotte à flux laminaire. L'ensemble de ces expériences a été effectué en respectant les règles d'éthique en vigueur.

75 souris ont été utilisées pour le modèle de greffe hétérotopique et plusieurs conditions ont été testées ;

- 15 souris SCID greffées avec des cellules U87-pLKO ou 15 souris greffées avec des cellules U87 sh YKL-40 et traitées au PBS stérile et de l'hydrogel sont considérées comme témoin
- 15 souris SCID greffées avec des cellules U87-pLKO et traitées avec des exosomes U87-pLKO resuspendus dans de l'hydrogel
- 15 souris SCID greffées avec des cellules U87-pLKO et traitées avec des exosomes U87 sh YKL-40 resuspendus dans de l'hydrogel
- 15 souris SCID greffées avec des cellules U87 sh YKL-40 et traitées avec des exosomes U87-pLKO resuspendus dans de l'hydrogel

I.11.2. Xénogreffes

1.10^6 de cellules U87-pLKO et U87 sh YKL-40 sont préparées dans du PBS stérile et injectée en sous-cutané, au niveau de la patte, sur des souris SCID après anesthésie de l'animal à l'isoflurane. Une semaine après la xénogreffe, les tumeurs sont traitées avec des exosomes issus de cellules U87-pLKO ou de cellules U87 sh YKL-40.

I.11.3. Traitement des souris aux exosomes

Les exosomes U87 pLKO ou U87 sh YKL-40 (30 $\mu\text{g/mL}$), repris dans du PBS et de l'hydrogel, sont injectés à proximité de la tumeur en sous-cutané. L'opération est répétée deux fois par semaine durant trois semaines. Le volume tumoral ainsi que le poids des animaux est vérifié tous les jours jusqu'à sacrifice de l'animal. Pour calculer le volume tumoral approximatif on utilise la formule suivante : Longueur x largeur²/2. A 35 jours post-greffe, les souris sont sacrifiées, les tumeurs prélevées et photographiées puis placées dans du formol pour la réalisation de coupes immunohistochimiques ou placées à sec à -80°C pour des analyses transcriptomiques et protéiques.

I.12. Etude immunohistochimique

Des analyses histologiques et immunohistologiques ont été réalisées. Pour l'étude histologique, les tumeurs sont fixées pendant 12 h dans du paraformaldéhyde 4% puis inclus en paraffine. Une fois la tumeur incluse dans le bloc de paraffine, des coupes de 4 μm sont réalisées grâce à un microtome.

Pour l'étude immunohistochimique, le marqueur des cellules endothéliales, le CD31 (1/30, Histonova), a été recherché sur les coupes de tumeurs par immunohistochimie. L'étude de la prolifération cellulaire a pu être effectuée grâce à un marquage de l'antigène Ki-67 (1/50, Dako). Les marqueurs Oct-4 (1/200, Abcam) et YKL-40 (1/1000, Abcam) ont permis de déterminer la présence de CSC et les récepteurs aux neurotrophines, TrkB (1/200, RetD), p75^{NTR} (1/300, Santa Cruz) et le corécepteur la sortiline (1/1000, BD bioscience) ont été recherchés pour chaque condition.

Pour chaque marquage, une étape de prétraitement a été réalisée afin d'éliminer la paraffine et réhydrater les tissus : 2 bains de 5 minutes dans du Toluène, 2 bains de 5 minutes dans l'éthanol absolu puis 1 bain dans du PBS1X jusqu'à utilisation des lames. Celles-ci sont alors immergées dans du tampon citrate (pH 7 ; soit 200 μ M acide citrique et 9,8 mM citrate de sodium) dans un récipient allant au four à micro-ondes, et subissent 3 cycles de 5 minutes à 750 W (pour les antigènes cytoplasmiques) ou 4 cycles de 5 minutes à 750 W (pour les antigènes nucléaires). Cette dernière étape permet la perméabilisation des membranes et le démasquage des antigènes. Après refroidissement, les lames sont laissées dans du PBS1X jusqu'à utilisation.

L'inhibition des peroxydases endogènes est ensuite effectuée par un bain de 10 minutes dans du Méthanol - 5% H_2O_2 . A la suite de ce bain, les lames subissent un lavage de 5 minutes en eau puis un second bain de 5 minutes en PBS1X.

Afin de limiter les réactions aspécifiques, la saturation des sites antigéniques est réalisée par un bain de 30 minutes dans du PBS1X-BSA 3%. L'incubation avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS1X-BSA 3 % (1 heure) est suivie de 2 lavages en PBS. Puis, les lames sont incubées pendant 30 minutes avec l'anticorps secondaire du système Envision anti-Lapin (K4011, Dakocytomation) qui correspond à un polymère couplé à la HRP (Peroxydase de raifort / Horseradish Peroxydase). Cette étape est suivie de 2 lavages en PBS1X.

L'étape de révélation est obtenue en fournissant le substrat à l'HRP, la DAB (DiAminoBenzidine). La HRP catalyse la conversion de la DAB en un produit chromogène qui prend une coloration marron. La réaction est stoppée par lavage intensif des lames à l'eau courante.

Afin de mieux distinguer les constituants tissulaires, une étape de contre coloration à l'hématoxyline (coloration des noyaux) est requise, suivie d'un bain au carbonate de lithium afin d'accentuer le contraste.

Les tissus sont ensuite déshydratés par des bains successifs dans l'éthanol absolu puis des bains de toluène, dans lequel les lames peuvent rester jusqu'au montage. Celui-ci s'effectue entre lame et lamelle à l'aide du milieu de montage Eukit (03989, Fluka). Les lames sont conservées dans du milieu de montage non aqueux et les

images sont acquises avec un microscope Leica DMRX et le logiciel d'acquisition LAS.

Résultats

Résultats

I.13. Le transfert de TrkB, via les exosomes de GBM, permet de moduler l'agressivité des cellules inactivées pour YKL-40

TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated cells

Dans le glioblastome, les neurotrophines participent à l'agressivité tumorale en permettant notamment la croissance et la prolifération des cellules souches cancéreuses (CSC) (Forsyth et al., 2014; Lawn et al., 2015).

Ces CSC peuvent communiquer leur agressivité et détourner le microenvironnement via le relargage d'exosomes. Les exosomes transportent des protéines impliquées dans les mécanismes de prolifération cellulaire, d'angiogenèse et de survie tumorale tel que l'EGFRvIII (Skog et al., 2008).

Notre équipe a précédemment montré que dans le cancer du poumon, un complexe composé de TrkB/EGFR/sortiline (TES) est transféré via les exosomes et permet de contrôler les cellules endothéliales et d'activer l'angiogenèse (Wilson et al., 2014b). Cependant aucune étude n'a mis en évidence le rôle des exosomes de GBM dans le transfert des neurotrophines et de leurs récepteurs ainsi que leur implication dans le contrôle du GBM et la dissémination du phénotype agressif au microenvironnement.

L'agressivité des cellules tumorales dépend de leur caractère indifférencié. Afin de déterminer si les changements de l'état de différenciation des cellules tumorales ainsi que leur perte d'agressivité pouvaient induire des modifications d'expression des neurotrophines et de leur récepteur au niveau cellulaire ainsi que dans les exosomes sécrétés, nous avons utilisé une lignée cellulaire inactivée pour le gène *CHI3L1*. Ce dernier code pour une protéine YKL-40 connue comme marqueur des cellules souches qui est considéré comme étant de mauvais pronostic dans le GBM en raison de son implication dans l'invasion et l'angiogenèse tumorale du GBM (Ku et al., 2011).

La modulation du stade de différenciation des cellules et, par conséquence, de leur agressivité via l'inactivation de *CHI3L1* conduit à des variations significatives des niveaux d'expression de certaines neurotrophines et de leurs récepteurs. Ainsi, une

diminution des récepteurs TrkB, p75^{NTR} et du co-récepteur la sortiline a été principalement observée dans la lignée inactivée exprimant un phénotype moins agressif. Ces changements d'expression sont également présents dans les exosomes issus de cette lignée. Nos résultats *in vitro* suggèrent que les cellules de GBM sont capables de transférer leur agressivité aux cellules environnantes via le transfert de TrkB à la membrane des exosomes. Au contraire, le volume tumoral est réduit quand ces dernières sont traitées par des exosomes issus de cellules inactivées pour YKL-40 dans lesquels l'expression de TrkB est significativement diminuée. Ces observations suggèrent que l'expression de TrkB dans les exosomes influence le statut de différenciation des cellules de GBM *in vivo*. *Ex vivo*, l'existence d'un transfert actif de TrkB dans les exosomes provenant de sérum de patients atteints de GBM a pu être confirmée sur une cohorte de 11 sujets.

L'ensemble de ces résultats met en évidence l'importance de TrkB dans la dissémination de l'agressivité tumorale et son intérêt en tant que nouveau biomarqueur du GBM.

TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells

Sandra Pinet¹, Barbara Bessette¹, Nicolas Vedrenne¹, Aurélie Lacroix¹, Laurence Richard², Marie-Odile Jauberteau^{1,3}, Serge Battu^{1,4}, Fabrice Lalloué¹

¹Limoges University, Equipe Accueil 3842, Cellular Homeostasis and Diseases, Faculty of Medicine, Rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex, France

²Limoges University Hospital, Department of Neurology, 87042 Limoges Cedex, France

³Limoges University Hospital, Department of Immunology, 87042 Limoges Cedex, France

⁴Limoges University, Laboratory of analytical chemistry and Bromatology, Faculty of Pharmacy, 87025 Limoges, France

Correspondence to: Fabrice Lalloué, **email:** fabrice.lalloue@unilim.fr

Keywords: glioblastoma, exosomes, neurotrophin receptors, TrkB, undifferentiated cells

Received: May 03, 2016

Accepted: June 13, 2016

Published: July 2, 2016

ABSTRACT

The neurotrophin receptors are known to promote growth and proliferation of glioblastoma cells. Their functions in spreading glioblastoma cell aggressiveness to the microenvironment through exosome release from glioblastoma cells are unknown.

Considering previous reports demonstrating that YKL-40 expression is associated with undifferentiated glioblastoma cancer stem cells, we used YKL-40-silenced cells to modulate the U87-MG differentiated state and their biological aggressiveness. Herein, we demonstrated a relationship between neurotrophin-receptors and YKL-40 expression in undifferentiated cells. Differential functions of cells and derived-exosomes were evidenced according to neurotrophin receptor content and differentiated cell state by comparison with control pLKO cells.

YKL-40 silencing of glioblastoma cells impairs proliferation, neurosphere formation, and their ability to induce endothelial cell (HBMEC) migration. The modulation of differentiated cell state in YKL-40-silenced cells induces a decrease of TrkB, sortilin and p75^{NTR} cellular expressions, associated with a low-aggressiveness phenotype. Interestingly, TrkB expressed in exosomes derived from control cells was undetectable in exosomes from YKL-40 -silenced cells. The transfer of TrkB-containing exosomes in YKL-40-silenced cells contributed to restore cell proliferation and promote endothelial cell activation. Interestingly, in U87 MG xenografted mice, TrkB-depleted exosomes from YKL-40-silenced cells inhibited tumor growth *in vivo*.

These data highlight that TrkB-containing exosomes play a key role in the control of glioblastoma progression and aggressiveness. Furthermore, TrkB expression was detected in exosomes isolated from plasma of glioblastoma patients, suggesting that this receptor may be considered as a new biomarker for glioblastoma diagnosis.

INTRODUCTION

Glioblastoma (GBM), the most frequent type of malignant tumor in the adult central nervous system, is associated with poor prognosis with a mean survival of 12 months despite advances in surgery, radiotherapy and chemotherapy [1, 2]. Among the hypotheses of therapeutic resistance, YKL-40-expressing cells are identified as mesenchymal cell markers associated to temozolomide

resistance [3] and worse prognosis [4]. Additionally, the cellular heterogeneity of tumors containing glioblastoma stem cells (GSC) (also named brain tumor initiating cells) have been reported in GBM [5, 6]. Their ability to remodel actively their microenvironment, contributes to promote tumorigenesis [7]. The exosomes released from tumor cells are described to control the microenvironment. These small bilayer microvesicles (50–150 nm in size) have been extensively studied for their ability to transfer

molecular cargo to surrounding cells, influencing the tumor phenotype [8, 9]. Indeed, the transfer of oncogenic receptors such as EGFRvIII in GBM contributes to spread aggressiveness to microenvironment via exosomes [8].

Neurotrophins (NTs), a family of growth factors initially identified in the nervous system [10] are involved in proliferation, differentiation or cell death in several malignant cells. These functions depend on the activation of two types of receptors. Neurotrophin tyrosine kinase receptors, also named tropomyosin kinase (Trk) receptors (TrkA or NTRK1, TrkB or NTRK2, and TrkC or NTRK3), are high affinity receptors for the mature neurotrophins, nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT3), respectively. p75^{NTR}, a member of TNF receptor superfamily, is the common receptor for mature NTs and their precursors, the pro-NTs [10]. Neurotrophins and their tyrosine kinase receptors are involved in several solid tumor aggressiveness [11]. The overexpression of these receptors was reported in glioblastoma. Indeed, TrkB and TrkC receptors promote the growth of brain tumor-initiating cells [12] and p75^{NTR} was also described in high grade gliomas [13] promoting glioma invasion [14]. Furthermore, TrkB is considered sufficient to transform a neural crest-derived cell line into a malignant phenotype [15]. We have previously described the release of TrkB in exosomes from other malignant cells, the non-small cell lung cancer cells [16]. Interestingly, in this model, the exosome release consisted in the association of TrkB with another oncogenic receptor, EGFR, in presence of sortilin, promoting angiogenesis, proliferation and cell survival [16]. In glioblastoma, the transfer of neurotrophin receptors through exosomes has never been investigated. We hypothesize that the transfer of TrkB through exosomes in GBM may play a key role in spreading aggressiveness and promoting tumorigenesis.

YKL-40 coded by *CHI3L1* gene, a member of the mammalian chitinase-like glycoprotein family is a lectin lacking chitinase activity due to amino acid substitutions in the region corresponding to the chitinase active site. YKL-40 may have a role in cell migration [17] and connective tissue modeling [18] and is involved in the inflammatory response [19, 20]. Additionally, it has been implicated as a serum marker for aggressive disease in colon [21], ovarian [22], breast carcinoma [23] and GBM [24]. Despite the association of increased expression of YKL-40 with many diseases, its biological function is still largely unknown. YKL-40 is involved in growth and survival of glioblastoma cells [25]. YKL-40 is a marker of worse prognosis in high-grade gliomas [26], involved in invasion, angiogenesis [25] and in maintaining the mesenchymal signature of primary glioblastoma [27, 28]. In GBM, elevated serum levels of YKL-40 are positively correlated with cancer invasiveness, radioresistance, recurrence, and reduced patient survival times [4, 24, 29].

We have previously demonstrated that the gene (*CHI3L1*) coding for YKL-40 was overexpressed

in undifferentiated cells [30]. In order to define the relationship with neurotrophin-receptor expressions in YKL-40-expressing cells and their derived exosomes, a silencing of YKL-40 in U87-MG cells was achieved to characterize their functional properties.

This study highlights for the first time that YKL-40 silencing induces a decrease of TrkB, sortilin and p75^{NTR} expressions, associated with a low aggressive phenotype. Interestingly, we have evidenced that the release of TrkB in exosomes from control glioma cells, was able to rescue both migration and activation of YKL-40-inactivated cells. By contrast, exosomes from YKL-40-inactivated cells suppressed these functions in control cells.

RESULTS

Characterization of YKL-40-inactivated glioblastoma cells: differentiated state and functional properties

YKL-40 coded by *CHI3L1* gene, a member of the chitinase-like glycoprotein family, is involved in growth and survival of glioblastoma cells [25]. We have previously shown that *CHI3L1* is overexpressed in undifferentiated U87-MG cells and in neurosphere-forming glioblastoma stem cells, isolated from GBM patients [30].

Before studying the neurotrophin receptors expression, we have analysed the functional changes induced by YKL-40 inactivation. To address this, YKL-40 inactivation was performed by shRNA in U87-MG cells. The selected clone was the lower YKL-40-expressing cell line in comparison with pLKO control cells (Figure 1A). This silenced cell line was studied to determine the modulation of undifferentiating cell markers and their functional properties i.e invasion and cell proliferation. According that YKL-40 expression was similar in U87-MG cells and pLKO cells (data not shown), pLKO cells were used as control.

To determine whether the lack of YKL-40 cell expression influences proliferation and migration, invasion assays were performed. Proliferation and capacity to induce HBMEC migration, were significantly decreased in sh YKL-40 cells ($P=0.0008$, $P=0.0006$, respectively) (Figure 1B).

According that stemness properties were maintained in defined medium [31], we have compared sh YKL-40 cells to pLKO cells, cultured in defined medium (DM). The neurosphere-forming cells and the number of undifferentiated cells were evaluated in parallel to YKL-40 mRNA and protein expressions. A lack of YKL-40-expressing cells in DM was observed in sh YKL-40 cells, by contrast to pLKO cells in DM cultures (Supplementary Figure S1). In parallel, the number, surface and diameter of neurospheres were significantly decreased in sh YKL-40-DM cultures compared to pLKO-DM cultures ($P=0.0010$, $P=0.0384$, $P=0.0108$, respectively) (Figure 1C). To search for a relationship of these data with the

diminution of undifferentiated cells, we have evaluated the expression levels of the main markers for glioma stem cells (GSC), AC133, Sox2 and Oct4 [31–33]. As expected, GSC markers (AC133 and Oct4) were increased in defined medium (pLKO-DM) compared to pLKO cells cultured in serum-containing medium due

to GSCs selection. In contrast, these GSCs markers are reduced when YKL-40-silenced U87-MG cells cultured in defined medium (pLKO-DM) (Figure 1D). Cell sorting by SdFFF confirmed the variation of cancer stem cell content based on the discrimination of differentiated cell sub-population eluted in fraction F1 and undifferentiated cells

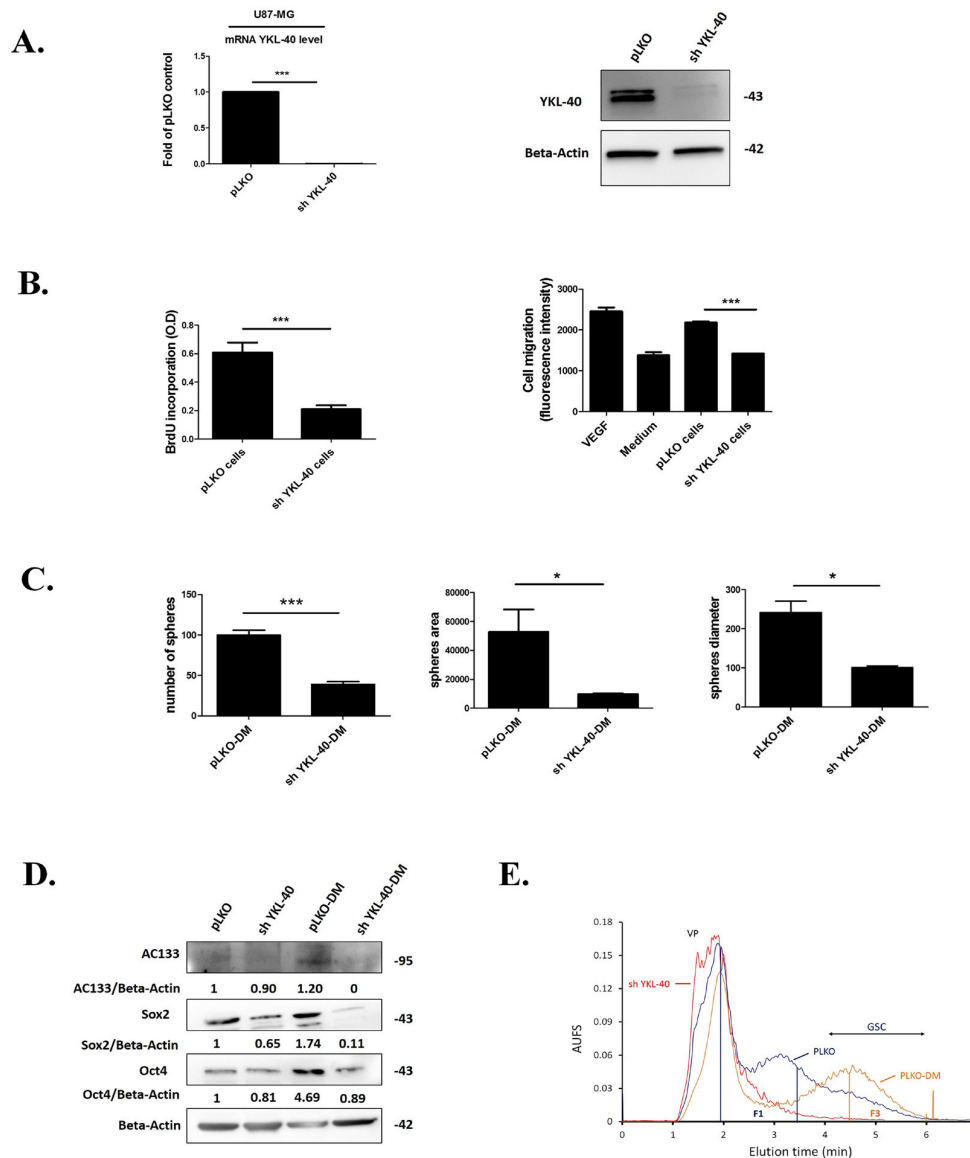


Figure 1: YKL-40 expression is essential to maintain the undifferentiated state cell related to GSC. A. Quantification of *YKL-40* mRNA by RT-qPCR and protein expression for YKL-40 by western blotting performed in human U87-MG pLKO control cells (pLKO) and sh YKL-40 cells. The fold change of YKL-40 mRNA was normalized by GAPDH and plotted as means $\pm$ SD compared to controls. (Student t-test. *** $P < 0.001$). **B.** BrdU incorporation (left) was performed to analyze proliferation in sh YKL-40 or pLKO cells. Cell (HBMEC) migration assay (right) evaluated by fluorescence intensity was carried out with sh YKL-40 or pLKO cells and compared to VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor 10 μ g/mL) and culture medium (MEM) as positive and negative controls respectively. **C.** Number, area and diameter of spheres for pLKO-DM and sh YKL-40-DM cells (Student's t-test, * $P < .05$; *** $P < .001$). **D.** AC133, Sox2 and Oct4 expression (western blotting) in pLKO, sh YKL-40, pLKO-DM and sh YKL-40-DM. Values indicate the ratio of relative densitometric values of AC133, Sox2 and Oct4 compared to β -actin as loading control, normalized to an arbitrary value of 1 obtained with pLKO cells. **E.** Representative fractograms of pLKO (blue), pLKO-DM (orange) and sh YKL-40 (red) after cell sorting in SdFFF. VP corresponds to Void Peak; Fractions 1 (F1) and 3 (F3) are indicated by vertical lines.

eluted in fraction F3 [34, 35]. Obviously, F3 is increased in pLKO-DM cell fractogram compared to pLKO cells cultured in serum-containing medium. By contrast, the most undifferentiated sh YKL-40 cells cultured in serum-containing medium cells disappeared in F3 by comparison to pLKO cells and sh YKL-40 cells cultured in DM were undetectable (Figure 1E).

Altogether, these data suggest that YKL-40 inactivation modulates differentiation cell state inducing the disappearance of undifferentiated neurosphere-forming cells.

According that neurotrophin receptors were identified in GSCs and are associated to glioma aggressiveness [12–14] we hypothesized that their expression could be modified in YKL-40-silenced cells. Therefore, we have evaluated the neurotrophin receptors TrkA, TrkB, TrkC, p75^{NTR} and sortilin in YKL-40 inactivated cells, in comparison to control pLKO cells.

YKL-40 glioma cell-inactivation decreased TrkB, p75^{NTR} and sortilin cell expressions

According that YKL-40 inactivation suppressed the undifferentiated glioma cells and that neurotrophin receptors are associated to the activation of brain tumor-initiating cells [12] we searched for their association with specific changes in the expression level of neurotrophins and their receptors. To address this, we have compared their expressions in YKL-40 silenced U87-MG cells and in pLKO control cells.

Therefore, mRNA and protein expression of both TrkB isoforms (TrkB 145, full-length) and truncated TrkB 95 (Data not shown), p75^{NTR}, sortilin and NGF were significantly down-regulated in sh YKL-40 compared to pLKO cells (Figure 2A-2B) while the expression of TrkC, BDNF and NT3 remained unchanged (Figure 2A-2B) and TrkA was undetected whatever the cells (data not shown). Taken together, these data suggested that TrkB, p75^{NTR} and sortilin expressions were related to those of YKL-40.

Accordingly, we next investigate the exosome release from these cells and their contents in neurotrophin receptors.

Neurotrophin receptors, TrkB, p75^{NTR} and sortilin are decreased in sh YKL-40-derived exosomes

Considering that glioblastoma exosomes are implicated in the activation of tumor growth [36] and that neurotrophin receptors play a key role in glioblastoma aggressiveness, we then analysed their expressions in exosomes isolated from sh YKL-40 cells in comparison to those from pLKO control cells. Isolation of pure and intact exosomes, performed by differential ultracentrifugation protocol [37] were characterized by dynamic light scattering (DLS), transmission electronic microscopy

(TEM) and proteomic analysis. DLS analysis showed a similar size between exosomes released from pLKO cells (pLKO exosomes) (90.0 ± 9.4 nm) and those from sh YKL-40 cells (sh YKL-40 exosomes) (80.0 ± 19.6 nm) (Supplementary Figure S2). TEM data confirmed that two cell types released a homogenous mixture of rounded vesicles (Figure 3A).

Main exosome markers were found in nanovesicles derived from both cell subtypes (Figure 3B). Our results demonstrated that exosome structure and specific markers are conserved in both cell types.

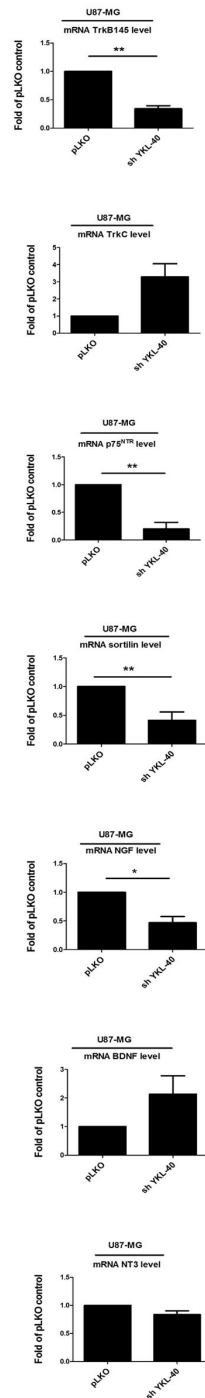
The specific expression of YKL-40, TrkA, TrkB, TrkC, p75^{NTR} and sortilin was studied by western blotting in exosomes derived from pLKO cells and from sh YKL-40 cells cultured in exosome-free medium. As expected, YKL-40 expression was undetectable in sh YKL-40 exosomes. TrkB, p75^{NTR} and sortilin receptors were down-regulated in sh YKL-40 exosomes compared to pLKO exosomes (Figure 3C). Strikingly, phosphorylated TrkB was detected only in exosomes from pLKO cells (Figure 3C). Similarly to cell expression, TrkA was undetected and TrkC was unchanged in both cell line-derived exosomes (Supplementary Figure S3). As EGFRvIII was detected in exosome released from glioblastoma cells [8], we have studied in parallel its expression. Interestingly, we have detected that EGFRvIII was also decreased in exosomes released from sh YKL-40 cells, compared to pLKO cells (Supplementary Figure S3). To specifically determine the differential distribution of neurotrophin receptors and YKL-40 within exosome subpopulations, protein analyses were achieved on fractions after sucrose gradient separation [37, 38] ($0.2\text{--}2.5\text{M}/\text{density: } 1.06\text{--}1.21$ g/mL) of total exosomes validated by CD9 and CD63 expression (Supplementary Figure S4). The pattern of protein expression in fractions was distinct in the two cell lines. Concerning pLKO exosomes, YKL-40, TrkB, sortilin and p75^{NTR} was mainly expressed in the high-density fractions of $1.16\text{--}1.21$ g/mL. By contrast, in exosomes derived from shYKL-40 cells, YKL-40, TrkB, sortilin and p75^{NTR} expression were absent (Supplementary Figure S4).

Taken together, these data assessed that inactivation of YKL-40 in glioma cell consistently reduced TrkB, p75^{NTR} and sortilin in exosomes. Therefore, we have looked for their functional effects in proliferation and invasion properties.

Functional properties of exosomes were depending on the transfer of TrkB

Since exosome-derived from cancer cells can promote angiogenesis and tumor growth [16, 39], the effect of pLKO and sh YKL-40 exosomes on glioma cell proliferation and HBMEC migration were analyzed. Moreover, the expression levels of TrkB and phospho-TrkB following exosome internalization were evaluated in both cell lines. For these experiments, cross treatments

A.



B.

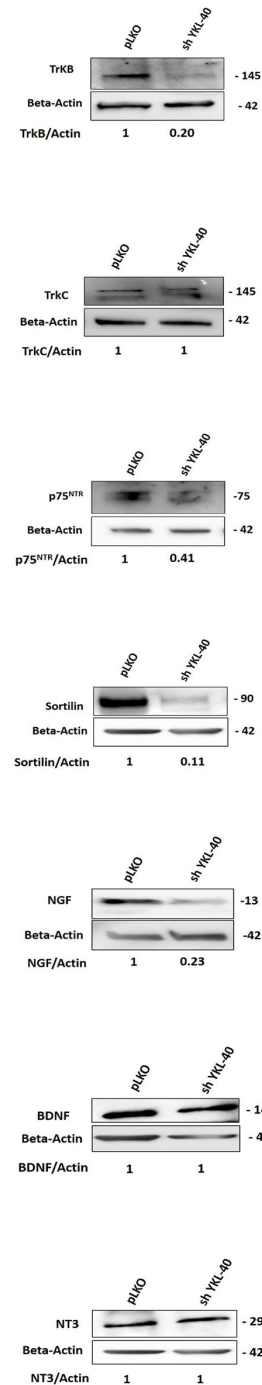


Figure 2: Expressions of neurotrophins and its receptors are modulated by YKL-40 expression level in cells. A. Analyses of changes in mRNA expression were achieved on different neurotrophin receptors, TrkB, TrkC, p75^{NTR} and co-receptor sortilin, NGF, BDNF and NT-3 by real time PCR in pLKO and sh YKL-40 cells. mRNA values represent fold-change (mean $\pm$ SD of three independent experiments) relative to mRNA levels corresponding to pLKO -transfected cells as controls (Student's t-test, * P < .05; ** P < .01; *** P < .001). **B.** The pattern of protein expression from each gene was studied by western blotting in pLKO and sh YKL-40 cells. Values indicate the ratio of relative densitometric values of TrkB, TrkC, p75^{NTR}, sortilin, NGF, BDNF and NT-3 compared to β -actin as loading control, normalized to an arbitrary value of 1 obtained with pLKO control cells. Results are representative of three independent experiments.

were performed. Hence, pLKO cells were treated by sh YKL-40 exosomes (30µg/mL) for 24 hours, whereas sh YKL-40 cells were treated by pLKO exosomes (30µg/mL) in same conditions. Each condition was compared to untreated cells and pLKO cells treated by pLKO exosomes as controls.

Internalization of exosomes in recipient cells was visualized by using exosomes labelled with green fluorescent dye PKH67 [40] and quantified by flow cytometry. In each condition, exosomes (30µg/mL) were

uptaken as soon as 30 minutes after their addition to reach a maximum for both at 24 hours (Figure 4A).

To investigate the effects of exosomes on cell proliferation, BrdU was incorporated to cell culture (Figure 4B). As shown previously in Figure 1B, without exosome treatment, cell proliferation significantly decreased in sh YKL-40 cells compared to pLKO cells ($P=0.0008$). In contrast, proliferation was restored in sh YKL-40 cells treated by pLKO exosomes ($P= 0.0005$). Conversely, the proliferation of pLKO cells treated by sh

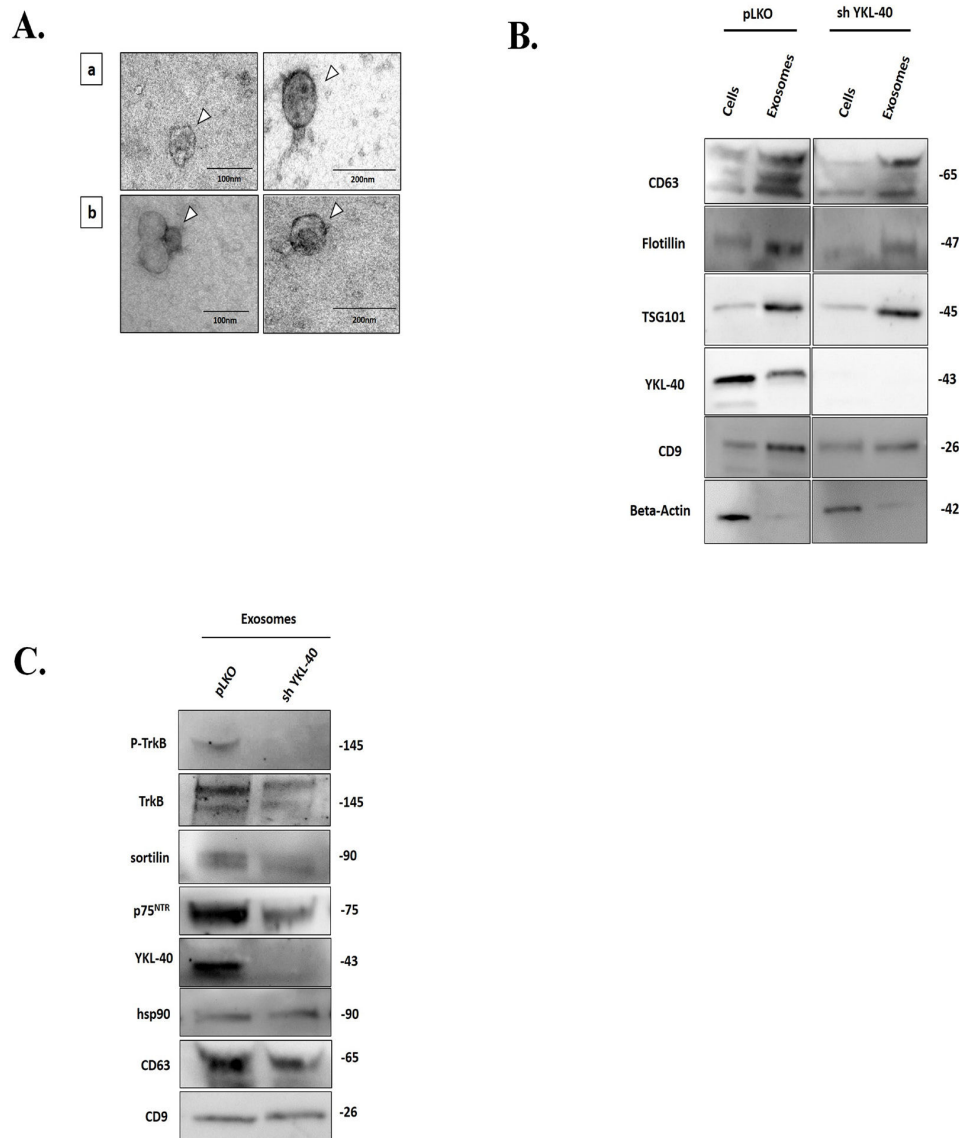


Figure 3: Composition of neurotrophin receptors in exosomes purified from pLKO and sh YKL-40 cells. **A.** Electron Microscopy (EM) of nanovesicles, (arrow) obtained after ultracentrifugation (120,000g) of supernatant, validates intact vesicles (40 to 150 nm) derived from pLKO (a) and sh YKL-40 (b) cells, 93000X, scale bar, 100 nm and 200 nm. **B.** Comparison of different marker expression in both cell lines (pLKO and sh YKL-40 cells) and in their derived exosomes. Expression of CD63, Flotillin, TSG101, YKL-40, CD9 and actin was analyzed by western blotting in exosomes and cells for pLKO and sh YKL-40 cell lines. **C.** Comparative expression of P-TrkB, TrkB, sortilin, p75^{NTR}, YKL-40 and three exosome markers (HSP90, CD63, and CD9) in pLKO- and sh YKL-40-exosomes by western blotting.

YKL-40 exosomes significantly decreased ($P=0.0458$), demonstrating that the induction of proliferation may depend on exosome origin. Interestingly, proliferation

of sh YKL-40 cells treated with pLKO exosomes was significantly decreased by addition of K252a, a tyrosine kinase inhibitor for Trks [41] (Figure 4B, $P=0.0006$).

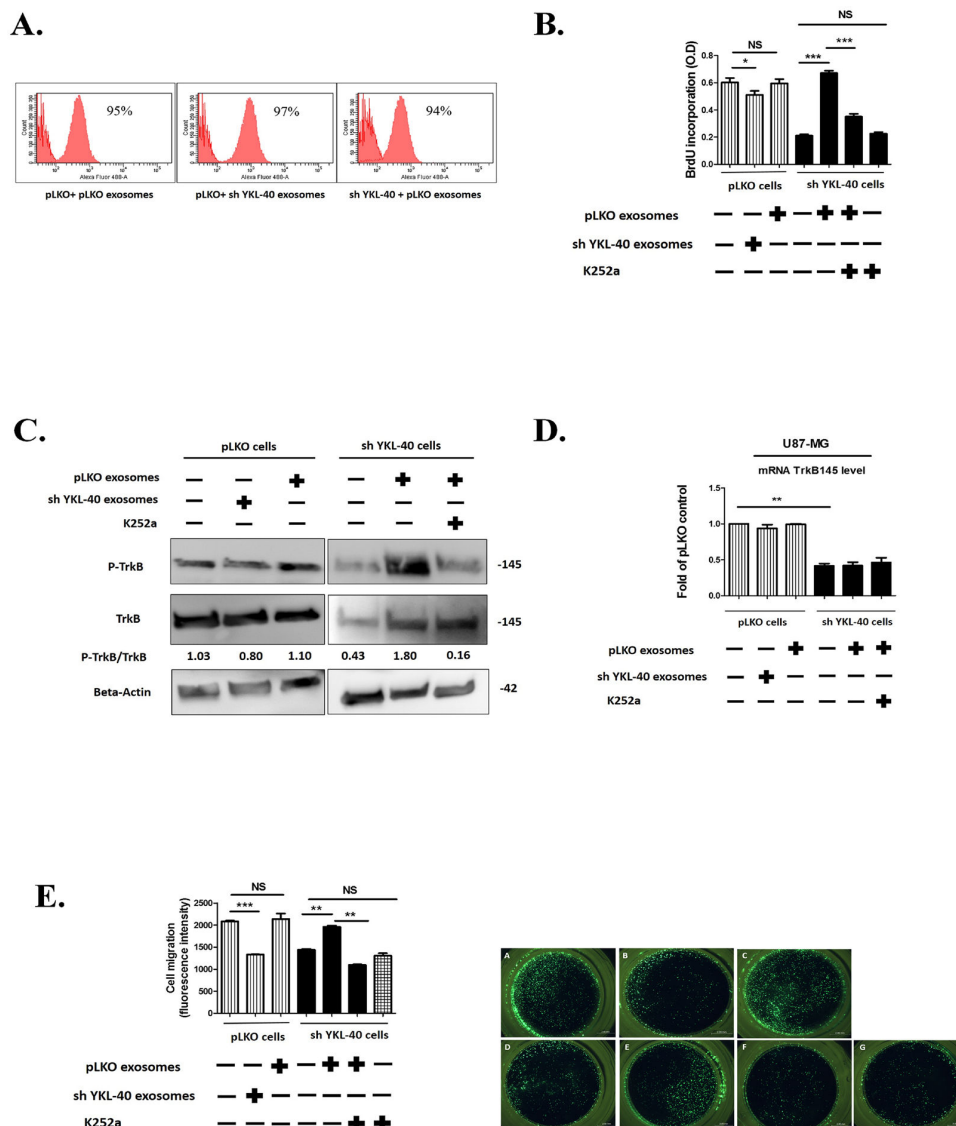


Figure 4: Functional properties of pLKO and sh YKL-40-exosomes. **A.** Internalisation of pLKO or sh YKL-40 exosomes (30 μ g/mL) in recipient cells. The exosome uptake was quantified by using labelled exosomes with PKH67 at the same concentration for 24h and was analysed by flow cytometry. **B.** A representative experiment of proliferation analyzed by BrdU incorporation in sh YKL-40 or control pLKO cells after a 24-hour co-culture with 30 μ g of pLKO- or sh YKL-40-derived exosomes with or without 100 nM of K252a. Histograms were representative of three independent experiments (Student's t-test, $*P < 0.05$; $***P < 0.001$). **C.** Expression of phospho-TrkB and TrkB proteins in pLKO or sh YKL-40 cells after a 24-hour co-culture with 30 μ g of pLKO or sh YKL-40 exosomes with or without treatment of 100 nM of K252a. **D.** Quantification of TrkB mRNA (qRT-PCR) in pLKO or sh YKL-40 cells in presence of exosomes in same experimental conditions as in C. Data were normalized to GAPDH and plotted as means $\pm$ SD compared to controls (Student's t-test, $**P < .01$). **E.** Right part: Invasion assay were used to detect HBMEC migration. HBMEC cells (15,000/well) were added to the upper chamber. In the lower chamber, we placed 75,000 cells /well of either pLKO cells alone (A), or pretreated for 24 h with 30 μ g of sh YKL-40-exosomes (B) or pretreated for 24 h with 30 μ g of pLKO-exosomes (C) or sh YKL-40 cells alone (D), or pretreated for 24 h with 30 μ g of pLKO-exosomes (E, F) with 100 nM of K252a. (F, G) After 18 hours, the number of HBMEC cells that migrated to the lower chamber through the 8 μ m pore-sized membrane was analyzed by taking photos and counting the number of cells per visual field. Left part: Histograms representing five independent experiments. (Student's t-test $*P < .05$; $**P < .01$; $***P < .001$).

This result suggests that cell proliferation induced by the exosome transfer depends on tyrosine kinase neurotrophic receptors.

Given the role of TrkB in the growth of GSCs and glioblastoma cells [12], we next studied TrkB expression and phosphorylation in pLKO and sh YKL-40 cells treated or not by exosomes. TrkB protein expression was increased in sh YKL-40 cells treated by pLKO exosomes (Figure 4C) without increase of TrkB transcripts (Figure 4D) assessing that TrkB expression resulted in exosome protein transfer (Supplementary Figure S5). In contrast, TrkB expression was unchanged when pLKO cells were treated with sh YKL-40 exosomes (Figure 4C). Remarkably, TrkB was phosphorylated in sh YKL-40 cells exposed to exosomes from pLKO cells. This activation was suppressed by k252a inhibitor (Figure 4C), supporting that exosomes induced TrkB activation in recipient cells. In contrast, TrkB activation in pLKO cells was undetectable when exosomes were isolated from sh YKL-40 cells (Figure 4C).

Without exosome treatment, sh YKL-40 cells significantly decreased HBMEC migration compared to pLKO cells ($P=0.0006$). Then, we searched for the exosome capacity to rescue the lack of migratory effect of sh YKL-40 on HBMEC migration in a Boyden chamber (Figure 4E). Interestingly, sh YKL-40 cells pretreated with pLKO exosomes before insertion in lower chamber, restored the migration of HBMEC ($P=0.0022$). In addition, the role of TrkB activation in inducing HBMEC migration is supported by the inhibition of migration by the concomitant incubation with K252a Trk inhibitor ($P=0.0023$). As observed above for cell proliferation, HBMEC migration was significantly decreased in pLKO cells pretreated with sh YKL-40 exosomes ($P=0.0004$) (Figure 4E). These results suggest that pLKO exosomes restored the functional properties (proliferation and endothelial cell migration) of sh YKL-40 cells, through the transfer and activation of TrkB, and that inactivated cells for YKL-40 released exosomes with suppressive functions.

Considering the previous *in vitro* results, we have studied the effect of the two types of exosomes on tumor growth in mice.

Tumor growth was diminished by exosomes from YKL-40-inactivated cells

Experimental tumors were developed by subcutaneous injections of pLKO or sh YKL-40 cells into one flank of SCID mice. For each group, 15 mice were used. After one week, pLKO or sh YKL-40 xenografts were treated twice a week, during three weeks, by pLKO exosomes, sh YKL-40 exosomes or PBS as control. To evaluate the effects of exosomes in recipient tumors and avoid spreading and accumulation in other tissues [42], exosomes (30 μ g/mL) were injected in hydrogel suspension closely to the tumor site, to allow local and progressive exosome release.

When sh YKL-40 cells were injected, we failed to obtain any tumor, whatever the amount of graft cells or exosome treatment (data not shown). In contrast, pLKO cells induced tumors with a mean volume of 100 mm³ (Figure 5A). Tumor volumes were unchanged after treatment by pLKO exosomes (Figure 5A). Strikingly, pLKO tumors treated with sh YKL-40 exosomes were significantly smaller (Figure 5A; $P=0.0070$). In addition, cell proliferation, evaluated by Ki67 staining, was diminished in pLKO tumors treated by sh YKL-40 exosomes, compared to untreated pLKO tumors (Figure 5B). These data are consistent with those obtained for *in vitro* proliferation experiments (Figure 4B).

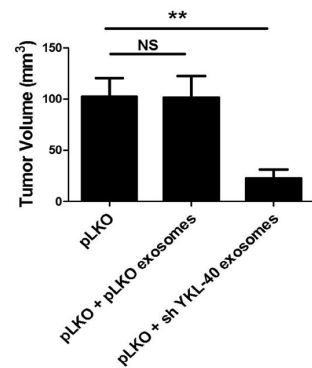
In addition, several markers related to tumor angiogenesis (CD31) [43] or to undifferentiated state cell (YKL-40 and Oct-4) were analysed in xenografts (Figure 5B). Expression of main markers was unchanged after treatment of tumors by pLKO exosomes. However, CD31 expression decreased in pLKO tumors treated by sh YKL-40 exosomes, suggesting that tumor angiogenesis was inhibited by exosome treatment. Both YKL-40 and Oct-4 expressions decreased in pLKO tumors treated by sh YKL-40 exosomes compared to untreated tumors. To determine whether expression of neurotrophin receptors in tumors could depend on exosomes content, TrkB, p75^{NTR} and sortilin expressions were evaluated. While *in vitro* TrkB remains detectable (Figure 4C), its expression was clearly reduced in pLKO tumors treated by sh YKL-40 exosomes. A similar decrease was observed for p75^{NTR} and sortilin. Altogether, these data demonstrated sh YKL-40 cell exosomes reduced tumor growth and undifferentiated markers (YKL-40 and Oct-4) as well as TrkB, p75^{NTR} and sortilin expressions.

According that TrkB expression was detected in exosomes from glioblastoma cells in cultures; we have extended this study to exosomes from glioblastoma patients.

TrkB is detected in plasma exosomes from GBM patients

Given that exosomes are accessible from body fluids, it could represent a promising source of biomarkers for cancer diagnosis [44]. We have determined whether TrkB detection in exosomes isolated from plasma GBM patients could constitute a new biomarker of GBM. Exosomes were purified by ultracentrifugation from plasma of GBM patients ($n=11$) and healthy donors ($n=6$) before analyzing TrkB and CD9 expression. Exosomes were characterized by CD9 expression, a tetraspanin specifically enriched in their membrane. Interestingly, we found that in all cases ($n=11$), both TrkB isoforms were detected in exosomes from GBM patients and totally absent in the age-matched controls ($n=6$) (Figure 6). It is noteworthy that TrkB expression levels varied in patients' exosomes, some of them exhibiting a high overexpression (Figure 6).

A.



B.

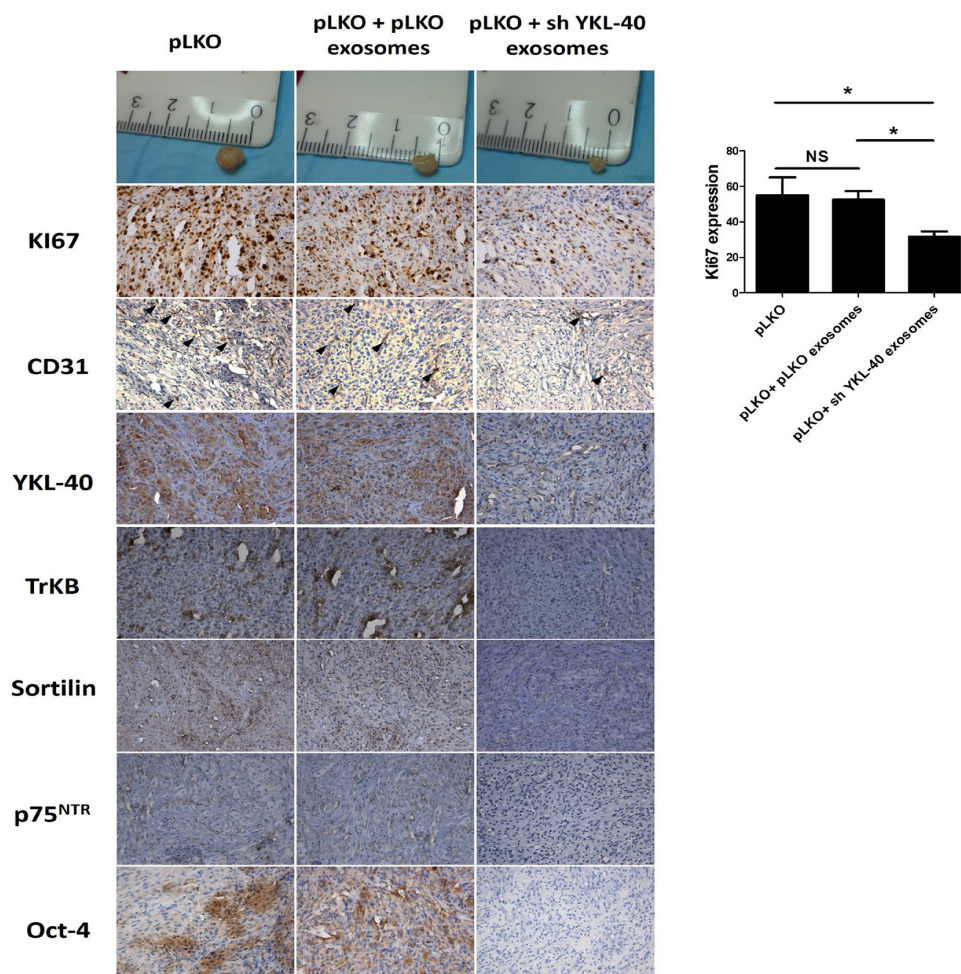


Figure 5: SCID mouse heterotopic xenograft model. **A.** pLKO cells were subcutaneously injected into SCID mice (n=15 mice per group). Tumors were developed at week 1. One week after pLKO cell xenografts, animals were treated by local injection with PBS/hydrogel (control) or 30µg of pLKO or sh YKL-40 exosomes/hydrogel twice per week during three weeks. Tumor volume and tumor weights were determined at the end of the treatment. Data are presented as the mean ± SD, ***P* < .01 compared to PBS controls by ANOVA. **B.** Proliferation visualized by Ki67 staining decreased in pLKO-derived tumor treated by sh YKL-40 exosomes. Immunohistochemical stainings performed in xenograft tumors showed a similar decrease in TrkB, Sortilin, p75^{NTR}, Oct-4 and endothelial marker CD31 expression. Scale Bar, 50µm.

DISCUSSION

This study supports a new function of glioblastoma-derived exosomes in the transfer of neurotrophin receptors to promote glioma cell aggressiveness. Several studies have already reported the oncogenic functions on neurotrophin receptors, overexpressed in several cancers such as glioblastoma [12, 14, 45]. Neurotrophin signalling also contributes to tumor cells and GSCs survival and growth promoting aggressiveness and therapeutic resistance [12]. The importance of exosomes in the spreading of biological aggressiveness was reported in prostate cancer cells in which exosomes enhance invasiveness, stemness and induce microenvironment changes [46, 47]. Since our previous findings have demonstrated that TrkB is expressed in exosomes from lung cancer cells [16], we hypothesized that the transfer of TrkB through exosomes in GBM may play a key role to spread aggressiveness in the microenvironment and promote tumorigenesis. Additionally, the content of exosome released by stem cells depends on cell differentiation [48].

In order to study the loss of tumor aggressiveness, *YKL-40*, a gene coding for a cancer stem cell marker [30, 49] was inactivated in glioblastoma cells. Its silencing induced both a decrease of cell proliferation as previously shown [30] and HBMEC migration confirming the role of *YKL-40* in the control of vascular endothelial cells and tumor angiogenesis [25, 50, 51]. Moreover, *YKL-40* silencing led to a significant decrease of neurosphere-forming cells as well as a loss of the main markers of GSCs. These data correlated with the cell-sorting elution profile of sh *YKL-40* cells, confirming the loss of undifferentiated cells. These results supported stemness properties of *YKL-40* [49], considered as a mesenchymal marker expressed in high grade glioma [46]. Altogether, these data suggested that the decrease of these functional properties is closely linked to the differentiation state of *YKL-40*-silenced cells. The impairment of proliferation, induction of HBMEC migration and neurosphere-forming

cells in sh *YKL-40* cells, suggest that these cells acquired a low aggressive phenotype.

This loss of aggressiveness in *YKL-40*-silenced cells also influences neurotrophins and neurotrophin-receptor expression. Indeed, *YKL-40* silencing significantly decreased TrkB, p75^{NTR} and sortilin expression. These data demonstrate that neurotrophin receptors expression also depend on *YKL-40*-expressing cells and related to their differentiated state. Their reduced expressions could also prevent their major role in GSC proliferation and glioblastoma growth [12, 47]. Such results were not previously described. We hypothesize that *YKL-40* may play a putative role on the regulation of neurotrophin receptors expression and GBM cells activation. Indeed, the relationship between *YKL-40* and neurotrophins has been already reported in peripheral nervous system. In this tissue, NGF (Nerve growth factor) stimulation induces increased expression of *YKL-40* suggesting that NGF has potential effects on matrix turnover activity [52]. This relationship could be related to the decreases neurotrophin receptor expression and activation induced by *YKL-40* silencing in U87-MG cells. Furthermore, the analysis of glioblastoma secretome revealed the presence of *YKL-40* secreted by glioma stem cells, able to induce malign transformation of normal neural precursor cells [53]. These previous data suggest that *YKL-40* could regulate neurotrophin receptors expression and GBM cells activation.

The protein content of exosomes was modified by *YKL-40* silencing and could alter the intercellular transfer of oncogenic receptors between cells, as previously reported for EGFRvIII in glioblastoma [8, 36]. Similarly, the expression of neurotrophin receptors, TrkB, p75^{NTR} and sortilin, were decreased in sh *YKL-40*-derived exosomes. Interestingly, exosomes from pLKO cells contained phosphorylated TrkB and not sh *YKL-40* exosomes. A similar transfer of phosphorylated oncogenic receptor through exosomes was previously described for EGFR in glioma cells [54].

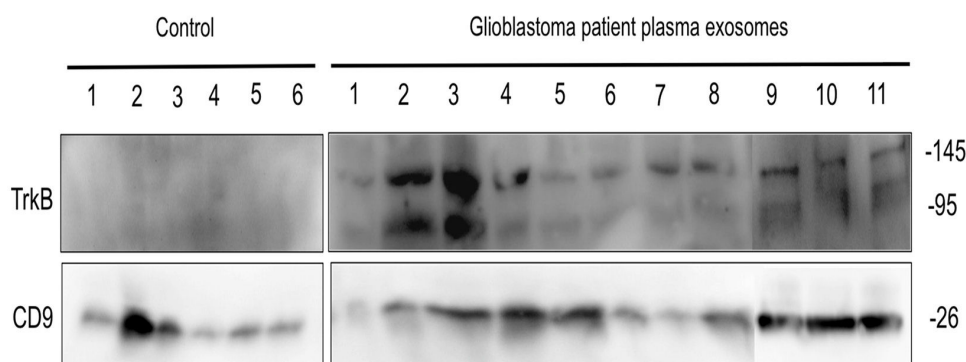


Figure 6: TrkB expression in exosomes from GBM patients. Exosomes isolated from GBM patients plasma (n=11) and age-matched control subjects (n=6) were analyzed for TrkB by western blotting. CD9 exosome marker was used as loading control.

To determine whether TrkB receptor expression in exosomes could modify the activation of surrounding cells and communication with microenvironment, recipient cells were treated with distinct exosomes. Whatever the recipient cells, the exosomes were internalized. Treatment of sh YKL-40 cells with pLKO exosomes significantly restored their proliferation and their ability to enhance HBMEC migration compared to sh YKL-40 cells alone. By contrast, both mechanisms were affected in PLKO cells treated by sh YKL-40 exosomes, depleted in TrkB. Thus, we hypothesized that TrkB receptors contained in pLKO exosomes could re-establish the biological functions of sh YKL-40 cells. TrkB contained in pLKO exosomes could support these functions. Indeed, inhibition of functional rescue by K252a, a pan-Trk inhibitor [41], inhibiting TrkB activation, suggested that TrkB is implicated in these mechanisms, since TrkA was absent and TrkC was unchanged whatever cell types. TrkB mRNA expression level was unchanged in sh YKL-40 cells suggesting that the increase of TrkB receptor into sh YKL-40 cells is mainly due to its protein transfer through exosomes as already demonstrated with c-kit [55]. Furthermore, the transfer of TrkB may affect recipient cell signalling, since TrkB phosphorylation was upregulated in sh YKL-40 cells treated with pLKO exosomes. A similar mechanism has been reported with c-kit-containing exosomes that activate proliferation and PI3K dependent-signalling pathway [55]. Moreover, TrkB phosphorylation was slightly reduced by treatment of pLKO cells with sh YKL-40 exosomes. These results point out a new mechanism, depending on the transfer of TrkB-containing exosomes, able to spread aggressiveness and invasiveness to surrounding cells.

Xenografts in mice showed that YKL-40-inactivated cells failed to induce tumors whatever the amount of grafted cells. These data correlated with previous reports showing that YKL-40-neutralizing-antibody treatment blocks xenograft tumor growth [56]. Herein, we validated that U87-MG cells inactivated for YKL-40 lose their tumorigenic properties due to the lack of aggressive GSCs [57]. Thus, the cross transfer of tumorigenic activity by pLKO exosomes could not be determined in this condition.

However, tumors induced by pLKO cells treated by sh YKL-40 exosomes significantly reduced their volumes, proliferation rates and vascularization (decrease of CD31 expression) suggesting that exosome contents may inhibit tumorigenic mechanisms by modulating angiogenesis. These data correlated with previous study demonstrating that anti-YKL-40 antibodies inhibited angiogenesis in glioblastoma [58] supporting the functions YKL-40 in glioblastoma vascularization [51]. The inhibition of tumor angiogenesis through exosomes from mesenchymal stem cells, was also associated to a down-regulation of VEGF expression [59]. By comparison to sh YKL-40, pLKO tumor growth was unchanged after treatment with pLKO exosomes, suggesting that the additional effect on tumorigenic mechanisms is specific to YKL-40-inactivated cells. The lack of neurotrophin receptors in sh

YKL-40 exosomes as shown *in vitro*, was not sufficient to explain the reduction of YKL-40, TrkB, p75^{NTR} and sortilin expression in treated pLKO xenografts. Indeed, the repeated addition of sh YKL-40 exosomes derived from their inactivated cells, seemed to downregulate cell proliferation and modulate differentiated cell state in regards to Oct4, a specific GSC marker and YKL-40 expression depletion. Among the different microRNA identified in GBM, one of them, miR-128a, is associated to the down-regulation of YKL-40 expression in U 87-MG cells [28]. Such mechanisms depending on miRNA could be hypothesized. Indeed, the tumor growth inhibition could also depend on variation contents of specific miRNA transferred by sh YKL-40 exosomes.

In conclusion, we revealed the essential role of exosomes in communication between cancer cells and surrounding stroma and demonstrated that TrkB expression in exosomes is required for inducing aggressiveness phenotype. A similar mechanism was already described with the transfer of activated oncogenic tyrosine kinases receptor, EGFRvIII [8]. In this study, we highlighted that according to the differentiation state and YKL-40 expression, cancer cell-derived exosomes display different neurotrophin expression in glioblastoma. TrkB transfer depends on exosomes, which could contribute to spread the aggressive phenotype to surrounding cells into the microenvironment. Such a mechanism might play a key role in a several types of human tumors. Since our results indicate that TrkB is detected in exosomes from plasma patients, its potential role as a biomarker should be assessed on a large panel of glioblastoma patients and its expression compared according to the glioma grade.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

Human GBM cell lines U87-MG were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). Three different lentiviral plasmids (pLKO.1, Sigma-Aldrich) containing shRNA sequences (Sigma-Aldrich) to *YKL-40 gene* were used to generate a stable YKL-40 silenced U87-MG cell line using the packaging cell line HEK-293T [16]. HEK-293T cells were transfected by JetPEI and pLKO-YKL-40 or empty pLKO plasmids (Invitrogen, Life Technologies). Lentivirus particles were added to U87-MG, and after 48 h infected cells were selected with puromycin (1µg/mL) and YKL-40 silencing was controlled by qPCR and western blotting analysis for each clones (data not shown).

Two derived cell lines from U87-MG cells were used in this study: human empty vector pLKO control cells and sh YKL-40 cells. Human Brain Microvascular Endothelial Cells (HBMECs, Lonza) were cultured as described previously [16].

Cell culture

pLKO and sh YKL-40 cell lines were grown in complete medium containing Minimum Essential Medium (MEM) (Lonza) supplemented with 10% FBS (Life Technologies), 2% sodium bicarbonate, 1% sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids solution and 1% penicillin/streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air.

To obtain neurospheres, sh YKL-40 cells and pLKO cells were grown in defined medium (serum-free neural stem cell medium) corresponding to Neurobasal/ Glutamax (Invitrogen) supplemented with 1% N2 and 2% B27 (Invitrogen) and 20 ng/mL epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 (PeproTech) [34, 60]. After a 4-day culture, both cell lines formed primary neurospheres. Primary neurospheres were dissociated and sh YKL-40 cells (sh YKL-40-DM) or pLKO cells (pLKO-DM) were seeded to form secondary neurospheres.

Treatments with a Pan -Trk inhibitor k252a (100 nM) or dimethyl sulfoxide (DMSO) for 24 h were performed on 1.5 x 10⁵ cells cultured in 6-well plates.

Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)

Qiagen RNeasy kit (Qiagen) was used to isolate total RNA from cells at day 15 after lentiviral infection as previously described [16]. Briefly, 100 ng cDNA was used for each PCR reaction, performed with TaqMan on ABI Step One Plus real-time thermal cycler (Applied Biosystems). PCR primers for both full-length and truncated form of TrkB, sortilin, TrkC, p75^{NTR}, NGF, BDNF, NT3, YKL-40 and GAPDH mRNA were designed and used for PCR amplification with Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics) (Supplementary Table S1).

Western blotting analysis

Cells and exosomes were lysed in lysis buffer [50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 100µg/ml phenylmethylsulphonyl fluoride, 0.5 µg/ml leupeptin, and 1 µg/ml aprotinin]. Protein concentrations were determined using a Micro BCA™ protein assay kit (Pierce Biotechnology). Equal amounts of protein were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked with 5% skim milk in TBS containing 0.1% Tween-20 for 2 h at room temperature and incubated with the appropriate primary and secondary antibodies. Antibodies against CD63 (HPA010088, 1/1000) and β-actin (A 5316, 1/10000) were purchased from Sigma-Aldrich. Antibodies against YKL40 (ab77528, 1/1000), sortilin (ab16640, 1/1000), CD9 (ab92726, 1/1000) and HSP90 (ab13492, 1/1000), TSG101 (ab30871, 1/1000) were obtained from Abcam.

Antibodies against TrkA (AF175, 1/200) TrkB (MAB397, 1/200), TrkC(AF1404, 1/200) and P75^{NTR} (AF1157, 1/1000) were purchased from R&D System. Antibodies against NT3 (5237SC, 1/1000), Sox2 (3579S, 1/1000), Oct4 (2750S, 1/1000) and flotillin (18634S, 1/1000) were purchased from Cell Signaling Technology. Antibodies against NGF (sc-548, 1/200) and BDNF (sc-20981, 1/200) were purchased from Santa Cruz Biotechnology.

Cell sorting method

The cell sorting was performed by an antibody-free elution method based on Sedimentation field-flow fractionation (SdFFF) method, able to isolate undifferentiated glioma stem cells as previously described [34]. SdFFF is a gentle and non-invasive cell sorting method by limiting cell-solid phase interactions by the use of 1) an empty ribbon-like channel without a stationary phase; and 2) the “hyperlayer” elution mode, a size/density driven separation mechanism. The, large and less dense cells are focused in the faster streamlines and are eluted in first fraction (F1) while the small and dense cells are eluted in last fraction (F3) [35, 61]. Cell sorting was realized with pLKO or sh YKL-40 cells cultured in FCS-containing medium as well as in defined-medium.

Exosomes purification and characterization

Exosomes were isolated from pLKO and sh YKL-40 cells cultured at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere in complete medium (MEM with 5% exosome-free FCS, previously centrifuged for 16 h at 120,000 x g to remove bovine exosomes). Cell supernatants were harvested after 48 h in culture to purify exosomes by differential centrifugation [37]. Briefly, supernatants were firstly centrifuged at 16,500 x g for 30 min at 4°C. Next, exosomes were pelleted by ultracentrifugation at 100,000 x g for 80 min at 4°C, washed in PBS and re-centrifuged at 100,000 x g for 2 h at 4°C. For each exosome preparation, the concentration of total proteins was quantified by BioRad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA).

Exosomes control by electron microscopy: vesicle suspensions for electron microscopy were further diluted 1:10 with PBS and 5µl suspension was applied to glow-discharged formvar-carbon films on copper 200 mesh Ni (Agar scientific). The adsorbed exosomes were negatively stained with 1% aqueous uranyl acetate. The samples were examined with a Jeol 1011 electron microscope (JEOL) equipped with an AMT XR60B digital camera (Advanced Microscopy Techniques).

Exosomes conditioning cell cultures: To study effects of exosomes released from the two cell types on recipient cells, 30µg/mL of exosomes derived from pLKO cells were added to shYKL-40 cells. Inversely, 30µg/mL of exosomes derived from shYKL-40 cells were added to pLKO cells. After 24 hours, proliferation, migration assays and western blotting were performed.

Internalization of exosomes in recipient cells was visualized by using exosomes labelled with green fluorescent dye PKH67 [40] and quantified by flow cytometry.

Separation of vesicles on sucrose gradient

Exosomes purified from pLKO and sh YKL-40 cells were resuspended in 400 μ L PBS-2.5M sucrose, loaded in a SW41 tube and overlaid with 15 successive 600 μ L layers of PBS containing decreasing concentrations of sucrose (from 2.5 to 0.2 M). Tubes were centrifuged for 16 hours at 4°C at 200,000 g. 1 mL fractions were collected; sucrose density was measured on an aliquot of each on a refractometer, and fractions were diluted in 2 ml PBS, ultracentrifuged at 100,000 g for 1 hour and resuspended in lysis buffer before analysis by Western blotting [38].

Proliferation assays

BrdU cell proliferation assays (Calbiochem) were carried out according to the manufacturer's protocol. After a 24-h cell exposure to exosomes, BrdU was added for 4 h to the culture medium before measurement of absorbance at dual wavelengths of 450 and 590 nm.

Invasion assays

Invasion assays were performed in BD Biocoat Matrigel 24-well plates (BD Biosciences). Briefly, 25×10^3 HBMECs were seeded in a transwell insert. Assays were performed by inserting pLKO or sh YKL-40 cells in the lower chamber or exosomes derived from these cells. Then, pLKO cells previously treated with 30 μ g/mL sh YKL-40 exosomes for 24h, or sh YKL-40 cells treated with 30 μ g/mL pLKO exosomes for 24h, were added to the lower chamber and incubated with HBMEC cells during 20 h at 37 °C / 5% CO₂. Then, HBMEC in the upper chamber were stained with 50 μ M calcein AM (BD Biosciences) for 30 min. Non-invading cells in the upper part of the insert were carefully removed. Cells were seeded in triplicate for each cell line. Five independent assays were performed. Invading cells were visualized using a fluorescence microscope MZFL3 (Leica). Fluorescence intensity related to cell density by well was quantified by ImageJ. Histograms are presented as means $\pm$ SD.

Tumor xenografts in mice

Female NOD/SCID mice (Janvier, Saint Berthevin, France) were injected subcutaneously with 1×10^6 pLKO or sh YKL-40 cells in 50 μ L of PBS. Three groups of 15 mice per group were treated one week after cell injection with either PBS/hydrogel (controls), 30 μ g/mL pLKO exosomes/hydrogel or 30 μ g/mL sh YKL-40 exosomes/hydrogel, bi-weekly for three weeks. Mice were evaluated

bi-weekly to measure tumor volumes ($V = 0.5$ (length $\times$ width²) before sacrificing the animals ($n=37$). The experimental procedures were in accordance with the guidelines of Institutional Animal Care and the French National Ethics Committee. All comparisons between groups were performed by ANOVA using Statview 5.0 (Abacus Concepts). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Immunohistochemistry

Animals were sacrificed after four weeks and tumors were removed. Hematoxylin–eosin (H&E) staining and immunohistochemistry were performed on 4 μ m serial coronal sections from paraffin-embedded tumors. Tissue sections were prepared as previously described [62]. Tissue sections were incubated with antibodies against human Ki67 (1/50, Dako), CD31 (1/30, Histonova), YKL-40 (1/1000, Abcam), TrkB (1/200, R&D), p75^{NTR} (1/300, Santa Cruz), sortilin (1/1000, BD bioscience) and Oct4 (1/200) according to the manufacturer's instructions (Boster Bioengineering Company Limited). Anti-rabbit (1/1000) and anti-mouse (1/1000) immunoglobulins HRP EnVision™+ system (Dakocytomation, Glostrup) and DAB (DakoCytomation) were used for the staining revelation.

Collection of plasma from glioblastoma patients

Plasma samples from 11 confirmed glioblastoma patients before brain tumor surgery and 6 age-matched controls were collected using the same protocol [36] after informed consent and approval by the Ethics Committee of the Limoges University Hospital (Protocol 141-2014-08). These samples were kept at -80°C until use.

Statistical analysis

Treatments, proliferation assay, relative fluorescence intensities, RT-qPCR and western blotting experiments were compared to controls using Statview 5.0 software. Data are presented as means $\pm$ SD for at least three independent experiments. Comparisons between groups were analyzed by ANOVA or Student's t-test. $P < 0.05$ was considered significant (* $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Limousin regional council and funded by “*Ligue Contre le Cancer*”.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016; 131:803-820.
- Kesari S, Schiff D, Henson JW, Muzikansky A, Gigas DC, Doherty L, Batchelor TT, Longtine JA, Ligon KL, Weaver S, Laforme A, Ramakrishna N, Black PM, Drappatz J, Ciampa A, Folkman J, et al. Phase II study of temozolomide, thalidomide, and celecoxib for newly diagnosed glioblastoma in adults. *Neuro Oncol.* 2008; 10:300-308.
- Akiyama Y, Ashizawa T, Komiyama M, Miyata H, Oshita C, Omiya M, Iizuka A, Kume A, Sugino T, Hayashi N, Mitsuya K, Nakasu Y, Yamaguchi K. YKL-40 downregulation is a key factor to overcome temozolomide resistance in a glioblastoma cell line. *Oncol Rep.* 2014; 32:159-166.
- Pelloski CE, Mahajan A, Maor M, Chang EL, Woo S, Gilbert M, Colman H, Yang H, Ledoux A, Blair H, Passe S, Jenkins RB, Aldape KD. YKL-40 expression is associated with poorer response to radiation and shorter overall survival in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:3326-3334.
- Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Larocca LM, Peschle C, De Maria R. Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ.* 2006; 13:1238-1241.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 432:396-401.
- Chen Y, Wang Z, Dai X, Fei X, Shen Y, Zhang M, Wang A, Li X, Huang Q, Dong J. Glioma initiating cells contribute to malignant transformation of host glial cells during tumor tissue remodeling via PDGF signaling. *Cancer Lett.* 2015; 365:174-181.
- Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature Cell Biology.* 2008; 10:619-U624.
- Bourkoula E, Mangoni D, Ius T, Pucer A, Isola M, Musiello D, Marzinotto S, Toffoletto B, Sorrentino M, Palma A, Caponnetto F, Gregoraci G, Vindigni M, Pizzolitto S, Falconieri G, De Maglio G, et al. Glioma-Associated Stem Cells: A Novel Class of Tumor-Supporting Cells Able to Predict Prognosis of Human Low-Grade Gliomas. *Stem Cells.* 2014; 32:1239-1253.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* 2001; 294:1945-1948.
- Thiele CJ, Li Z, McKee AE. On Trk—the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:5962-5967.
- Lawn S, Krishna N, Pisklakova A, Qu X, Fenstermacher DA, Fournier M, Vrionis FD, Tran N, Chan JA, Kenchappa RS, Forsyth PA. Neurotrophin signaling via TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells. *J Biol Chem.* 2015; 290:3814-3824.
- Xiong J, Zhou L, Yang M, Lim Y, Zhu YH, Fu DL, Li ZW, Zhong JH, Xiao ZC, Zhou XF. ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells *in vitro*. *Neuro Oncol.* 2013; 15:990-1007.
- Johnston ALM, Lun X, Rahn JJ, Liacini A, Wang L, Hamilton MG, Parney IF, Hempstead BL, Robbins SM, Forsyth PA, Senger DL. The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. *Plos Biology.* 2007; 5:1723-1737.
- DeWitt J, Ochoa V, Urschitz J, Elston M, Moisyadi S, Nishi R. Constitutively active TrkB confers an aggressive transformed phenotype to a neural crest-derived cell line. *Oncogene.* 2014; 33:977-985.
- Wilson CM, Naves T, Vincent F, Melloni B, Bonnaud F, Lalloue F, Jauberteau MO. Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J Cell Sci.* 2014; 127:3983-3997.
- Boot RG, van Achterberg TA, van Aken BE, Renkema GH, Jacobs MJ, Aerts JM, de Vries CJ. Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis: chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:687-694.
- De Ceuninck F, Gauffillier S, Bonnaud A, Sabatini M, Lesur C, Pastoureaux P. YKL-40 (cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 285:926-931.
- Salvatore V, Focaroli S, Teti G, Mazzotti A, Falconi M. Changes in the gene expression of co-cultured human fibroblast cells and osteosarcoma cells: the role of microenvironment. *Oncotarget.* 2015; 6:28988-28998.
- Nordenbaek C, Johansen JS, Junker P, Borregaard N, Sorensen O, Price PA. YKL-40, a matrix protein of specific granules in neutrophils, is elevated in serum of patients with community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *J Infect Dis.* 1999; 180:1722-1726.
- Cintin C, Johansen JS, Christensen IJ, Price PA, Sorensen S, Nielsen HJ. Serum YKL-40 and colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1999; 79:1494-1499.
- Hogdall EV, Johansen JS, Kjaer SK, Price PA, Christensen L, Blaakaer J, Bock JE, Glud E, Hogdall CK. High plasma YKL-40 level in patients with ovarian cancer stage III is related to shorter survival. *Oncol Rep.* 2003; 10:1535-1538.

23. Jensen BV, Johansen JS, Price PA. High levels of serum HER-2/neu and YKL-40 independently reflect aggressiveness of metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003; 9:4423-4434.
24. Tanwar MK, Gilbert MR, Holland EC. Gene expression microarray analysis reveals YKL-40 to be a potential serum marker for malignant character in human glioma. *Cancer Res*. 2002; 62:4364-4368.
25. Ku BM, Lee YK, Ryu J, Jeong JY, Choi J, Eun KM, Shin HY, Kim DG, Hwang EM, Yoo JC, Park JY, Roh GS, Kim HJ, Cho GJ, Choi WS, Paek SH, et al. CHI3L1 (YKL-40) is expressed in human gliomas and regulates the invasion, growth and survival of glioma cells. *Int J Cancer*. 2011; 128:1316-1326.
26. Iwamoto FM, Hottinger AF, Karimi S, Riedel E, Dantis J, Jahdi M, Panageas KS, Lassman AB, Abrey LE, Fleisher M, DeAngelis LM, Holland EC, Hornig A. Serum YKL-40 is a marker of prognosis and disease status in high-grade gliomas. *Neuro Oncol*. 2011; 13:1244-1251.
27. Huse JT, Phillips HS, Brennan CW. Molecular subclassification of diffuse gliomas: seeing order in the chaos. *Glia*. 2011; 59:1190-1199.
28. Ma X, Yoshimoto K, Guan Y, Hata N, Mizoguchi M, Sagata N, Murata H, Kuga D, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T. Associations between microRNA expression and mesenchymal marker gene expression in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2012; 14:1153-1162.
29. Shao R, Taylor SL, Oh DS, Schwartz LM. Vascular heterogeneity and targeting: the role of YKL-40 in glioblastoma vascularization. *Oncotarget*. 2015; 6:40507-40518.
30. Cheray M, Petit D, Forestier L, Karayan-Tapon L, Maftah A, Jauberteau MO, Battu S, Gallet FP, Lalloue F. Glycosylation-related gene expression is linked to differentiation status in glioblastomas undifferentiated cells. *Cancer Lett*. 2011; 312:24-32.
31. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003; 63:5821-5828.
32. Gangemi RM, Griffiro F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, Ravetti GL, Zona GL, Daga A, Corte G. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells*. 2009; 27:40-48.
33. Du Z, Jia D, Liu S, Wang F, Li G, Zhang Y, Cao X, Ling EA, Hao A. Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. *Glia*. 2009; 57:724-733.
34. Bertrand J, Begaud-Grimaud G, Bessette B, Verdier M, Battu S, Jauberteau MO. Cancer stem cells from human glioma cell line are resistant to Fas-induced apoptosis. *Int J Oncol*. 2009; 34:717-727.
35. Melin C, Perraud A, Bounaix Morand du Puch C, Loum E, Giraud S, Cardot P, Jauberteau MO, Lautrette C, Battu S, Mathonnet M. Sedimentation field flow fractionation monitoring of *in vitro* enrichment in cancer stem cells by specific serum-free culture medium. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014; 963:40-46.
36. Skog J, Wuerdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Jr., Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*. 2008; 10:1470-U1209.
37. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacio [et al]*. 2006; Chapter 3:Unit 3.22-Unit 23.22.
38. Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Thery C. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles*. 2012; 1.
39. Park JE, Tan HS, Datta A, Lai RC, Zhang H, Meng W, Lim SK, Sze SK. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics*. 2010; 9:1085-1099.
40. Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Wurdinger T, Middeldorp JM. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:6328-6333.
41. Tapley P, Lamballe F, Barbacid M. K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein-kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene*. 1992; 7:371-381.
42. Wiklander OP, Nordin JZ, O'Loughlin A, Gustafsson Y, Corso G, Mager I, Vader P, Lee Y, Sork H, Seow Y, Heldring N, Alvarez-Erviti L, Smith CI, Le Blanc K, Macchiarini P, Jungebluth P, et al. Extracellular vesicle *in vivo* biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles*. 2015; 4:26316.
43. de Groot J, Liang J, Kong LY, Wei J, Piao Y, Fuller G, Qiao W, Heimberger AB. Modulating antiangiogenic resistance by inhibiting the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in glioblastoma. *Oncotarget*. 2012; 3:1036-1048.
44. Zhang X, Yuan X, Shi H, Wu L, Qian H, Xu W. Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol*. 2015; 8:83.
45. Akil H, Perraud A, Melin C, Jauberteau MO, Mathonnet M. Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. *PLoS One*. 2011; 6:e25097.

46. Nakano I, Garnier D, Minata M, Rak J. Extracellular vesicles in the biology of brain tumour stem cells—Implications for inter-cellular communication, therapy and biomarker development. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; 40:17-26.
47. Ramteke A, Ting H, Agarwal C, Mateen S, Somasagara R, Hussain A, Graner M, Frederick B, Agarwal R, Deep G. Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules. *Mol Carcinog.* 2015; 54:554-565.
48. Bauer N, Wilsch-Brauninger M, Karbanova J, Fonseca AV, Strauss D, Freund D, Thiele C, Huttner WB, Bornhauser M, Corbeil D. Haematopoietic stem cell differentiation promotes the release of prominin-1/CD133-containing membrane vesicles—a role of the endocytic-exocytic pathway. *EMBO Mol Med.* 2011; 3:398-409.
49. Floyd DH, Kefas B, Seleverstov O, Mykhaylyk O, Dominguez C, Comeau L, Plank C, Purow B. Alpha-secretase inhibition reduces human glioblastoma stem cell growth *in vitro* and *in vivo* by inhibiting Notch. *Neuro Oncol.* 2012; 14:1215-1226.
50. Francescone R, Ngernyuang N, Yan W, Bentley B, Shao R. Tumor-derived mural-like cells coordinate with endothelial cells: role of YKL-40 in mural cell-mediated angiogenesis. *Oncogene.* 2014; 33:2110-2122.
51. Shao R, Hamel K, Petersen L, Cao QJ, Arenas RB, Bigelow C, Bentley B, Yan W. YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. *Oncogene.* 2009; 28:4456-4468.
52. Kao TH, Peng YJ, Tsou HK, Salter DM, Lee HS. Nerve growth factor promotes expression of novel genes in intervertebral disc cells that regulate tissue degradation: Laboratory investigation. *J Neurosurg Spine.* 2014; 21:653-661.
53. Venugopal C, Wang XS, Manoranjan B, McFarlane N, Nolte S, Li M, Murty N, Siu KW, Singh SK. GBM secretome induces transient transformation of human neural precursor cells. *J Neurooncol.* 2012; 109:457-466.
54. Montermini L, Meehan B, Garnier D, Lee WJ, Lee TH, Guha A, Al-Nedawi K, Rak J. Inhibition of oncogenic epidermal growth factor receptor kinase triggers release of exosome-like extracellular vesicles and impacts their phosphoprotein and DNA content. *J Biol Chem.* 2015; 290:24534-24546.
55. Xiao H, Lasser C, Shelke GV, Wang J, Radinger M, Lunavat TR, Malmhall C, Lin LH, Li J, Li L, Lotvall J. Mast cell exosomes promote lung adenocarcinoma cell proliferation - role of KIT-stem cell factor signaling. *Cell Commun Signal.* 2014; 12:64.
56. Faibish M, Francescone R, Bentley B, Yan W, Shao R. A YKL-40-neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers. *Mol Cancer Ther.* 2011; 10:742-751.
57. Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, Fang X, Sloan AE, Mao Y, Lathia JD, Min W, McLendon RE, Rich JN, Bao S. Glioblastoma Stem Cells Generate Vascular Pericytes to Support Vessel Function and Tumor Growth. *Cell.* 2013; 153:139-152.
58. Shao R, Francescone R, Ngernyuang N, Bentley B, Taylor SL, Moral L, Yan W. Anti-YKL-40 antibody and ionizing irradiation synergistically inhibit tumor vascularization and malignancy in glioblastoma. *Carcinogenesis.* 2014; 35:373-382.
59. Lee J-K, Park S-R, Jung B-K, Jeon Y-K, Lee Y-S, Kim M-K, Kim Y-G, Jang J-Y, Kim C-W. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Suppress Angiogenesis by Down-Regulating VEGF Expression in Breast Cancer Cells. *Plos One.* 2013; 8.
60. Yu SC, Ping YF, Yi L, Zhou ZH, Chen JH, Yao XH, Gao L, Wang JM, Bian XW. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Lett.* 2008; 265:124-134.
61. Melin C, Perraud A, Akil H, Jauberteau MO, Cardot P, Mathonnet M, Battu S. Cancer stem cell sorting from colorectal cancer cell lines by sedimentation field flow fractionation. *Anal Chem.* 2012; 84:1549-1556.
62. Dubanet L, Bentayeb H, Petit B, Olivrie A, Saada S, de la Cruz-Morcillo MA, Lalloue F, Gourin M-P, Bordessoule D, Faumont N, Delage-Corre M, Fauchais A-L, Jauberteau M-O, Troutaud D. Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *British Journal of Cancer.* 2015; 113:934-944.

I.14. Implication des exosomes issus de cellules de glioblastome humain dans les mécanismes de radiorésistance

I.14.1. Introduction et problématique

La radiothérapie augmente la survie des patients atteints de glioblastome. Cependant, la récurrence a lieu à l'intérieur même du volume irradié à dose thérapeutique suggérant ainsi le développement de mécanismes de résistance. Parmi les hypothèses permettant d'expliquer l'émergence de ces mécanismes, on trouve notamment le rôle potentiel des CSCs. Nos travaux précédents, qui font référence au transfert de récepteurs aux neurotrophines par les exosomes, démontrent que le contenu de ces derniers peut varier selon l'état de différenciation et l'agressivité cellulaire. La communication avec le microenvironnement est déterminante pour la survie cellulaire tumorale. De même, la survie à la suite de l'irradiation dépend de l'émergence de clones résistants apparentés aux CSC. On peut considérer que les exosomes et le matériel protéique et génétique qu'ils transfèrent pourraient influencer la survie et participer à la récurrence tumorale à la suite de l'irradiation. Cette hypothèse est confortée par leurs rôles dans le transfert d'agressivité entre cellules ainsi que par leur augmentation à la suite de l'irradiation (Arscott et al., 2013). Plusieurs études antérieures permettent également d'étayer la fonction des exosomes dans la résistance aux traitements, radio- et chimiothérapeutiques notamment dans les cancers de la prostate, du rein, les cancers gynécologiques, ou encore le mélanome (Grange et al., 2011; Lehmann et al., 2008; Liu et al., 2010; Nieuwland et al., 2010).

Cependant, peu d'études ont évalué le rôle des exosomes dans la radiorésistance du GBM. Récemment, une étude confirme une augmentation de la sécrétion des exosomes à la suite de l'irradiation cellulaire. Cette augmentation est dose et temps dépendante et atteint un maximum 48 heures après l'irradiation cellulaire (Arscott et al., 2013). D'autre part, les exosomes issus de cellules irradiées sont mieux internalisés et présentent des changements de composition en ARNm et en protéines, notamment en protéines impliquées dans les processus d'invasion. L'activation des voies de signalisation passant par FAK (Focal Adhesion kinase) dans les cellules cibles suggère que l'acquisition des propriétés d'invasion et de

migration pourrait dépendre des exosomes provenant de cellules irradiées (Arscott et al., 2013).

Cependant, jusqu'à présent aucune étude n'a été menée pour savoir si l'inhibition de la sécrétion des exosomes pouvait modifier le profil de sensibilité des cellules aux radiations ionisantes.

Mes travaux de thèse visent ainsi à étudier l'implication des exosomes dans la radiorésistance des cellules U87-MG de glioblastome humain et à déterminer si les récepteurs aux neurotrophines pourraient être des acteurs de cette radiorésistance.

I.14.2. Protocole expérimental

Pour plus de compréhension, le protocole expérimental est rappelé et détaillé, ainsi que les différentes conditions utilisées (Figure 26).

Deux lignées cellulaires sont utilisées, une lignée de GBM humain U87-MG et une lignée de GBM inactivées pour la protéine Rab27a appelée U87 shRab27a. Pour chacune de ces lignées, trois conditions sont expérimentées à savoir, une condition contrôle, une condition dans laquelle les cellules subissent une irradiation de 7 Gy et enfin une condition où les cellules subissent une irradiation de 7 Gy puis un traitement de 30 µg/mL d'exosomes issus de cellules U87-MG contrôle.

48 heures après et quelle que soit la condition expérimentale, les surnageants cellulaires et les cellules sont récupérés. A partir des surnageants de culture, les exosomes sont purifiés et une analyse protéique de leur contenu est réalisée par western blot. A partir des cellules, soit des tests fonctionnels (étude de la prolifération cellulaire et test de clonogénicité) sont effectués afin d'évaluer l'impact des exosomes tumoraux dans les mécanismes de radiorésistance, soit une analyse protéique est réalisée par western blot.

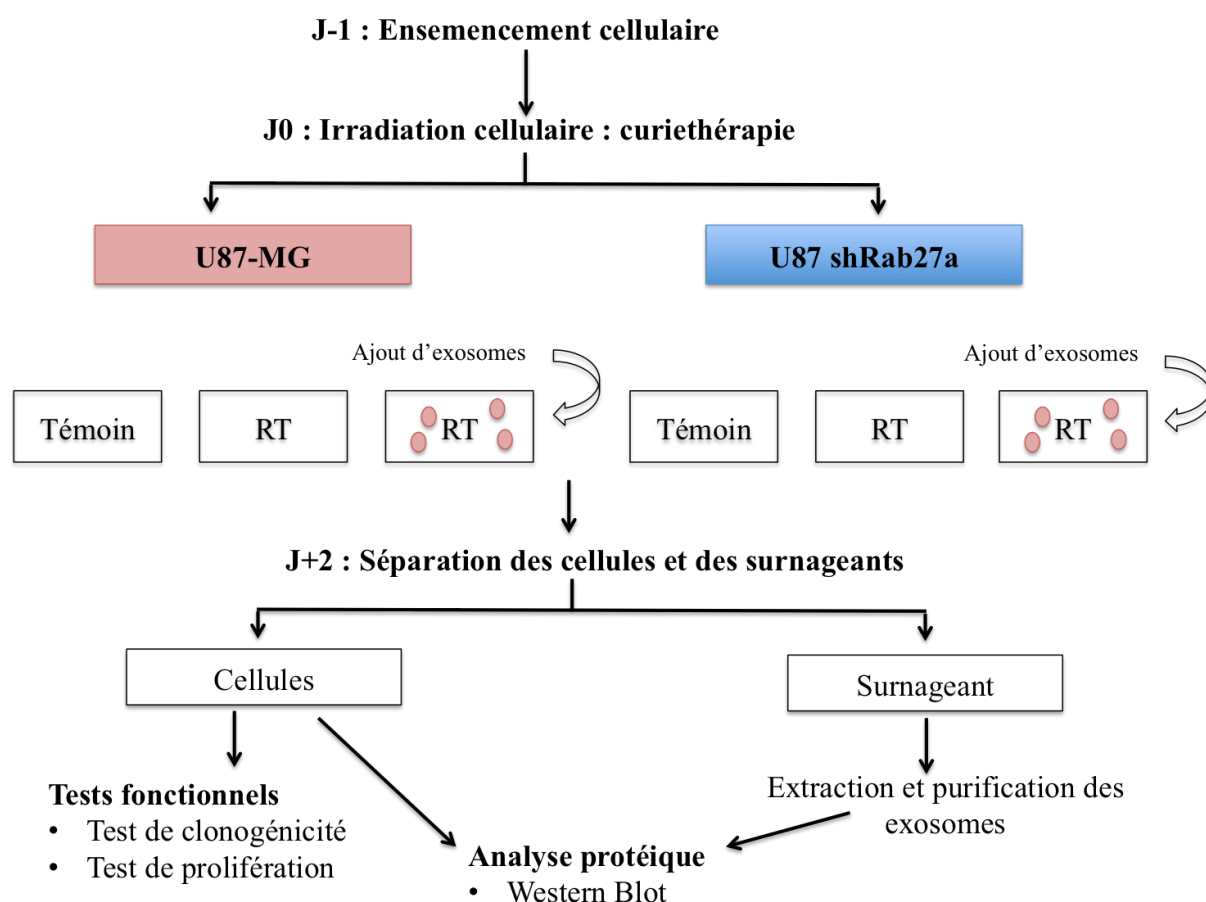


Figure 26: Protocole expérimental 1.

Ensemencement cellulaire de 3 plaques par lignée cellulaire (3 plaques U87-MG et 3 plaques U87 shRab27a) à J0. Irradiation cellulaire (7 Gy) de 2 plaques par lignée cellulaire à J1. Pour chaque lignée cellulaire (U87-MG et U87 shRab27a), trois conditions seront testées (1 condition par plaque) : Témoins (T), irradiées (RT), et irradiées avec ajout d'exosomes dérivés de cellules U87-MG en fin d'irradiation. 48h après l'irradiation cellulaire, les surnageants cellulaires contenant les exosomes sont récupérés pour la caractérisation de leur contenu protéique par western blot, tandis que les cellules sont récupérées pour la réalisation de tests fonctionnels et pour une caractérisation protéique par western blot.

I.14.3. Résultats

Afin d'étudier si les changements de sensibilité des cellules de GBM aux rayonnements ionisants dépendent de la sécrétion des exosomes et des variations de leur contenu, une lignée de GBM, dans laquelle la sécrétion des exosomes est modifiée, a été développée. Comme la protéine Rab27a est connue pour être nécessaire à la sécrétion exosomale (Ostrowski et al., 2010), son expression a été inhibée, via l'utilisation de shRNA, dans la lignée de GBM humain U87-MG.

- Validation de l'extinction de Rab27a dans la lignée U87-MG

La première étape de notre travail a été de valider l'extinction du gène *Rab27a* dans la lignée cellulaire U87 shRab27a puis de vérifier la capacité de ces cellules à sécréter des exosomes.

La protéine Rab27a est très faiblement exprimée dans la lignée cellulaire U87 shRab27a par rapport à notre lignée contrôle, quelles que soient les conditions étudiées (Figure 27). Après avoir validé notre modèle cellulaire, nous avons regardé si l'extinction de Rab27a pouvait avoir un impact sur la sécrétion des exosomes.

La sécrétion d'exosomes tumoraux a été vérifiée par Western Blot en recherchant deux marqueurs spécifiques des exosomes : CD63 et CD9 (Figure 27). Après purification, les exosomes issus de la lignée cellulaire U87-MG expriment les tétraspanines CD63 et CD9. Cette expression augmente à la suite de l'irradiation des cellules. Cependant, l'expression de ces 2 protéines est extrêmement faible dans les exosomes provenant de la lignée U87 shRab27a et ce quelle que soit la condition suggérant une diminution de la quantité d'exosomes sécrétés (Figure 27).

Nos données concernant l'augmentation de la sécrétion des exosomes après irradiation sont en accord avec la littérature (Arscott et al., 2013). Nos premières observations confirment également que l'extinction du gène *Rab27a* permet de moduler la sécrétion des exosomes produits par les cellules de GBM.

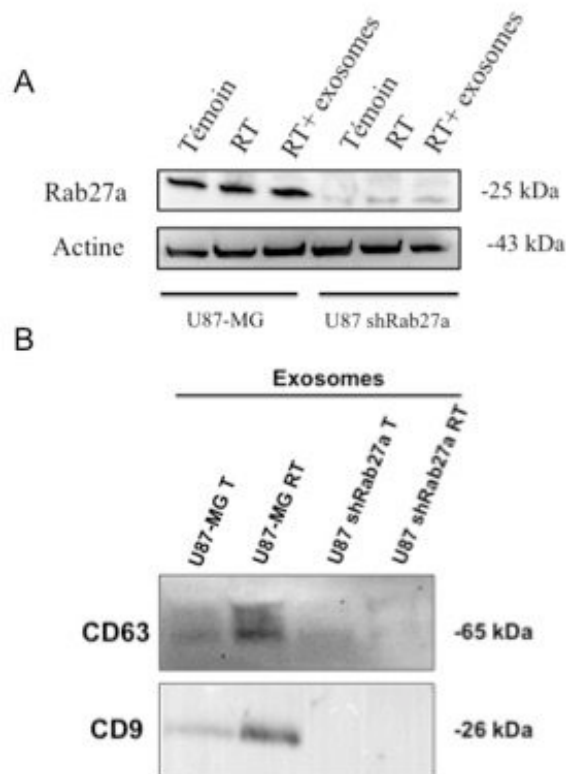


Figure 27 : Validation du modèle cellulaire et de la sécrétion exosomale.

(A) Expression de Rab27a dans les différentes conditions U87-MG et U87 shRab27a Témoin (T), après radiothérapie (RT), et après ajout d'exosomes en fin d'irradiation (RT+ exosomes) par western blot. (B) Expression des tétraspanines CD63 et CD9 dans les exosomes issus des cellules U87-MG et U87 sh Rab27a irradiées ou non. Ces résultats sont issus de 3 expériences indépendantes.

Pour étudier la fonction des exosomes dans les mécanismes de radiorésistance, les lignées U87-MG et U87 shRab27a ayant été irradiées subissent un traitement avec 30 µg/mL d'exosomes issus des cellules U87-MG non irradiés. Avant d'étudier les changements fonctionnels survenant dans ces cellules à la suite des traitements (radiothérapie + exosomes), le processus d'internalisation de ces derniers dans ces mêmes cellules a été vérifié (Figure 28).

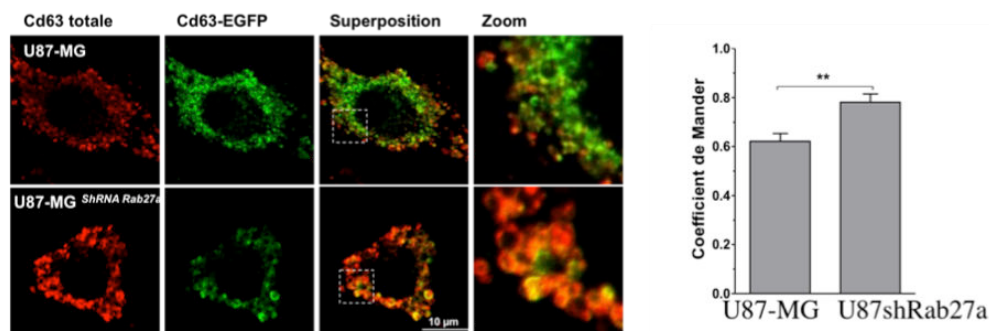


Figure 28 : Validation de l'internalisation des exosomes dans les cellules cibles.

Localisations communes des protéines CD63-GFP et CD63 totale (endogène + exogène) dans les lignées cellulaires U87-MG et U87 shRab27a après ajout d'exosomes (CD63-GFP) en fin d'irradiation (RT + exosomes). Analyses quantitatives de la protéine CD63-GFP superposée avec la CD63 totale. Le graphique représente le coefficient de Mander indiquant une colocalisation entre la CD63-GFP et la CD63 totale. Ces résultats sont issus de 3 expériences indépendantes avec au moins 20 à 30 cellules analysées par conditions.

Pour visualiser l'internalisation des exosomes dans les cellules réceptrices, les cellules irradiées sont traitées avec des exosomes provenant de la lignée U87-MG exprimant de manière stable une protéine de fusion CD63-GFP. Le suivi et la détection des exosomes sécrétés par ces cellules sont donc facilités par la présence de la tétraspanine CD63 marqué à la GFP comme le confirme la colocalisation des marquages obtenus avec un anticorps anti-CD63 et l'expression de la protéine CD63-GFP en microscopie confocale dans les cellules U87-MG et U87 shRab27a après radiothérapie.

Une internalisation des exosomes CD63-GFP dans les lignées U87-MG et U87 shRab27a est ainsi observée à la suite de l'irradiation. La fluorescence verte punctiforme correspond aux exosomes ajoutés qui se retrouvent dans le trafic endosomal de la cellule réceptrice. Ces derniers sont colocalisés avec la protéine CD63 totale (CD63-GFP et CD63 endogène), enrichie au niveau des exosomes et des endosomes, fluorescent en rouge. La colocalisation est observée par l'apparition d'un marquage jaune résultant de la superposition du vert (CD63-GFP) et du rouge (CD63 total). De plus, le coefficient de mander qui permet de déterminer le degré de

colocalisation, montre une colocalisation significativement plus importante ($p=0.0019$) des deux marquages dans la lignée cellulaire U87 shRab27a suggérant ainsi que cette lignée internalise plus facilement les exosomes provenant de cellules U87-MG native (Figure 28).

Après avoir vérifié la validité de notre modèle cellulaire et l'internalisation des exosomes, l'étude de l'implication des exosomes dans les mécanismes de radorésistance cellulaire à partir de tests fonctionnels (prolifération et test de clonogénicité) est réalisée. En parallèle, les exosomes issus de ces cellules sont récupérés pour la caractérisation de leur contenu protéique par western blot.

- Implication des exosomes dans la radorésistance

La prolifération cellulaire est corrélée à l'incorporation du BrdU (bromodéoxyuridine), au niveau de l'ADN néo-synthétisé révélée par un anticorps anti-BrdU. La quantification se fait par un dosage spectrophotométrique à 450nm. Il existe une différence entre les taux de prolifération des cellules U87-MG et U87 shRab27a en conditions basales.

48h après irradiation, les 2 lignées cellulaires prolifèrent significativement moins que leurs témoins ($p<0,001$). A l'inverse, l'ajout d'exosomes (500 $\mu\text{g/mL}$) en fin d'irradiation augmente significativement le taux de prolifération ($p<0,001$) dans les 2 lignées cellulaires (Figure 29). Afin de déterminer si l'augmentation de la prolifération et/ou de la radorésistance était due à l'activation ou l'émergence de clones résistants possédant des propriétés de CSC, nous avons évalué les propriétés d'auto-renouvellement des cellules cibles. Des tests de clonogénicité (CFU) ont ainsi été effectués sur les cellules U87-MG et shRab27a irradiées ou non et ayant été traitée ou non avec des exosomes (Figure 29).

Les résultats obtenus semblent similaires à ceux du test de prolifération suggérant que l'augmentation de la prolifération à la suite du traitement par les exosomes pourrait dépendre d'une activation des propriétés d'auto-renouvellement des CSC. On remarque cependant que l'inactivation du gène *Rab27a* entraîne une diminution de moitié de la capacité des cellules à reformer des clones par rapport à la lignée U87-MG native. Dans les deux lignées, la radiothérapie diminue significativement la capacité des cellules à reformer des clones pour la lignée U87-MG ($p=0,0005$) et

pour la lignée U87 shRab27a ($p=0.0053$). Cependant, l'exposition aux exosomes de U87-MG après radiothérapie rétablit les propriétés de clonogénicité des 2 lignées cellulaires comme le prouve l'augmentation significative du nombre de clones formés pour la lignée U87-MG ($p=0,0042$) et pour la lignée U87 shRab27a ($p=0.019$) (figure 29). L'ensemble de ces résultats suggère que les exosomes de GBM favorisent la prolifération et l'activation des propriétés d'auto-renouvellement dans les cellules traitées.

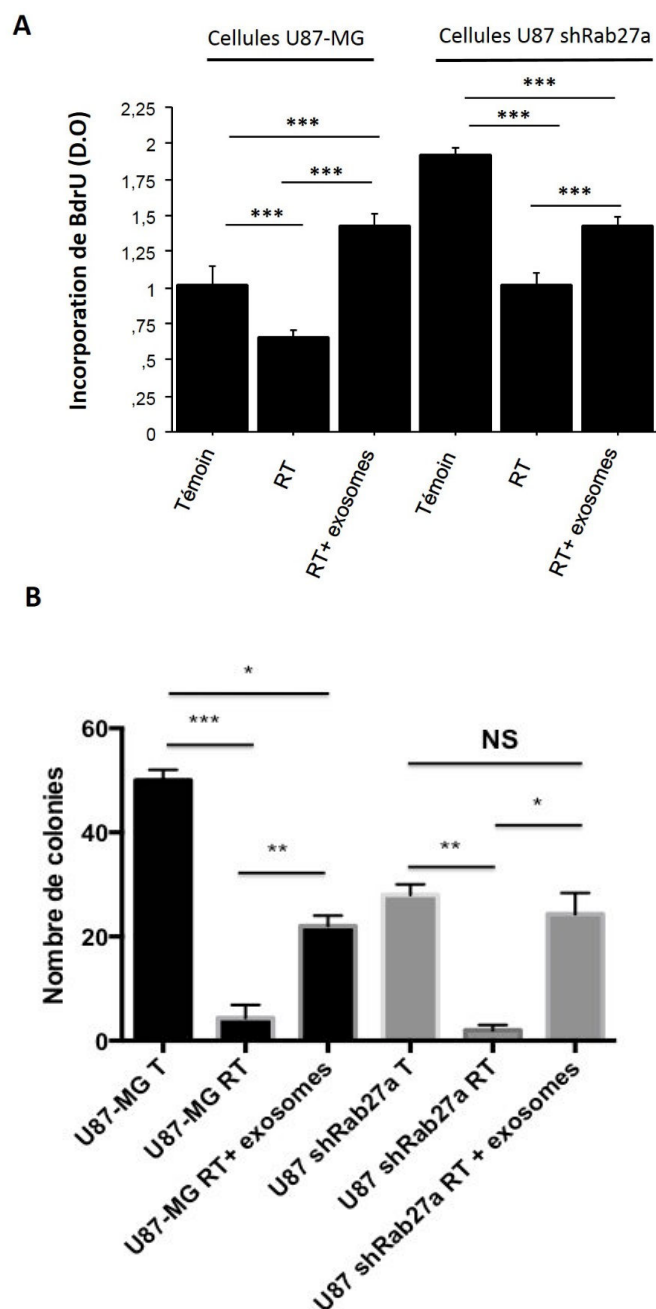


Figure 29 : Etude de l'effet des exosomes U87-MG sur la prolifération et la clonogénicité de cellules U87-MG et U87 shRab27a après irradiation.

(A) Test de Prolifération par BrdU dans les différentes conditions U87-MG et U87 shRab27a Témoin (T), après radiothérapie (RT), et après ajout d'exosomes en fin d'irradiation (RT+ exosomes). Ces résultats sont issus de 3 expériences indépendantes. *** $p < 0,001$. (B) Test de clonogénicité dans les différentes conditions U87-MG et U87 shRab27a Témoin (T), après radiothérapie (RT), et après ajout d'exosomes en fin d'irradiation (RT+ exosomes). Histogramme résumant les différentes variations. Ces résultats sont issus de 2 expériences indépendantes.

Etant donné que nos premiers travaux nous ont conduits à étudier la dissémination de l'agressivité tumorale et l'implication des récepteurs aux neurotrophines et de leurs ligands dans le transfert d'agressivité via les exosomes. Nous avons étudié l'implication des facteurs neurotrophiques dans les mécanismes de radiorésistance observés à la suite du transfert d'exosomes.

- Etude du transfert par les exosomes des récepteurs des neurotrophines dans les mécanismes de radiorésistance

Les récepteurs EGFR, TrkB, P75^{NTR} ainsi que leur co-récepteur la sortiline pourraient être transférés aux cellules cibles via les exosomes. L'étude de l'implication du contenu protéique des exosomes a été réalisée par western blot. L'actine a servi de protéine de référence dans les cellules et le CD9 de marqueur spécifique des exosomes (Figure 30).

L'expression de l'EGFR, au niveau cellulaire est constante après irradiation alors qu'elle augmente après traitement aux exosomes dans les 2 lignées cellulaires par rapport au témoin non traité. L'analyse de son expression dans les exosomes sécrétés par les cellules irradiées et traitées au préalable par les exosomes d'U87-MG montre une augmentation similaire à celle du marqueur CD9 (Figure 30).

L'expression de TrkB, dans les cellules U87-MG diminue après irradiation. Cependant l'ajout d'exosomes permet de rétablir l'expression basale de TrkB. Dans la lignée U87 shRab27a, cette expression augmente après irradiation avec ou sans traitement aux exosomes et varie dans le même sens que CD9 (Figure 30).

L'expression de la Sortiline dans les 2 lignées cellulaires disparaît après irradiation mais celle-ci est restaurée après traitement par les exosomes issus de la lignée U87-MG. Dans les exosomes issus des cellules U87-MG, quelle que soit la condition, l'expression de la sortiline semble stable. Cependant pour les exosomes issus de la lignée U87 shRab27a, elle est exprimée après radiothérapie et ajout d'exosomes (Figure 30).

Concernant p75^{NTR}, dans les cellules U87-MG, son expression diminue après radiothérapie et comme précédemment pour TrkB est rétablie après ajout d'exosomes. Dans les cellules U87 shRab27a, l'expression de p75^{NTR} augmente après irradiation mais non après ajout d'exosomes. Dans les exosomes issus des

cellules U87-MG, l'expression de p75^{NTR} augmente après radiothérapie et de façon surprenante diminue quand la radiothérapie est suivie d'un traitement aux exosomes. Dans les exosomes issus des cellules U87 shRab27a, l'expression de p75^{NTR} est élevée en condition basale et diminue après radiothérapie avec ou sans traitement aux exosomes (Figure 30).

En conclusion, ces résultats indiquent une augmentation de l'expression de l'EGFR, TrkB et la sortiline dans les deux lignées cellulaires après traitement aux exosomes. L'hypothèse selon laquelle TrkB et la sortiline seraient transférés aux cellules via les exosomes est confortée par nos travaux précédents (1^{er} article). Les variations d'expression de p75^{NTR} entre les deux lignées restent difficiles à interpréter.

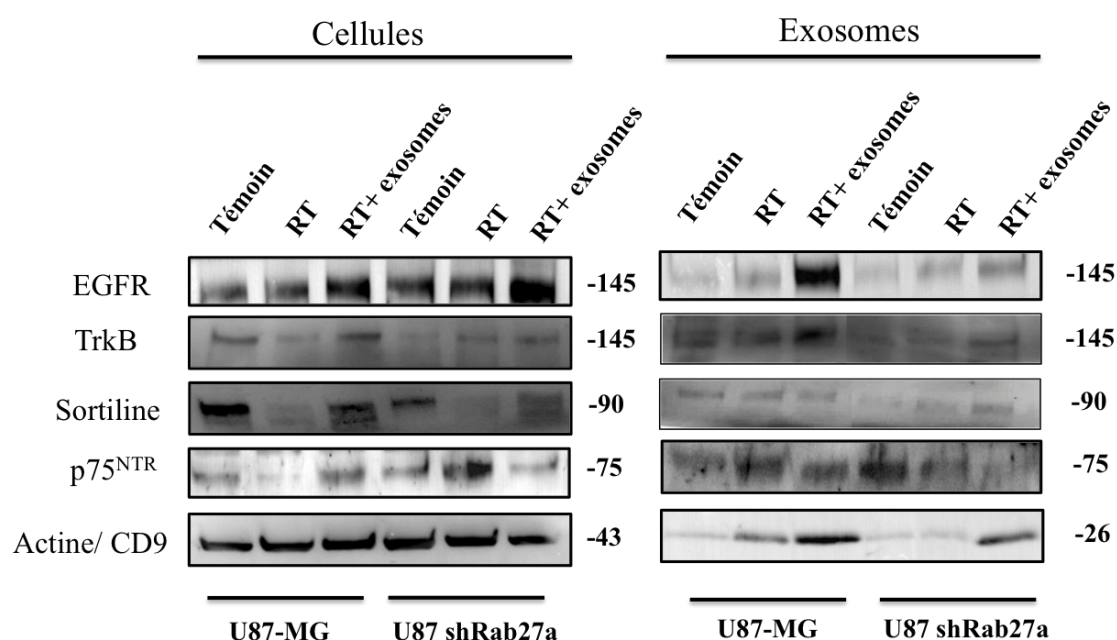


Figure 30 : Analyse de l'expression de l'EGFR, p75^{NTR}, TrkB et la sortiline.

Expression de l'EGFR, p75^{NTR}, TrkB, Sortiline, et Actine/CD9 dans les cellules (à gauche) et dans les exosomes (à droite) dans les différentes conditions U87-MG et U87 shRab27a Témoin (T), après radiothérapie (RT), et après ajout d'exosomes en fin d'irradiation (RT+ exosomes) par Western Blot. Ces résultats sont issus de 2 (p75^{NTR}, TrkB) à 3 (EGFR, Sortiline, CD9) expériences indépendantes.

I.15. Communication des cellules de GBM avec les cellules souches mésenchymateuses via le transfert d'exosomes.

I.15.1. Introduction et problématique

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM), également nommées cellules souches stromales correspondent à une population hétérogène de cellules souches adultes retrouvées dans un grand nombre de tissus et organes comme la moelle osseuse, le tissu adipeux, etc. Elles ont été isolées comme une population cellulaire clonogénique non-hématopoïétique à partir de la moelle osseuse capable de se différencier en ostéoblastes (Bianco et al., 2008). Ces cellules sont multipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier selon différents lignages, principalement adipogénique, chondrogénique et ostéogénique. Bien que leurs fonctions ne soient pas toutes élucidées, les CSM jouent un rôle important dans la réparation tissulaire puisqu'elles présentent des propriétés immunomodulatrices spécifiques avec une action immunosuppressive et anti-inflammatoire (Marigo and Dazzi, 2011).

De nombreuses études mettent en évidence la présence de CSM dans le microenvironnement tumoral où elles sont attirées par une sécrétion tumorale paracrine de type lésionnel chronique (IL-8, TGF- β 1, NT-3,...). A ce niveau, elles vont pouvoir favoriser la progression tumorale grâce leurs propriétés immunomodulatrices et pro-angiogéniques (sécrétion de VEGF ; *Vascular endothelial Growth Factor*) (Chang et al., 2014; Marigo and Dazzi, 2011). Dans les cancers des voies aérodigestives supérieures, les cellules tumorales sont capables de modifier le phénotype des CSM qui répondent en sécrétant des facteurs favorisant l'invasion tumorale (Mishra et al., 2008). Cette communication entre cellules tumorales et CSM pourrait également dépendre du transfert de matériel génétique et protéique via les exosomes (Chowdhury et al., 2014).

Dans le contexte du GBM, il existe peu d'études portant sur les liens pouvant exister entre cellules tumorales et CSM. Il a été néanmoins montré que des CSM exogènes pouvaient migrer et présenter un tropisme spécifique pour les tumeurs gliales *in vitro* (Pendleton et al., 2013b) et *in vivo* (Hong et al., 2014; Liu et al., 2014; Nakamizo et al., 2005). De plus, l'activation du comportement migratoire des CSM serait dépendante de l'activité proliférative des cellules souches cancéreuses (Liu et al., 2014). Cependant la plupart de ces études ont été menées dans le but d'utiliser les

CSM en tant que vecteurs thérapeutiques, en particulier pour abolir la chimiorésistance des CSC (Munoz et al., 2013b). Par ailleurs, une étude démontre la présence de CSM endogènes associées au gliome de différentes origines (3 groupes génétiques distincts). Ces cellules augmentent, *in vitro*, la prolifération et l'auto-renouveau des CSC de glioblastome favorisant ainsi le maintien du caractère souche de ces cellules, leurs capacités prolifératives ainsi que leur tumorigénicité bien qu'elles ne soient pas intrinsèquement tumorigéniques (Hossain et al., 2015b). Ces CSM associées au gliome représentent une nouvelle composante stromale capable de contrôler l'agressivité des CSC de glioblastome. A l'inverse, pour exercer un contrôle sur le microenvironnement les cellules de GBM ont besoin de communiquer avec les CSM. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle les exosomes de GBM pourrait être captés par les cellules du microenvironnement, telles que les cellules souches mésenchymateuses afin d'induire leur transformation phénotypique. Notre démarche expérimentale a donc été la suivante ;

Dans un premier temps, l'internalisation des exosomes de GBM par les cellules du microenvironnement tumoral, à savoir des astrocytes sains à différents stades de différenciation et des cellules souches mésenchymateuses a été étudiée. Afin d'évaluer l'effet des exosomes tumoraux sur les cellules réceptrices, des cellules souches mésenchymateuse issues de la moelle osseuse ont été traitées avec des exosomes issus de cellules U87-MG de GBM humain présentant différents stades d'agressivité. A la suite du traitement, des modifications phénotypiques (différenciation) et fonctionnelles (prolifération, viabilité, mobilité / migration) des CSM ont été recherchées. Dans un second temps, l'impact de radiothérapie sur la modulation du phénotype des CSM par des exosomes issus de GBM a été recherché. Enfin, nous avons déterminé si les CSM ainsi « éduquées » par les cellules de GBM étaient susceptibles d'émettre des signaux tumorigéniques (favorisant l'angiogenèse et la croissance tumorale).

I.15.2. Protocole expérimental

Pour plus de compréhension, le protocole expérimental est rappelé et détaillé, ainsi que les différentes conditions utilisées (Figure 31).

Deux lignées cellulaires sont utilisées, une lignée de GBM humain U87-MG et une lignée de GBM inactivées pour la protéine CHI3L1 (YKL-40) appelée U87 shCHI3L1. Ces deux lignées, ont été cultivées soit en milieu différenciant (contenant du SVF 10%) soit en milieu défini (dépourvu de SVF) qui permet un enrichissement en cellules souches cancéreuses. Enfin les cellules issues de ces différentes conditions ont été soumises ou non à la radiothérapie (7 Gy).

48 heures après et quelle que soit la condition expérimentale, les surnageants cellulaires sont récupérés. A partir des surnageants de culture, les exosomes sont purifiés et ajoutés sur une culture primaire de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse (BM-MS-C) Dans un premier temps, une analyse morphologiques des BM-MS-C traités ou non aux exosomes est effectué. Dans un second temps, des tests fonctionnels (étude de la viabilité et de la prolifération cellulaire et test d'invasion) sont réalisés et dans un troisième temps une analyse protéique est réalisée par western blot et immunofluorescence.

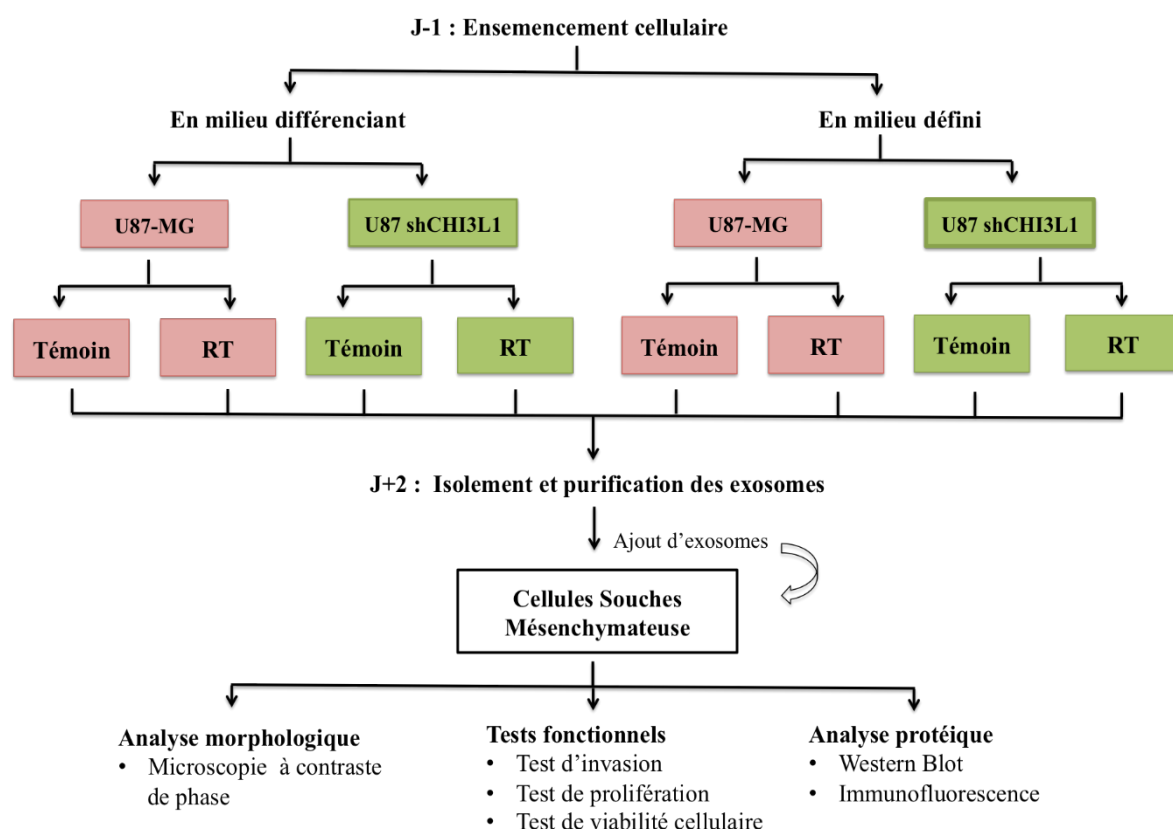


Figure 31 : Protocole expérimental 2.

Deux lignées de GBM humain U87-MG et U87 shCHI3L1, présentant des degrés d'agressivité différents, sont utilisées. En parallèle, ces deux lignées sont cultivées en milieu défini, de façon à enrichir la population en cellules souches cancéreuses. Enfin, un stress cellulaire, correspondant à une irradiation de 7Gy, est appliqué sur ces deux lignées. Les exosomes, issus de ces différentes conditions, sont ensuite isolés et purifiés et déposés sur des cellules souches mésenchymateuses. Des analyses morphologiques, protéiques ainsi que des tests fonctionnels sont ensuite réalisées sur ces CSM.

I.15.3. Résultats

- Analyse de l'internalisation d'exosomes de GBM sur différents types cellulaires du microenvironnement

Afin de démontrer que la tumeur est capable de moduler son microenvironnement via le transfert d'exosomes, nous avons d'abord vérifié que les exosomes de GBM pouvaient être internalisés par différentes cellules du microenvironnement tumoral (astrocytes sains et cellules souches mésenchymateuses).

- Analyse de l'internalisation d'exosomes de GBM sur différentes populations astrocytaires :

Dans un premier temps, nous avons cherché à différencier les niveaux d'incorporation des exosomes issus de la lignée C6 (GBM de rat) selon le degré de maturité des populations astrocytaires de rat.

Pour déterminer si l'incorporation des exosomes tumoraux pouvait être modulée par le stade de différenciation des cellules réceptrices saines, un tri cellulaire par SdFFF a préalablement été effectué à partir de cortex de rats nouveau-nés de façon à obtenir les différentes sous-populations d'astrocytes (Sarrazy et al., 2013). Cette méthode a permis d'éluer une première fraction F1, composée de cellules matures différenciées et une, élue plus tardivement, la fraction F3, composée de cellules immatures (Sarrazy et al., 2013).

L'incorporation d'exosomes (30 µg/mL), issus d'une lignée C6 de GBM de rat, a été visualisée dans des astrocytes sains de rat à 24h de traitement. L'internalisation des exosomes a pu être observée après un marquage préalable de ces derniers au PKH26 permettant de visualiser en rouge la membrane des exosomes (Figure 32).

Les résultats indiquent une faible internalisation des exosomes (flèches) lorsque ceux-ci sont mis en contact avec les astrocytes issus de la fraction F1 (Figure 32). Cependant au niveau des cellules plus immatures (F3), les exosomes sont internalisés en grande quantité (Figure 32). Cette différence d'internalisation pourrait s'expliquer par un changement de composition de la membrane plasmique selon le stade de maturité des astrocytes. En effet, les astrocytes les plus immatures pourraient exprimer à leur surface un récepteur spécifique impliqué dans

l'internalisation des exosomes. La différenciation cellulaire pourrait réguler négativement son expression conduisant à une perte de reconnaissance des exosomes tumoraux par les astrocytes matures. Par la suite, des analyses morphologiques et phénotypiques ainsi que des tests fonctionnels (prolifération, migration) (données non montrées) n'ont pas permis de démontrer l'impact d'exosomes de GBM sur des astrocytes sains.

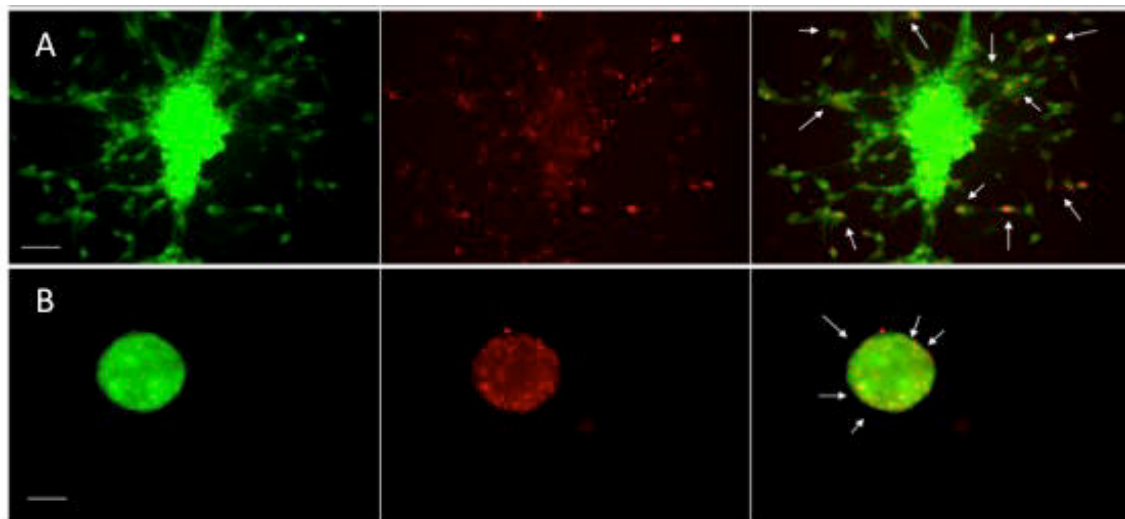


Figure 32 : Analyse de l'internalisation des exosomes C6 sur les différentes fractions d'astrocytes sains.

Photographies de microscopie à fluorescence de cellules GFP traitées aux exosomes C6 marqués au PKH26. (A) Photographies de cellules de la fraction F1. (B) Photographies de neurosphères en suspension. La colonne de gauche représente les cellules GFP, celle au centre représente les exosomes marqués au PKH26 et celle de droite correspond à la superposition des deux premières colonnes. (barre d'échelle = 50 μ m)

Face à ce constat et en prenant en compte les données de la littérature, nous avons cherché à identifier l'impact d'exosomes de GBM sur des cellules souches mésenchymateuses.

- Impact des exosomes issus de U87-MG sur le phénotype des cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse (BM-CSM)

Dans un premier temps, l'impact des exosomes de GBM sur la morphologie de cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse a été étudié.

- Modifications morphologiques des CSM après traitement aux exosomes :

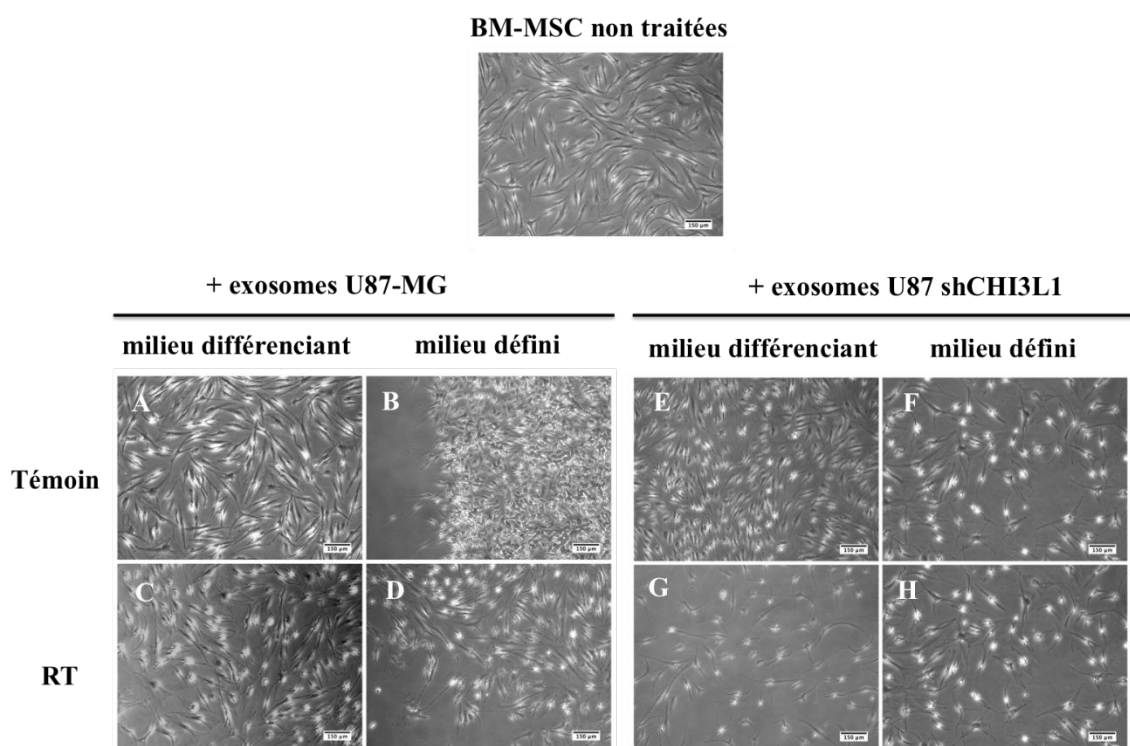


Figure 33 : Photographies en microscopie à contraste de phase de BM-MSc traitées ou non aux exosomes.

Les BM-MSc sont traitées avec 30 µg/mL d'exosomes produits par les cellules U87-MG ou U87 shCHI3L1 irradiées (RT) ou non (Témoin) et cultivées en milieu différenciant (complet) ou en milieu défini.

Les BM-MSc sont des cellules adhérentes à morphologie fibroblastique. L'ajout d'exosomes U87-MG, cultivées en milieu complet (Figure 33-A), semble affecter la densité cellulaire sans modifier la morphologie. Lorsque les exosomes proviennent de cellules U87-MG irradiées cultivées en milieu différenciant (Figure 33-C), certaines cellules acquièrent une morphologie fibroblastiques organisées en colonies

(non montré) et d'autres présentent un changement morphologique avec émission de prolongements cytoplasmiques. Les exosomes de U87-MG provenant de cellules cultivées en milieu défini (Figure 33-B et -D) semblent induire une augmentation de la densité cellulaire des BM-MSC associée à des modifications morphologiques conduisant à un aspect de cellule nerveuse de petite taille possédant un corps cellulaire étoilé avec des prolongements cytoplasmiques.

Une morphologie étalée ainsi que la présence de cellules étoilées sont retrouvées pour la majorité des BM-MSC cultivées en présence d'exosomes issus de cellules U87 shCHI3L1 (Figure 33-E et -F). En revanche, peu de cellules BM-MSC sont visibles quand elles sont traitées avec des exosomes issus des cellules U87 shCHI3L1 irradiées (Figure 33-G et -H) suggérant une mortalité cellulaire après irradiation.

Face à ces changements morphologiques, l'impact des exosomes de GBM sur la modulation du phénotype des BM-MSC a été recherché.

➤ Modifications de l'expression protéiques des CSM après traitement aux exosomes

Les données de la littérature montrent que les exosomes de cellules tumorales peuvent influencer la différenciation des CSM vers des cellules de types fibroblastiques (Mishra et al., 2008). Un marqueur protéique spécifique de ce type de cellule est l' α -SMA (Actine α du muscle lisse). Les changements d'expression de plusieurs marqueurs exprimés spécifiquement par les cellules de type mésenchymateux et souches (N-cadhérine et CD44), totalement absents des cellules de type épithélial, ont été analysés. L'actine a servi comme précédemment de témoin de la charge protéique et permet de normaliser les résultats obtenus (Figure 34).

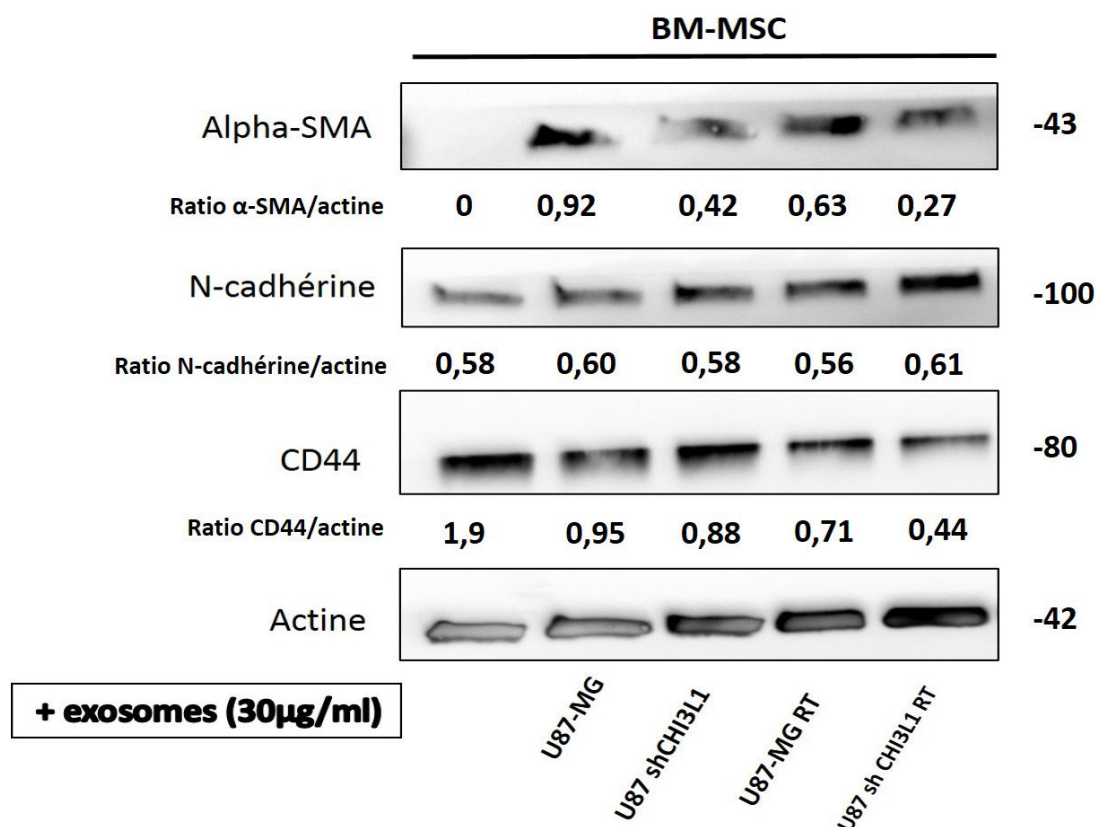


Figure 34 : Modifications de l'expression de protéines liées à l'état souche et à la différenciation fibroblastique des BM-MSC.

L'expression des protéines α -SMA, N-cadhérine et CD44 a été recherchée, par western blot, dans les BM-MSC traitées ou non avec des exosomes issus de la lignée U87-MG ou U87 shCHI3L1 irradiée (RT) ou non.

L'expression de différentes protéines ; α -SMA, N-cadhérine et CD44 est recherchée dans les BM-MSC traitées ou non avec des exosomes issus de différentes conditions (Figure 34).

Après exposition aux exosomes de U87-MG irradiés ou non, l'induction de l'expression de l' α -SMA suggère une différenciation des CSM vers un lignage de type fibroblastique (Figure 34 et 36). Ceci n'est pas observé dans le cas du contrôle correspondant aux BM-MSC traitées au PBS1X. De plus, l'expression de l' α -SMA semble un peu moins importante quand les CSM sont traités avec des exosomes shCHI3L1 irradié ou non (Figure 34). L'irradiation ne semble pas altérer l'expression de ce marqueur. L'expression de la N-cadhérine n'est pas modifiée comme le confirme l'absence de variations du ratio N-cadhérine/ actine, ce qui suggère le

maintien d'un phénotype mésenchymateux (Figure 34). Néanmoins, on constate une diminution de l'expression de CD44 après traitement par les exosomes et ce quelles que soient les conditions considérées (Figure 34).

Les niveaux d'expression d'autres protéines ont également été analysés dans les BM-MSC (figure 35): l'expression de l'EGFR est en relation avec la transformation oncogénique. L'expression de récepteur oncogénique tels que l'EGFR est en relation avec les changements de l'agressivité des cellules tumorales. La GFAP (*Glial Acidic Fibrillary Protein*) est un filament intermédiaire spécifiquement exprimé dans les cellules gliales. RUNX2 est un facteur de transcription impliqué dans l'orientation de la différenciation des CSM vers un lignage ostéoblastique et de manière intéressante son expression a également été reliée à la transformation tumorale, en particulier dans les gliomes (Vladimirova et al., 2008).

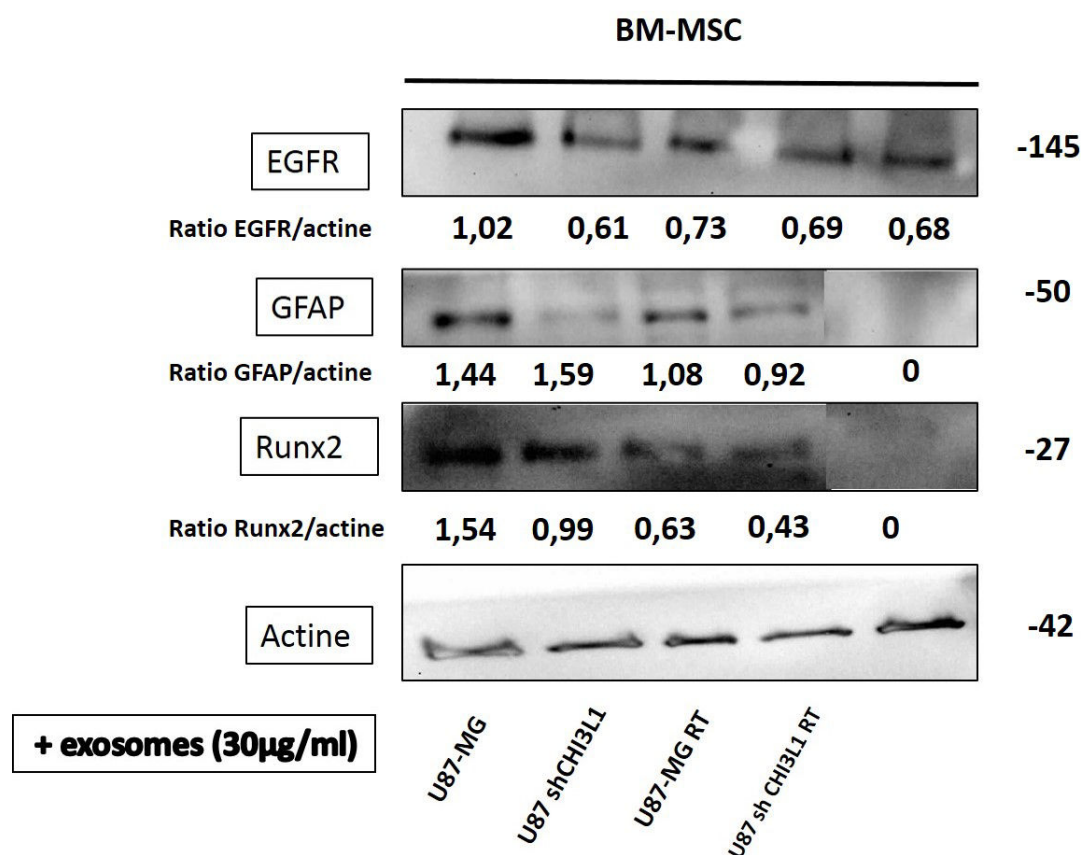


Figure 35: Modification de l'expression des protéines EGFR, GFAP et Runx2.

L'expression des protéines EGFR, GFAP et Runx2 a été recherché, par western blot, dans les BM-MSC traitées ou non avec des exosomes issus de la lignée U87-MG ou U87 shCHI3L1 irradiée (RT) ou non.

Suite au traitement des BM-MSC par les exosomes U87-MG, on observe une augmentation de l'expression de l'EGFR dans le cas où les exosomes proviennent de cellules U87-MG non irradiées (Figure 35). Cela pourrait s'expliquer par un enrichissement important de l'EGFR au sein des exosomes U87-MG en condition basale.

De façon surprenante, les exosomes U87-MG induisent une expression de la GFAP, protéine absente dans les BM-MSC non traitées (Figure 35 et 36). Ces effets sont

plus restreints quand les BM-MSC sont traitées avec des exosomes U87 shCHI3L1 issus de cellules cultivées en milieu différenciant.

Par ailleurs les exosomes U87-MG et shCHI3L1 induisent l'expression du facteur de transcription Runx2 dans les BM-MSC alors que cette protéine n'est pas détectée dans les BM-MSC témoins (Figure 35). Ces résultats suggèrent que les exosomes de GBM pourraient amorcer un phénomène de transformation oncogénique des CSM.

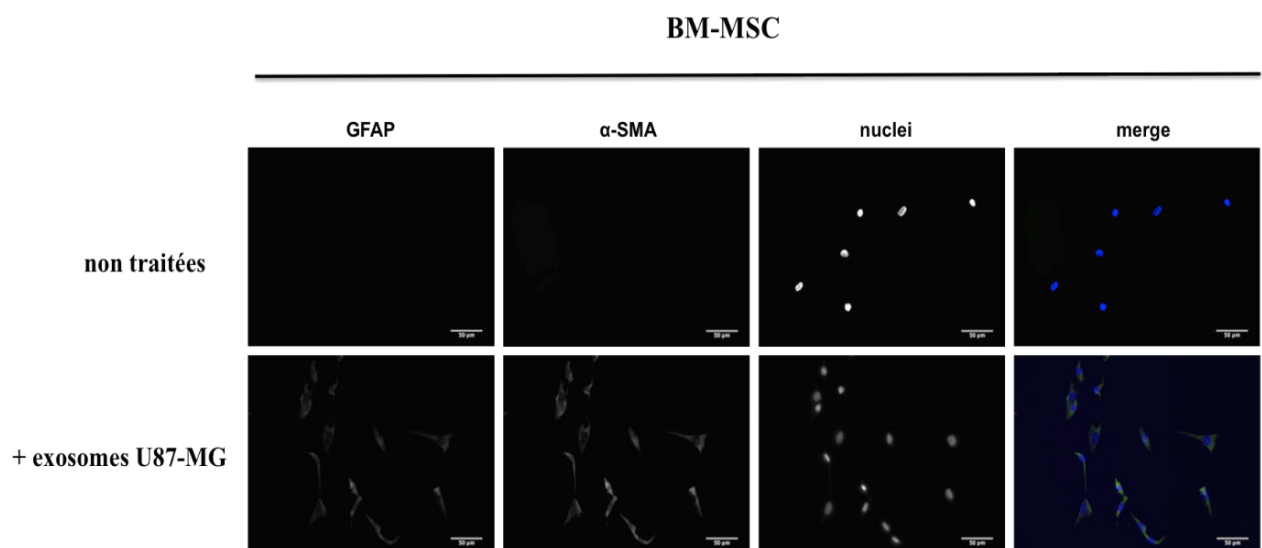


Figure 36 : Modification de l'expression des protéines GFAP et α SMA.

L'expression de la GFAP et de l' α SMA a été recherchée, par immunofluorescence indirecte, dans les BM-MSC traitées ou non avec des exosomes issus de la lignée U87-MG.

Face aux modifications phénotypiques observées, l'impact des exosomes de GBM sur la fonctionnalité des BM-MSC a été recherché.

- Effets des exosomes issus de U87 MG sur la prolifération, la survie et la migration des cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse (BM-MSC)

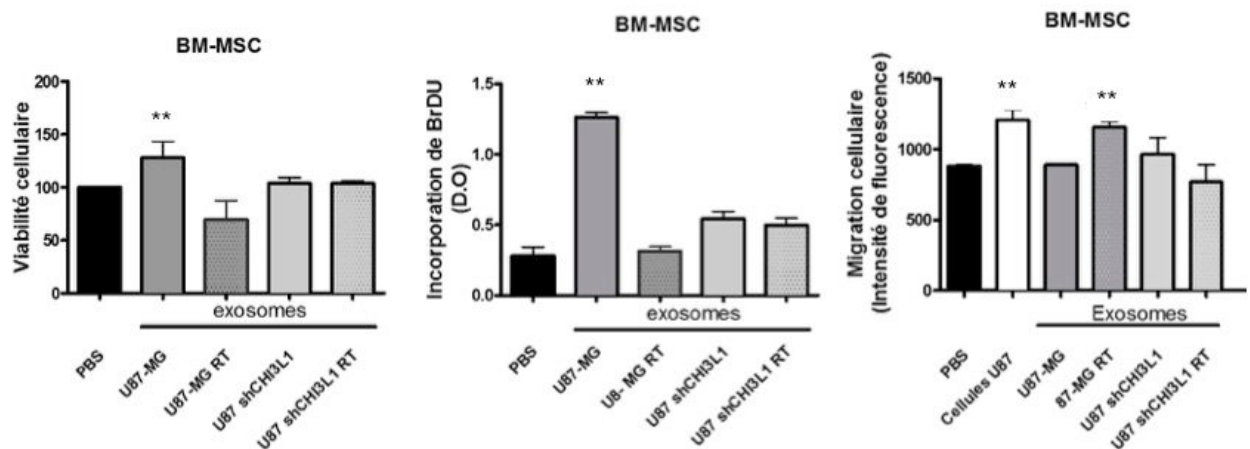


Figure 37 : Effets des exosomes sur la survie, la prolifération et la migration des BM-MSC.

La viabilité cellulaire (test XTT), la prolifération cellulaire (test BrDU) et la migration cellulaire (chambre de Boyden) des BM-MSC traitées ou non avec des exosomes issus de la lignée U87-MG ou U87 shCHI3L1 irradiée (RT) ou non ont été recherchés.

Dans un dernier temps, l'impact fonctionnel des exosomes issus de cellules U87-MG et U87 shCHI3L1 cultivés en milieu différenciant, irradiés ou non, sur les BM-MSC a été étudié (Figure 37).

La viabilité ainsi que la prolifération des BM-MSC varient dans le même sens en fonction du traitement aux exosomes appliqués. En effet, seules les cellules BM-MSC traitées avec des exosomes U87-MG présentent une augmentation significative de la prolifération et de la survie cellulaire. En revanche, les exosomes U87-MG irradiés produisent l'effet inverse sur la survie cellulaire et ils n'ont aucun impact sur la prolifération. Pour les BM-MSC traitées avec des exosomes U87 shCHI3L1 irradiés ou non, la prolifération et la survie ne sont pas affectées. Cependant le profil de migration des BM-MSC traitées ou non varie en sens inverse de celui de la prolifération. Les exosomes U87-MG non irradié et shCHI3L1 n'influencent pas la migration des BM-MSC alors que les exosomes U87-MG irradiés augmentent la migration des BM-MSC. L'impact des exosomes de GBM sur les BM-MSC semble dépendant de l'état d'activation des cellules sécrétrices.

Discussion générale

Les glioblastomes sont des tumeurs particulièrement agressives et présentent un taux de survie qui ne dépasse pas 15 mois. L'échec des thérapies actuelles (chimio et radiothérapies) est lié à la résistance intrinsèque des cellules tumorales, et le caractère infiltrant de ces tumeurs a pour conséquences des récives locales importantes. De plus, le caractère hétérogène de ces tumeurs implique l'existence d'une sous-population cellulaire, les cellules souches cancéreuses (CSC), responsable de l'initiation et du maintien des GBM. Elles partagent des caractéristiques communes avec les Cellules Souches Neutrales (CSNs) à savoir la capacité d'auto-renouvellement, la multipotence et le maintien du stade indifférencié. Les CSC interagissent de façon bidirectionnelle avec le microenvironnement tumoral. En effet, le microenvironnement semble jouer un rôle déterminant dans le maintien de leurs propriétés (Alison et al., 2010). A l'inverse, les CSC communiquent avec le stroma environnant de manière dynamique, de façon à contrôler et détourner ce dernier au profit de la tumeur. C'est par la sécrétion de facteurs solubles ou le relargage d'exosomes dans le milieu extracellulaire que s'effectue le contrôle sur le microenvironnement.

L'étude de ces interactions entre les CSC et le microenvironnement via les exosomes est d'un intérêt majeur puisqu'elle permettra de mieux comprendre les mécanismes d'échappement thérapeutique de la tumeur, mais aussi d'identifier de nouveaux biomarqueurs circulants en neuro-oncologie.

Les neurotrophines sont une famille de facteurs de croissance initialement identifiés dans le système nerveux (Lee and Chao, 2001) et sont impliquées dans l'agressivité de plusieurs tumeurs solides (Thiele et al., 2009). La surexpression des récepteurs aux neurotrophines a été montrée dans le cancer colorectal ainsi que dans de nombreux cancers (Akil et al., 2011; Lawn et al., 2015). Ils contribuent également à la survie et à la croissance des CSCs de GBM favorisant l'agressivité et la résistance thérapeutique (Forsyth et al., 2014; Johnston et al., 2007; Lawn et al., 2015).

Mes travaux de thèse ont porté sur la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles du GBM, à savoir les neurotrophines et leurs récepteurs ainsi que les exosomes. La première partie de ce travail a été consacrée au transfert des

neurotrophines et de leurs récepteurs via les exosomes et à leur fonction sur la modulation de la survie, de l'agressivité et de la radiorésistance tumorale. La seconde partie de mon travail de thèse a porté sur l'impact des exosomes tumoraux dans la communication des cellules cancéreuses avec les cellules saines et plus particulièrement avec les cellules souches mésenchymateuses.

I.16. Les exosomes sont des vecteurs d'agressivité tumorale

La première partie de nos travaux met en évidence de nouveaux mécanismes impliqués dans l'agressivité du GBM et notamment le transfert des récepteurs aux neurotrophines par les exosomes.

La propagation de l'agressivité cellulaire au microenvironnement dépend, en partie, de la sécrétion d'exosomes tumoraux (Keller et al., 2006; Nakano et al., 2015). Comme nos résultats préliminaires ont démontré la présence du récepteur TrkB dans les exosomes de GBM, nous avons supposé que son transfert pourrait promouvoir la tumorigenèse au même titre que l'EGFRvIII (Wilson et al., 2014; Al-Nedawi et al., 2008). Cependant, même si les exosomes transportent des protéines oncogéniques, leur perte pourrait conduire à la différenciation cellulaire et de ce fait être critique pour la progression tumorale (Bauer et al., 2011).

I.17. CHI3L1, un outil pour moduler l'agressivité tumorale

Notre équipe a précédemment mis en évidence une signature spécifique des CSC de GBM dans laquelle le gène *CHI3L1* est surexprimé à la fois dans la lignée cellulaire U87-MG et dans des cultures primaires issus de patients, cultivée en milieu défini (Cheray et al., 2011). Cette protéine est déjà largement associée à l'agressivité des cellules cancéreuses dans de nombreux cancers (Cintin et al., 2002; Jensen et al., 2003; Shao et al., 2011). De plus, sa surexpression (gène et protéine) dans les CSCs de GBM suggère que YKL-40, la protéine codée par *CHI3L1* joue un rôle clé dans l'émergence des clones résistants composés de CSC (Cheray et al., 2011).

L'inactivation de *CHI3L1* conduit à une perte du caractère souche des cellules tumorales se traduisant par une diminution des propriétés d'agressivité des cellules. La corrélation entre agressivité et expression des récepteurs des neurotrophines a

été recherchée dans les cellules de GBM en fonction de leur état de différenciation cellulaire. Les exosomes représentent une source de biomarqueurs circulants qui peuvent être modifiée en fonction du statut de différenciation des cellules sécrétrices. L'analyse de leur contenu permettra de déterminer si leur composition peut influencer le contrôle du microenvironnement notamment via le transfert des récepteurs aux neurotrophines.

L'inhibition de *CHI3L1* induit à la fois une diminution de la prolifération et de la migration des HBMEC, deux propriétés contribuant à renforcer l'agressivité et la survie cellulaire tumorale. Ces données, en accord avec la littérature (Shao et al., 2009), confirment ainsi l'importance de YKL- 40 dans le contrôle des cellules endothéliales vasculaires et de l'angiogenèse tumorale (Francescone et al., 2014; Ku et al., 2011). Comme YKL- 40 est considéré comme un marqueur mésenchymateux exprimé dans les gliomes de haut grade, son inhibition conduit à une réduction significative de la formation de neurosphères associée à une perte des principaux marqueurs de CSC, à savoir l'épitope glycosylé AC133, Oct4 et Sox2 (Phillips et al., 2006). Ces données corrélées avec le profil d'élution par SdFFF des cellules, confirme la perte des cellules indifférenciées. L'ensemble de nos données suggère que la diminution des propriétés fonctionnelles est étroitement liée au changement d'état de différenciation observé dans la lignée sh YKL- 40. La diminution de la prolifération, de l'angiogenèse ainsi que de la capacité des cellules à former des neurosphères secondaires, suggèrent que la lignée sh YKL-40 a acquis un phénotype moins agressif. Cette perte d'agressivité cellulaire peut s'expliquer par la perte du pool de cellules indifférenciées apparentées aux CSC, comme le démontre le profil d'élution général des lignées par SdFFF.

I.18. Changement du niveau d'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs selon le grade d'agressivité des cellules

Après avoir validé notre modèle cellulaire, à savoir l'inhibition de l'expression de YKL-40, nous avons recherché si l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs pouvait varier en fonction du phénotype agressif des cellules. La mise en

culture des cellules U87 pLKO contrôle en milieu défini conduit à un enrichissement en CSC, en accord avec les données de la littérature (Yu et al., 2008b) et une augmentation de l'expression des protéines YKL-40, TrkB et TrkC . Ce résultat est en accord avec leur fonction avérée dans l'agressivité, la croissance et la survie des CSC (Forsyth et al., 2014; Lawn et al., 2015). Il en va de même pour les ligands BDNF et NT3, ainsi que le co-récepteur des neurotrophines, la sortiline, qui est également surexprimée.

A l'inverse, l'inhibition de *CHI3L1* diminue significativement l'expression de TrkB, p75^{NTR} et de la sortiline suggérant ainsi que cette expression dépend du statut de différenciation cellulaire. Cette diminution d'expression pourrait également bloquer leur rôle dans la prolifération et la croissance des CSC de GBM. Outre ces changements cellulaires, le secrétome pourrait lui aussi être impacté conduisant alors à des modifications dans la communication de la cellule cancéreuse avec son environnement. Des études ont précédemment montré que l'agressivité cellulaire du GBM pouvait être médiée par le transfert de l'EGFRvIII au sein des exosomes. Ces exosomes sont en effet capables de transporter et de transférer le récepteur oncogène EGFRvIII à aux cellules de la masse tumorale ne l'exprimant pas. Un mécanisme similaire basé sur le transfert de récepteurs aux neurotrophines via les exosomes et capable de moduler l'agressivité des cellules réceptrices pourrait exister dans le GBM.

I.19. Les récepteurs des neurotrophines peuvent-ils être transférés par les exosomes ?

Les modifications d'expression des récepteurs aux neurotrophines TrkB, p75^{NTR} et de la sortiline, observées au niveau cellulaire, ont ensuite été recherchées au niveau des exosomes tumoraux. Même si nos deux lignées cellulaires ont la capacité de sécréter des exosomes de même taille et de même structure, leur contenu en YKL-40, TrkB, p75^{NTR} et sortiline est différent. En effet, les analyses protéiques révèlent que les récepteurs TrkB, p75^{NTR} et sortiline sont plus faiblement exprimés dans les exosomes issus des cellules sh YKL-40. A ce jour, aucune étude ne s'était intéressée à la présence et au rôle de ces récepteurs au sein des exosomes de GBM.

De façon plus précise, l'étude de la répartition de marqueurs exosomaux (CD63 et CD9) et des protéines TrkB, p75^{NTR} et sortiline, après séparation des vésicules sur un gradient de sucrose, montre que ceux-ci ne se répartissent pas de façon identique entre les différentes fractions. Pour les exosomes issus des cellules pLKO, la flottaison sur gradient de sucrose, laisse apparaître deux populations de vésicules enrichies en CD63 et CD9. Plus précisément, la première population correspond à des vésicules ayant une densité comprise entre 1,08 et 1,14g/mL et enrichies en CD63, CD9 et EGFR. La seconde population correspond à des vésicules de plus haute densité (1,18-1,21g/ml) et enrichies en CD63, CD9, TrkB, p75^{NTR} et sortiline. L'inhibition de l'expression de YKL-40 n'induit pas une diminution généralisée de l'ensemble des vésicules sécrétées, mais inhibe plus particulièrement la sécrétion de celles de plus haute densité et enrichies en TrkB, p75^{NTR} et sortiline. Les vésicules de faible densité riches en CD63, CD9 et EGFR sont toujours présentes. Une étude réalisée sur des exosomes issus de cellules tumorales murines (4T1) montre qu'il existe différentes populations de vésicules co-purifiées par le protocole d'ultracentrifugation (Bobrie et al., 2012). Certaines de ces vésicules sont sécrétées selon un mécanisme dépendant de Rab27a et présentent une densité 1,14-1,15 g/mL, avec un enrichissement en CD63, CD9, Tg101, Alix, Mfge8. En revanche, d'autres vésicules co-purifiées sont produites selon un mécanisme indépendant de Rab27a et présentent une densité 1,11 et 1,17 g/mL avec un enrichissement faible en CD63 mais fort en CD9 et Mfge8. Ces deux types de vésicules pourraient avoir pour origine des compartiments intracellulaires différents (Bobrie et al., 2012). Dans le GBM, les exosomes issus des cellules souches cancéreuses pourraient avoir pour origine un compartiment intracellulaire différent des exosomes issus des cellules tumorales. La perte d'une population cellulaire possédant un caractère indifférencié, suite à l'inhibition de YKL-40, pourrait alors conduire à la perte d'une sous-population d'exosomes spécifiques. De ce fait, la sous-population d'exosomes enrichis en TrkB, p75^{NTR} et sortiline pourrait être responsable du transfert d'agressivité au microenvironnement. Pour caractériser ces deux sous-populations, il serait alors intéressant de rechercher l'origine cellulaire de ces exosomes en analysant les marqueurs de différenciation et d'indifférenciation qu'ils expriment. De plus, l'utilisation d'un modèle murin nous permettrait de déterminer le rôle exact de ces deux sous-populations dans la tumorigenèse.

Nos premiers résultats démontrent que l'inhibition de la protéine YKL-40 dans des cellules de GBM induit des changements du statut de différenciation des cellules conduisant à d'une perte du caractère indifférencié et à une disparition des CSC ainsi que des principaux récepteurs des neurotrophines aussi bien à l'échelle cellulaire qu'au niveau des exosomes. Etant donné que les exosomes permettent aux cellules tumorales de communiquer avec le microenvironnement, l'impact d'un changement phénotypique sur le transport et la diffusion du matériel protéique via les exosomes a été recherché. Notre objectif étant d'explorer plus précisément la fonction des neurotrophines et de leur récepteur dans le transfert d'agressivité tumorale.

I.20. Le transfert de TrkB dans les exosomes permet de propager l'agressivité tumoral à l'ensemble du microenvironnement

Les fonctions des exosomes tumoraux provenant de différents types cellulaires ont été testées auparavant, *in vitro* et *in vivo*, à partir des culots d'exosomes purifiés et concentrés (Liu et al., 2006a). Dans notre étude, des tests fonctionnels après traitements par des exosomes issus de cellules pLKO ou de cellules sh YKL-40 sont réalisés de façon à déterminer leur influence sur l'activation des cellules cibles.

Quelles que soient les cellules réceptrices traitées, cellules tumorales de GBM à des stades de différenciation différents (cellules pLKO ou sh YKL-40) ou cellules endothéliales du type HBMEC (Human Brain Microvascular Endothelial Cells), les exosomes marqués au PKH67 sont internalisés. En accord avec nos premiers résultats, les cellules sh YKL-40 présentent à la fois une capacité de prolifération et une capacité à induire la migration des HBMEC diminuée. Des travaux antérieurs ont montré que l'inhibition de YKL-40 diminuait la vascularisation du GBM (Shao et al., 2014). Néanmoins, le traitement des cellules sh YKL-40 avec 30 µg d'exosomes provenant de cellules pLKO augmente de manière significative leur prolifération ainsi que leur capacité à induire la migration des HBMEC. Ces résultats suggèrent que le contenu des exosomes issus de cellules tumorales ayant conservé un phénotype agressif suffit pour restaurer la prolifération et l'invasion des cellules cibles afin de promouvoir la croissance tumorale et l'angiogenèse. Ainsi, des travaux antérieurs ont déjà rapporté l'induction de la sécrétion d'exosomes à la suite d'un stress hypoxique

et leur fonction dans la promotion de l'angiogenèse et des métastases dans des lignées de cancer bronchique et du sein (Park et al., 2010). Plus récemment, des travaux de l'équipe, suggèrent que dans le cancer bronchique non à petites cellules, le transfert d'un complexe associant les récepteurs oncogéniques TrkB et EGFR à la sortiline permet d'activer l'angiogenèse tumorale (Wilson et al., 2014). Nos résultats semblent confirmer le rôle fonctionnel du transfert protéique via les exosomes et permet de mieux comprendre comment la tumeur selon son état de différenciation ou les conditions de stress dans lesquelles elle se trouve, peut moduler son microenvironnement. Ainsi, les récepteurs aux neurotrophines contenus au sein des exosomes pLKO pourraient participer à la restauration du phénotype agressif des cellules sh YKL-40. Cette hypothèse semble se vérifier quand la condition inverse est appliquée. En effet, la prolifération et la capacité à induire la migration des HBMEC sont diminuées lorsque les cellules pLKO sont traitées avec 30 µg d'exosomes issus de cellules sh YKL-40 déplétés en TrkB, P75^{NTR} et sortiline. Le contenu des exosomes reflète la nature même des cellules ainsi que leur statut de différenciation. Ainsi, la perte du phénotype agressif des cellules sh YKL-40 implique que les exosomes sécrétés par ces cellules sh YKL-40 ont perdu une partie du matériel protéique nécessaire pour promouvoir l'invasion et l'agressivité tumorale.

Bien que le rôle de TrkB et TrkC soit connu dans la néovascularisation des carcinomes à cellules squameuses (Sasahira et al., 2013). Nos résultats démontrent, pour la première fois, que le transfert et l'internalisation des récepteurs aux neurotrophines, contenus dans les exosomes, par les cellules sh YKL-40 est un prérequis nécessaire pour que ces cellules puissent induire la migration des HBMEC. L'inhibition de ce mécanisme par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de l'activité tyrosine kinase des Trks, le K252a suggère que le mécanisme mis en jeu dépend de TrkB, puisque TrkA n'est pas exprimé dans les cellules U87-MG native et que l'expression de TrkC reste inchangée quel que soit le type cellulaire (Tapley et al., 1992). D'autre part, le niveau d'expression des transcrits TrkB ne varient pas dans les cellules sh YKL-40 même après traitement aux exosomes suggérant ainsi que l'augmentation d'expression du récepteur TrkB dans les cellules cibles est principalement due à un transfert protéique via les exosomes. Un mécanisme similaire permettant le transfert de la protéine KIT a été mis en évidence dans les exosomes sécrétés par les cellules A549 de cancer bronchique. Il permet d'activer la

prolifération des cellules (Xiao et al., 2014). L'augmentation de la phosphorylation du récepteur TrkB dans les cellules sh YKL-40 traitées aux exosomes pLKO indique qu'une cascade de signalisation passant par TrkB semble être activée et conduit à une réponse cellulaire pro-tumorale. Un mécanisme similaire a été rapporté avec des exosomes, contenant la protéine KIT, capable d'activer la prolifération ainsi que la voie de signalisation de la PI3K (Xiao et al., 2014). Au contraire, un traitement des cellules pLKO avec des exosomes sh YKL-40 induit une diminution de la prolifération cellulaire, de la migration des HBMEC et de la phosphorylation du récepteur TrkB.

Ces résultats mettent en évidence un nouveau mécanisme dans le GBM, selon lequel le transfert de TrkB par les exosomes permettrait de transférer ou propager l'agressivité et le caractère invasif aux cellules environnantes. Afin de poursuivre ce travail et pour décrypter le mécanisme d'activation, il serait maintenant intéressant de déterminer si ces 3 récepteurs TrkB, p75^{NTR} et sortiline sont transportés au sein des exosomes seuls et inactifs ou déjà sous la forme homo- ou hétéro-dimère fonctionnellement actifs. Pour compléter ces résultats, des lignées de GBM inactivées pour TrkB doivent être développées, afin d'identifier tous les acteurs de la signalisation mis en jeu dans ce mécanisme. De la même manière, le rôle de p75^{NTR} dans la modulation du phénotype agressive devra être recherchée.

1.21. *In vivo*, les exosomes agissent directement sur la croissance et la progression tumoral

Des modèles de xénogreffes hétérotopiques, effectués sur des souris SCID nous ont permis de confirmer une partie de nos résultats *in vitro*. Il est déjà connu que les CSC de GBM ont la capacité de contrôler la progression et la croissance tumorale (Cheng et al., 2013). Dans notre étude, la capacité des cellules inactivées pour YKL-40 à former des tumeurs a été altérée. Sur 15 souris et quel que soit le nombre de cellules injectées, aucune tumeur ne s'est développée. La capacité à régénérer la masse tumorale fait partie des critères fonctionnels majeurs permettant de caractériser des CSCs (Singh et al., 2004). La disparition de cette propriété suggère que l'inactivation de YKL-40 a conduit à une perte des propriétés souches au sein de la lignée U87-MG. Nos résultats sont de plus en accord avec les travaux antérieurs qui montrent que l'utilisation d'un anticorps neutralisant pour YKL-40 sur des

xénogreffes de GBM inhibe la croissance tumorale (Faibish et al., 2011). Ces données *in vivo* confirment donc que la lignée inactivée pour YKL-40 a perdu la population de cellules indifférenciées capables d'auto-renouvellement. L'absence de tumeurs dans cette condition n'a pas permis d'étudier l'influence des exosomes issus des cellules pLKO et ainsi de confirmer les résultats obtenus *in vitro*.

Concernant les xénogreffes des cellules pLKO, le volume tumoral reste inchangé après traitement aux exosomes pLKO. Ces données suggèrent que des exosomes issus de même origine cellulaire n'ont pas d'effet additionnel sur la tumorigénèse.

Cependant, le traitement des tumeurs pLKO avec des exosomes sh YKL-40 réduit considérablement le volume tumoral, le taux de prolifération et l'angiogénèse, quantifiés en immunohistochimie respectivement par l'expression des marqueurs Ki67 et CD31. Ces résultats suggèrent que le cargo exosomal, spécifique des cellules sh YKL-40, est capable d'inhiber les mécanismes de tumorigénèse. Dans le cancer du sein, les exosomes issus de cellules souches mésenchymateuses inhibent l'angiogénèse tumorale via une régulation négative du VEGF dans les cellules cibles (Lee et al., 2013). Ces derniers sont enrichis en miR-16, un miR connu pour cibler le VEGF, et responsable en parti de l'effet anti-angiogénique. YKL-40 est connu pour réguler positivement l'expression du VEGF et de ce fait, l'angiogénèse tumorale (Francescone et al., 2011b; Shao, 2013). Un mécanisme similaire, mettant en jeux un miR ciblant le VEGF, pourrait être imaginé suite à l'inhibition de YKL-40 dans les cellules de GBM.

L'ajout répété d'exosomes issus des cellules sh YKL-40 régule négativement la prolifération cellulaire et semble favoriser la différenciation cellulaire au vu de la perte d'expression d'Oct4 et de YLK-40. Ces modifications phénotypiques pourraient s'expliquer par la perte des exosomes issus des CSC au sein de la lignée sh YKL-40. Les données de la littérature indiquent que dans différents types de cancer (rein, sein et prostate) les CSC sécrètent des exosomes aux propriétés « souches » capables d'activer la progression tumorale (Fatima and Nawaz, 2015; Grange et al., 2011; Kumar et al., 2014). A l'inverse, leur disparition pourrait forcer la différenciation cellulaire et de ce fait moduler négativement la tumorigénèse (Bauer et al., 2011).

Cependant, la perte des récepteurs aux neurotrophines au sein des exosomes sh YKL-40 observé *in vitro*, ne suffit pas à expliquer la diminution d'expression des

protéines TrkB, p75^{NTR} et sortiline. Ces changements pourraient aussi dépendre d'un transfert spécifique de miR au sein des exosomes sh YKL-40, inhibant alors la croissance tumorale. Cette hypothèse basée sur le transfert de répresseur oncogénique via les exosomes est étayée par des travaux antérieurs qui démontrent que les exosomes de GBM modulent leur microenvironnement via le transfert de miR-1 (Bronisz et al., 2014). Aussi, la répression des récepteurs aux neurotrophines dans les cellules sh YKL-40 pourrait être due à l'action du miR-200c, connu pour inhiber sélectivement le récepteur TrkB (Knezevic et al., 2015; Ma et al., 2015). Une surexpression de ce miR-200c altère également la fonctionnalité des CSC, augmente la chimiosensibilité et réduit le potentiel métastatique des cellules tumorales dans le cancer du pancréas et le cancer du sein (Knezevic et al., 2015).

On peut ainsi émettre l'hypothèse selon laquelle l'inactivation de YKL-40 dans la lignée U87-MG conduit à une perte du caractère souche au profit d'un caractère plus différencié des cellules tumorales. Ces changements modifient la nature et le contenu des exosomes sécrétés par ces cellules qui transportent et transfèrent des miRNA répresseurs de tumeur capables de bloquer la croissance tumorale.

Par la suite, il serait intéressant de traiter au témozolomide (Témodal®) les tumeurs présentant un phénotype différencié pour savoir si elles présentent également une chimiosensibilité plus importante susceptible de permettre l'éradication totale de la tumeur.

Même si certaines mutations génétiques sont actuellement recherchées dans les biopsies de gliomes afin d'identifier le sous-type ou de prévoir la réponse thérapeutique (Hegi et al., 2005; Louis et al., 2014; Vigneswaran et al., 2015), aucun marqueur diagnostique n'est actuellement recherché en biopsie liquide chez les patients présentant un GBM. En effet, les protéines présentes dans les exosomes pourraient être source d'informations sur la tumeur, sa composition et son agressivité. A l'échelle du patient, nos résultats indiquent que TrkB est exclusivement détecté dans les exosomes issus du plasma de patients atteints d'un glioblastome. Son rôle potentiel en tant que nouveau biomarqueur devrait être évalué sur un large panel de patients et son expression corrélée avec le grade du gliome. Actuellement, seule la mutation de l'EGFRvIII a pu être identifiée dans des exosomes issues du sérum de patients atteints d'un GBM (Al-Nedawi et al., 2008; Skog et al., 2008). Ce variant constitutivement actif, est dépourvu de sa partie extracellulaire, il induit ainsi

une prolifération tumorale et échappe aux agents thérapeutiques ciblant l'EGFR. Nos travaux suggèrent que la détection et le suivi de TrkB dans les exosomes pourrait représenter un marqueur prédictif. De plus, les niveaux protéiques pouvant être relativement faibles pour certains patients, l'analyse des transcrits de TrkB pourrait être privilégiée. Il faudra pour cela vérifier si les transcrits de TrkB sont également transportés par les exosomes.

Nos résultats indiquent que les cellules de GBM, et en particulier les cellules souches cancéreuses, sont capables d'interagir et de contrôler le microenvironnement via la sécrétion d'exosomes spécifiques. Ces exosomes enrichis en TrkB, p75^{NTR} et sortiline véhiculent l'agressivité tumorale et modulent le phénotype des cellules environnantes de façon à promouvoir la croissance tumorale. A l'inverse, les exosomes issus de cellules plus différenciées, semblent moduler le phénotype cellulaire au profit d'une diminution d'agressivité tumorale.

L'hypothèse selon laquelle les exosomes tumoraux peuvent reprogrammer la cellule tumorale et ainsi influencer son comportement en transférant un cargo protéique spécifique semble être en partie validée par nos travaux. Des travaux complémentaires devront être menés pour déterminer si ce cargo peut aussi altérer la réponse aux thérapies actuelles et ainsi favoriser l'échappement thérapeutique de la tumeur.

I.22. Etude du rôle des neurotrophines dans les mécanismes de radiorésistance

La radiothérapie est un outil thérapeutique important dans le traitement des GBMs. Son efficacité reste cependant limitée en raison d'une part de la radiorésistance intrinsèque des GBMs due notamment aux CSCs et d'autre part de la radiosensibilité des cellules saines du SNC causant des dommages cognitifs irrémediables (Fike et al., 2009). L'augmentation des doses d'irradiation n'étant pas envisageable pour traiter les GBMs, il est important de comprendre les mécanismes mis en jeu en réponse aux radiations ionisantes dans les cellules associées à la radiorésistance. En collaboration avec le service de radiothérapie du CHU de Limoges, nous avons cherché à identifier les facteurs cibles à l'origine des mécanismes de radiorésistance.

L'objectif principal de ce travail a été d'étudier si la sensibilité des cellules à l'irradiation pouvait dépendre du transfert de récepteurs des neurotrophines par les exosomes tumoraux :

Afin d'étudier le rôle des exosomes dans la radiorésistance cellulaire, une inhibition du gène *Rab27a* au sein de la lignée de GBM humain U87-MG a été effectuée. Ce gène est nécessaire à la sécrétion des exosomes dans les cellules tumorales Hela (Ostrowski et al., 2010). La transfection lentivirale de shRNA, a conduit à l'obtention d'une lignée stable dans laquelle l'expression du gène *Rab27a* a été inactivée. Des travaux antérieurs démontrent que l'irradiation augmente la capacité des cellules de GBM à sécréter des exosomes. Cette sécrétion serait dépendante de la dose et du temps d'irradiation des cellules (Arscott et al., 2013). Dans notre modèle inactivé pour *Rab27a*, la capacité des cellules à sécréter des exosomes diminue significativement cependant leur internalisation n'est pas modifiée. En effet, les exosomes internalisés semblent capables d'être recyclés dans le trafic intracellulaire de la cellule cible.

La fonction des exosomes dans les mécanismes de radiosensibilité a été étudiée grâce à des tests fonctionnels (prolifération et auto-renouvellement). Après radiothérapie, la prolifération des cellules diminue de façon comparable dans les 2 lignées cellulaires bien que les cellules U87 shRab27a présentent une prolifération basale supérieure aux U87-MG. La surexpression de *Rab27a* est connue pour favoriser l'invasion et les métastases dans le cancer du sein (Wang et al., 2008a). Celle-ci a également été observée à la suite d'une radiothérapie pré-opératoire chez des patients présentant un cancer rectal (Supiot et al., 2013). Ainsi, la perte de fonction de *Rab27a* dans nos lignées pourrait expliquer la diminution significative de la prolifération des U87 shRab27a à la suite de la radiothérapie. De façon similaire à la prolifération, les propriétés d'auto-renouvellement sont altérées après irradiation dans les 2 lignées suggérant une diminution de la capacité clonogène propre à la présence de CSC. L'agressivité tumorale dépend du nombre de clones formés. Ce nombre est plus important dans les cellules U87-MG témoin en comparaison aux cellules inactivées pour *Rab27a*. Les travaux de Bobrie et al, (Bobrie et al., 2012a) montrent en effet que l'inactivation du gène *Rab27a* inhibe l'agressivité des cellules cancéreuses et diminue leur capacité à régénérer la tumeur.

Nous avons alors émis l'hypothèse qu'un traitement par des exosomes tumoraux non irradiés pouvait exercer un rôle protecteur sur les cellules réceptrices des radiations ionisantes.

Une augmentation significative de la prolifération et de l'auto-renouvellement est observée dans les 2 lignées cellulaires après ajout d'exosomes en fin d'irradiation.

Plusieurs études récentes s'intéressent aux rôles des exosomes tumoraux dans les mécanismes de radiorésistance. Dans les kératinocytes humains, les exosomes participent à l'effet bystander ou « non-ciblé » induit par l'irradiation (Jella et al., 2014). L'effet bystander consiste en un transfert des dommages des cellules irradiées aux cellules voisines non irradiées. Dans le GBM, les données suggèrent que les rayonnements influencent la production d'exosomes, modifie spécifiquement leur composition moléculaire et active la migration des cellules réceptrices (Arscott et al., 2013). Le phénotype migratoire des cellules cibles est permis grâce à l'activation de protéines impliquées dans la migration cellulaire telle que le récepteur aux neurotrophines TrkA, Fak (focal adhesion kinase), la Paxilline et la protéine Src (Arscott et al., 2013).

Nos résultats semblent confirmer l'hypothèse de départ selon laquelle les exosomes protégeraient les cellules cibles en diminuant les effets de l'irradiation. L'analyse du transfert de matériel génétique et protéique spécifique, par les exosomes, constitue alors une piste intéressante afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la radiorésistance.

I.23. Les récepteurs aux neurotrophines et leurs ligands représentent des facteurs de radiorésistance.

L'utilisation de AZ64 un inhibiteur de NTRK augmente l'efficacité de la radiothérapie et inhibe la survie tumorale dans des modèles de xénogreffes de neuroblastome. Etant donné que la composition des exosomes sécrétés par des cellules exposées à différents stress dont la radiothérapie est modifiée, notre choix s'est naturellement porté sur l'étude de l'expression des récepteurs aux neurotrophines au sein des exosomes ainsi que leur implication dans les mécanismes de radiorésistance (Iyer et al., 2012; Villarroja-Beltri et al., 2014).

L'augmentation de l'expression de l'EGFRvIII semble être plus importante après ajout d'exosomes dans les 2 lignées cellulaires. Ce résultat semble corroborer l'hypothèse d'Al-Nedawi (Al-Nedawi et al., 2008) selon laquelle l'EGFRvIII serait véhiculé par les exosomes issus de cellules de glioblastomes permettant la propagation de l'agressivité cellulaire. Dans notre cas, l'apport d'EGFRvIII pourrait participer à la mise en place des mécanismes de radiorésistance. Il a en effet pu être constaté que l'expression d'EGFRvIII favorisait l'activation de protéines de réparation et ainsi permettait de réparer les cassures à l'ADN (Mukherjee et al., 2009).

Une perte d'expression de TrkB, de p75^{NTR} et de la sortiline après radiothérapie dans les U87-MG a pu être observée. Leur expression est cependant restaurée après traitement aux exosomes. Dans la lignée inactivée pour Rab27a, les mêmes variations sont observées sauf pour p75^{NTR} dont l'expression augmente après radiothérapie, et non après traitement aux exosomes.

Il semblerait donc que TrkB et la sortiline soient transférés aux cellules cibles par les exosomes ajoutés en fin d'irradiation suggérant un transfert de ces protéines aux cellules irradiées qui pourrait être responsable de l'augmentation de la prolifération. Ce résultat semble en accord avec les données de la littérature montrant que l'inhibition de TrkB par AZ64, un inhibiteur de Trk, augmente l'efficacité de la radiothérapie et inhibe la survie tumorale. Il sera par la suite intéressant de regarder si le récepteur TrkB est transporté par les exosomes sous sa forme active phosphorylée ou inactive. De la même façon que pour nos premiers résultats, l'analyse des voies de signalisation permettant la prolifération cellulaire dans les cellules cible devra être recherchée. Selon le type de cancer, les récepteurs aux neurotrophines sont associés à un bon (mort et régression tumorale) (Grotzer et al., 2000; Nakagawara et al., 1993) ou à un mauvais pronostic (survie et progression tumorale) (Wadhwa et al., 2003; Xiong et al., 2015). Dans le cas du glioblastome, la signalisation des neurotrophines semble présenter une dualité fonctionnelle, mais leur fonction exacte reste encore controversée et peu étudiée. Il a été montré que l'expression de TrkB était de mauvais pronostic via l'augmentation de l'angiogénèse et de l'agressivité (Brodeur et al., 1997). La sortiline, quant à elle, agit comme un co-récepteur des neurotrophines et présente elle aussi une dualité fonctionnelle. Complexée au récepteur de haute affinité TrkB, elle permettrait la survie cellulaire en liant les neurotrophines (Akil et al., 2011). Notre étude montre un profil similaire entre

TrkB et la sortiline dans les cellules, de telle sorte que ces 2 protéines pourraient former un complexe permettant l'activation de voies de survie. Dans le cancer du poumon, un complexe hétérotrimérique, le complexe TES (TrkB-EGFR-sortiline) a récemment été identifié et participe à l'angiogenèse tumorale via son transfert par les exosomes (Wilson et al., 2014b). Dans le GBM, notre hypothèse serait que ce complexe pourrait participer au phénomène de radiorésistance via son transfert par les exosomes. Des expériences d'immunoprécipitations devront être réalisées pour déterminer s'il existe un complexe transporté au sein des exosomes de GBM ainsi que la nature de ce dernier.

Quant au récepteur p75^{NTR}, il semblerait être un régulateur central de l'invasion gliale (Johnston et al., 2007). La radiothérapie entraîne une sécrétion de p75^{NTR} dans les exosomes issus de cellules U87-MG mais aussi dans les exosomes issus de cellules U87 shRab27a. Ces exosomes pourraient faciliter l'invasion tumorale (Yang and Robbins, 2011). Ce mécanisme pourrait s'appuyer sur le transfert de la protéine p75^{NTR} via les exosomes.

Enfin, la forte expression de p75^{NTR} dans les exosomes issus des cellules U87 shRab27a indique que leur sécrétion n'est pas totalement dépendante de Rab27a. Des travaux indiquent qu'il existe différentes populations de vésicules qui contiennent plus spécifiquement certains récepteurs que d'autres (Bobrie et al., 2012b). Il pourrait y avoir une sécrétion de microvésicules particulières n'exprimant pas CD9 qui seraient produites par les cellules U87 shRab27a. Cette protéine connue également pour être impliquée dans la sécrétion des exosomes (Ostrowski et al., 2010), pourrait contrôler l'adressage du p75^{NTR} dans les exosomes et son relargage dans le milieu environnant.

Dans la poursuite de ce travail, une inhibition de la sécrétion exosomale à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques tel que la Diméthyl Amiloride (DMA) (Savina et al., 2002) pourrait être envisagé. La DMA est un inhibiteur des échangeurs Na⁺/H⁺ et Na⁺/Ca²⁺ qui participent respectivement au contrôle du pH intracellulaire et au contrôle de la concentration de calcium intracellulaire. Le calcium cytosolique est nécessaire à la fusion des MVB à la membrane plasmique. L'absence de calcium inhibe la sécrétion des exosomes

Par la suite, la purification des différentes sous-populations de vésicules, notamment par gradient de sucrose permettrait de les caractériser en spectrométrie de masse pour obtenir une analyse exhaustive du contenu protéique.

Si plusieurs travaux en oncologie ont suggéré l'implication des exosomes dans des phénomènes de résistance aux traitements, aucune donnée n'est disponible concernant les variations d'expression des neurotrophines contenus au sein des exosomes à la suite d'une irradiation. Ces données obtenues semblent aller en faveur de l'existence de phénomènes adaptatifs de résistance à l'irradiation médiés par le transfert d'un cargo spécifique via les exosomes. Ces résultats soulignent l'intérêt de la réalisation d'une étude à l'échelle du patient. Au cours de notre projet nous avons pu mettre en place une étude clinique avec recueil de sérum de patients porteurs d'un gliome de haut grade avant et après traitement par radio-chimiothérapie concomitante selon le protocole STUPP. La mise au point des conditions expérimentales est à ce jour en cours et nous espérons pouvoir confirmer prochainement nos résultats *ex vivo*.

Le transfert de matériel protéique via les exosomes produits au cours de la radiothérapie permet d'exercer un contrôle sur le microenvironnement. Cependant, notre approche actuelle ne nous a pas permis d'étudier l'effet des exosomes et de leur contenu sur le microenvironnement.

I.24. Impact des exosomes de GBM sur le microenvironnement tumoral.

Les exosomes exercent un contrôle permanent sur le microenvironnement tumoral. Parmi, les cellules cibles présentes dans celui-ci, on trouve notamment les CSM. Dans cette dernière partie de mon travail, l'objectif était d'étudier l'impact d'exosomes de GBM sur les cellules du microenvironnement à savoir les astrocytes sains et les CSM. Ces effets ont ou être analysés en modulant l'état d'agressivité des cellules productrices d'exosomes, à savoir une population enrichie en cellules souches cancéreuses (milieu défini), une population cellulaire ayant perdu ses propriétés tumorigènes (U87 shCHI3L1) en comparaison à la lignée parentale (U87-MG). En parallèle, l'effet de la radiothérapie dans la modulation du phénotype des CSM a été évalué selon le même principe.

Les CSM ont la capacité de migrer spécifiquement vers les tumeurs et les métastases à travers l'organisme ou de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour atteindre les gliomes (Gao et al., 2010a). Actuellement, une importante controverse existe concernant la fonction des CSM sur la croissance tumorale puisqu'une partie des études met en évidence l'action pro-tumorale des CSM alors que l'autre partie met en avant leur capacité anti-tumorale. En effet, le rôle des CSM dans les tumeurs et en périphérie tumorale n'est pas encore bien élucidé et certaines études semblent indiquer que les CSM augmenteraient le développement tumoral de différentes manières (Karnoub et al., 2007). (i) par la création d'une niche pour les cellules souches cancéreuses, (ii) en détériorant la surveillance du système immunitaire, (iii) par leurs propriétés pro-antigéniques via la sécrétion de VEGF (Yu et al., 2008a).

D'autres études démontrent leur rôle anti-tumoral (Lazennec and Jorgensen, 2008). Ainsi, Nakamura et al. ont mis en évidence des effets anti-tumoraux et une prolongation de la survie dans un modèle de gliome notamment grâce à l'injection de CSM modifiées surexprimant l'IL-2. Le mécanisme d'action mis en jeu n'a pas pu être mis en évidence mais il s'agirait d'un mécanisme indirect (Nakamura et al., 2004). De même, Gao et al. ont montré que des cellules souches mésenchymateuses issues

de la moelle osseuse (BM-MSC), modifiées pour exprimer du PEDF (Pigment epithelium-derived factor) et administrées par voie intraveineuse exercent un effet anti-tumoral significatif sur un modèle d'hépatocarcinome orthotopique (Gao et al., 2010b). De plus, cet effet est corrélé avec une diminution de la néoangiogénèse tumorale (Gao et al., 2010b).

L'impact des exosomes tumoraux sur les astrocytes sains n'a pas pu être déterminé, notre recherche s'est orientée sur les CSM qui ont un tropisme pour les cellules tumorales et notamment pour les gliomes, *in vivo*, lorsqu'elles sont administrées par IV (Kosztowski et al., 2009). Dans un premier temps, l'impact de ces exosomes a pu être mis en évidence au travers de changements morphologiques des cellules réceptrices (BM-MSC). La densité cellulaire des CSM semble modérément modifiée après traitement aux exosomes issus de la lignée parentale U87-MG, tandis qu'un traitement aux exosomes issus d'une population enrichie en CSC l'augmente drastiquement. De plus les cellules semblent former un front de migration constitué de plusieurs couches cellulaires. Concernant le traitement aux exosomes issus de la lignée U87 shCHI3L1, les CSM semblent adopter une morphologie différente des cellules contrôles, proche des cellules gliales. En revanche, les exosomes issus de cette même lignée cultivée en milieu défini, entraînent l'acquisition d'une morphologie de type sénescence ou plus différenciée similaire à ce que l'on observe au sein d'une population de CSM à passage tardif *in vitro*. Les changements morphologiques observés au sein des BM-MSC pourraient être dépendants de la proportion de CSC présentes, dans les lignées cellulaires de GBM. Ces données seraient en accord avec une étude montrant le tropisme des CSM pour les cellules souches gliales (Liu et al., 2014).

Les BM-MSC traitées avec des exosomes U87-MG irradiés semblent adopter la même morphologie que celle induite par les exosomes U87 shCHI3L1 en milieu défini, ce qui corrobore l'idée que les cellules de GBM en situation de stress, modifient l'information contenue dans les exosomes. D'autre part, la culture des U87-MG en milieu défini permettrait l'émergence de clones cellulaires radiorésistants, les CSCs (Bao et al., 2006). Les exosomes issus de ces clones pourraient favoriser l'émergence d'une population mixte au sein des CSM lors du traitement. Enfin, nos résultats montrent que des exosomes issus de lignées U87 shCHI3L1 ayant subi une

irradiation semblent altérer la viabilité des CSM suggérant ainsi que la perte du caractère cellules souches cancéreuses via l'inactivation de *CHI3L1* pourraient modifier le contenu des exosomes.

Etant donné le rôle clé du gène *CHI3L1* dans le GBM, responsable du maintien du phénotype agressif, de l'acquisition du caractère infiltrant, de la radiorésistance, et dans l'angiogenèse tumorale (Cheray et al., 2011; Francescone et al., 2011b), son inactivation pourrait avoir un rôle direct sur le contrôle du microenvironnement en raison des modifications du contenu des exosomes (article 1).

Devant l'impact des exosomes de GBM sur la morphologie cellulaire, une analyse plus approfondie portant sur des marqueurs protéiques a été réalisée afin de caractériser ces modifications phénotypiques.

Les premiers marqueurs étudiés sont couramment exprimés par les CSM: CD44 et la N-cadhérine. L'expression de CD44 diminue dans les BM-MSC traitées par des exosomes issus de la lignée parentale U87-MG suggérant une perte de l'état souche et donc un engagement vers une voie de différenciation. La N-cadhérine est également considérée comme un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse dans les carcinomes (Smith et al., 2013). L'ajout d'exosomes tumoraux sur les BM-MSC ne modifie cependant pas l'expression de la N-cadhérine.

Quelle que soient les conditions, les exosomes de GBM induisent l'expression de l'alpha-SMA. Cette expression est plus importante dans les CSM traitées aux exosomes de la lignée contrôle ou enrichies en CSC. Etant donné que l'alpha-SMA est exprimée par des cellules de type myofibroblastique et les CAF (*Carcinoma Associated Fibroblastes*) (Chowdhury et al., 2015; Haga et al., 2015), l'augmentation de son expression à la suite du traitement par les exosomes suggère une différenciation des CSM en cellules stromales de type CAF. De la même manière, une induction de l'expression de la GFAP est observée après traitement aux exosomes et plus particulièrement dans la condition milieu défini ce qui semble en accord avec les modifications morphologiques observées et agrémentent la piste d'une différenciation des CSM en cellules gliales.

Il est difficile de répondre quant aux variations des niveaux d'expression de l'EGFR qui semble cependant plus élevés lorsque les CSM ont été exposées aux exosomes de GBM.

L'expression de Runx2, facteur de transcription de la lignée ostéoblastique, se retrouve augmentée suite aux traitements. De façon intéressante, il a été associé à la transformation oncogénique dans le cas du mélanome (Boregowda et al., 2014). D'autre part, dans des tumeurs primaires de GBM, l'expression de Runx2 ainsi que celle de la galectine-3 semble associée au caractère malin de ces cellules (Vladimirova et al., 2008).

Enfin, des résultats préliminaires montrent que l'impact fonctionnel des exosomes sur les BM-MSC semble différent selon l'état d'activation des cellules productrices d'exosomes. Les exosomes issus de cellules U87-MG favorisent la survie et la prolifération des CSM alors qu'ils n'influencent pas la migration. A l'inverse, la perte du caractère indifférencié des cellules U87-MG ou l'induction d'un stress cellulaire; la radiothérapie conduit les cellules à produire des exosomes ayant un fort pouvoir chimio attractant sur les CSM. Les différences observées en terme de survie, prolifération et migration des CSM pourraient s'expliquer par une modification du contenu des exosomes suite à l'inactivation de *CHI3L1* et à l'application de radiations ionisantes sur les cellules de GBM. En effet, nos travaux précédents confirment une modification du contenu des exosomes, notamment en récepteurs aux neurotrophines, après perte du caractère indifférencié suite à l'inactivation de *CHI3L1* (article 1). D'autre part, après stress cellulaire hypoxique, les cellules de GBM sécrètent des exosomes qui reflètent et véhiculent ce statut hypoxique et qui ont un impact direct sur la vascularisation tumorale (Vladimirova et al., 2008). Les exosomes issus des cellules de GBM semblent engagés les CSM dans un processus de différenciation. Cela renforce les données de la littérature où de nombreux travaux démontrent l'importance du recrutement de CSM au niveau du site tumoral afin de les contrôler. Ceci permettrait alors aux CSM de sécréter des exosomes et des facteurs de croissance nécessaires pour l'invasion et l'angiogenèse tumorale. Il serait alors pertinent de déterminer et d'analyser la fonction des facteurs produits, par les CSM préalablement traitées par les exosomes, sur les cellules de glioblastome. Dans ce but, la sécrétion du NGF et du BDNF sera alors dans un premier temps recherché. Pour la suite de ce travail, d'autres lignées de GBM sont utilisées telle que la lignée LN-18 et les lignées MO59K et M059J respectivement radorésistantes et radiosensibles. Deux autres lignées de CSM sont également utilisées, la lignée AT-MSC (cellules souches mésenchymateuses issus de tissu adipeux humain) et la

lignée TL-MSC (cellules souches mésenchymateuses issus de sac alvéolaire humain).

Conclusion

Le glioblastome représente l'une des tumeurs les plus agressives. La très grande hétérogénéité cellulaire de cette tumeur ainsi que l'existence de mécanismes de résistance et d'échappement thérapeutique rendent le pronostic de ce type de tumeur cérébral très sombre. Ces phénomènes de résistance sont majoritairement dus à l'émergence de clones résistants principalement constitués de cellules souches cancéreuses (CSC). Cependant la survie et le maintien des propriétés souches de ces cellules nécessitent également un microenvironnement adapté. Le contrôle de cette niche spécifique pourrait dépendre des CSCs elles-mêmes et de vésicules extracellulaires, tels que les exosomes, permettant aux CSCs d'exercer un contrôle et de propager le phénotype tumoral agressif à l'ensemble des cellules présentes dans le stroma tumoral. Les cellules endothéliales responsables de l'angiogenèse tumorale sont les principales cellules ciblées par les exosomes. Récemment, le marqueur YKL-40 a été identifié comme étant impliqué dans les mécanismes d'angiogenèse et d'invasion ainsi que dans le maintien des propriétés souches des CSCs.

L'inactivation du gène *CHI3L1* codant pour YKL-40 s'accompagne d'une perte du caractère indifférencié des cellules tumorales et d'une diminution significative des principaux marqueurs de CSC. Ces changements d'état de différenciation de la population cellulaire ont permis l'obtention d'une lignée cellulaire de GBM dont la population tumorale présentait un phénotype plus différencié et peu agressif. Ce modèle cellulaire expérimental a permis d'étudier l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs en fonction du statut de différenciation des cellules.

Dans le système nerveux central, les neurotrophines ainsi que leurs récepteurs sont connues, en condition physiologique, pour réguler les mécanismes de plasticité synaptique, de survie et de différenciation cellulaire. Cependant leur expression est dérégulée dans de nombreux cancers et notamment le glioblastome. Dans notre étude, la modulation de l'expression de YKL-40 induit des variations d'expression de certaines neurotrophines et récepteurs aux neurotrophines. L'expression des récepteurs TrkB, p75^{NTR} et du co-récepteur, la sortiline est significativement réduite dans les cellules présentant un caractère plus différencié. Ces changements vont

également avoir un impact au niveau du microenvironnement de ces cellules puisque le contenu des exosomes qu'elles sécrètent se trouve lui aussi modifié. La perte de sécrétion d'une sous-population d'exosomes contenant spécifiquement ces 3 récepteurs, dans les cellules inactivées pour *CHI3L1* dépourvues du caractère souche, suggère l'existence de fractions d'exosomes spécifiques des CSC dans le GBM.

Ces travaux mettent en évidence également l'importance du transfert protéique et notamment la diffusion du récepteur TrkB, aux cellules cibles. Ce mécanisme semble déterminant pour la croissance tumorale puisqu'il favorise la prolifération cellulaire et de migration des cellules endothéliales. *In vivo*, lorsque les exosomes proviennent de cellules ayant acquis un phénotype peu agressif, ils exercent un contrôle sur la masse tumorale et répriment le potentiel tumorigénique des cellules. Ces changements pourraient survenir en raison de l'absence des récepteurs TrkB, p75^{NTR} et sortiline dans les exosomes mais aussi par la présence et l'action de miR spécifiques. Ces observations à partir d'un modèle *in vivo* suggèrent que les exosomes pourraient être utilisés à des fins thérapeutiques en modifiant le contenu de ces derniers afin de cibler efficacement la tumeur. L'expression de marqueurs tels que TrkB, p75^{NTR} et sortiline dans les exosomes de patients présentant un GBM pourrait représenter un excellent biomarqueur d'agressivité et la sélection d'exosomes dépourvu de ces marqueurs pourrait permettre de réprimer le phénotype tumoral agressif. L'adjonction de molécules thérapeutiques au contenu des exosomes pourrait permettre de les protéger afin d'augmenter leur demi-vie et de limiter leur dégradation, mais aussi de faciliter leur biodistribution et leur ciblage cellulaire.

Etant donné que les exosomes circulent dans des fluides biologiques, ils peuvent être internalisés par des cellules autres que la cellule productrice. Les exosomes issus du plasma de patients atteints de GBM expriment spécifiquement le récepteur TrkB alors qu'il est absent chez les patients sains. Il est nécessaire d'étudier dans une population plus large de patients atteints de GBM mais aussi dans différents types de cancers, les exosomes et leur contenu protéique en particulier l'expression des récepteurs des neurotrophines afin de déterminer l'intérêt diagnostique de ces marqueurs circulants. Ce diagnostic non invasif basé sur un prélèvement sanguin s'inscrit dans le cadre des biopsies liquides au même titre que la détection de CTC

ou encore ADN tumoral circulant. L'utilisation des exosomes permet cependant d'envisager la détection combinée de marqueurs protéiques et génétiques.

La radiothérapie est l'un des traitements standard du GBM. Cependant, l'augmentation de la radiorésistance réduit l'efficacité du traitement. L'identification et la neutralisation des cibles moléculaires impliquées dans les mécanismes de radiorésistance des glioblastomes, vise à diminuer le risque de récurrence à l'intérieur du volume irradié et donc à allonger la survie des patients. L'apparition de clones radio-résistants dérivant de CSC constitue l'une des hypothèses majeures pour expliquer l'apparition de ces mécanismes. Dans une première partie, nos travaux mettent en évidence le transfert du phénotype agressif via la diffusion de récepteurs aux neurotrophines au sein des exosomes.

Des résultats préliminaires ont montré que les exosomes de GBM interviennent dans les mécanismes de radiorésistance. Le transfert des récepteurs aux neurotrophines pourrait participer activement à ces mécanismes. En effet, les exosomes de GBM favoriseraient l'augmentation de la prolifération après radiothérapie, et pourraient diminuer les effets de l'irradiation en augmentant les mécanismes de radiorésistance. L'inactivation de *Rab27a* conduit à la perte d'expression des protéines EGFR, TrkB, sortiline et CD9 dans les exosomes. Cependant la présence du récepteur p75^{NTR}, suggère que la protéine Rab27a ne serait pas impliquée dans la sécrétion exosomale de ce récepteur.

La fonction des cellules souches mésenchymateuses reste encore très controversée dans les tumeurs. En effet, leur caractère pro-tumoral ou anti-tumoral n'est pas encore clairement établi. La communication entre les cellules cancéreuses et les CSM semble dépendante des exosomes. Le contenu des exosomes pourrait être influencé par l'état de différenciation des cellules sécrétrices et par les stress environnementaux appliqués à ces dernières (radiothérapie) et modifierait ainsi l'impact des exosomes sur les cellules réceptrices. Nos résultats démontrent en effet, que les exosomes tumoraux modulent la prolifération ainsi que la migration cellulaire des CSM et permettent à ces dernières de s'engager dans une voie de différenciation pouvant, à terme, exercer une action pro-tumorale. Des thérapies anti-cancéreuses visant à contrôler les CSM, via l'administration d'exosomes modifiés, pourraient être envisagées.

En conclusion, les exosomes connus pour jouer un rôle prépondérant dans le processus de tumorigenèse recèlent de nombreuses autres facettes. Ils sont à la fois des témoins du fonctionnement biologique intrinsèque de la cellule et des messagers porteurs de signaux biologiquement actifs destinés à l'environnement (cellules tumorales et stromales) De plus, ils ont la capacité d'être de bons marqueurs diagnostiques. La composition du cargo exosomal, faite de différents acteurs majeurs de l'oncogenèse, tels que les récepteurs au neurotrophines peut servir d'outil diagnostique, pronostique et prédictif de la réponse thérapeutique et devrait être un atout majeur pour les futurs cliniciens dans l'établissement des meilleures stratégies thérapeutiques.

Références bibliographiques

- Acker, T., and Plate, K.H. (2004). Hypoxia and hypoxia inducible factors (HIF) as important regulators of tumor physiology. *Cancer Treat. Res.* 117, 219–248.
- Admyre, C., Johansson, S.M., Qazi, K.R., Filén, J.-J., Laesmaa, R., Norman, M., Neve, E.P.A., Scheynius, A., and Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 1969–1978.
- Ahmad, I., Yue, W.Y., Fernando, A., Clark, J.J., Woodson, E.A., and Hansen, M.R. (2014). p75NTR is highly expressed in vestibular schwannomas and promotes cell survival by activating nuclear transcription factor κ B. *Glia* 62, 1699–1712.
- Ahn, B.Y., Saldanha-Gama, R.F.G., Rahn, J.J., Hao, X., Zhang, J., Dang, N.-H., Alshehri, M., Robbins, S.M., and Senger, D.L. (2015). Glioma invasion mediated by the p75 neurotrophin receptor (p75(NTR)/CD271) requires regulated interaction with PDLIM1. *Oncogene*.
- Akers, J.C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B.S., and Chen, C.C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* 113, 1–11.
- 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.
- Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G., and von Deimling, A. (2015). Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 829–848.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3983–3988.
- Alison, M.R., Islam, S., and Wright, N.A. (2010). Stem cells in cancer: instigators and propagators? *J Cell Sci* 123, 2357–2368.
- Allen, N.J., and Barres, B.A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457, 675–677.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 619–624.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., and Rak, J. (2009). Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 2014–2018.
- Aloyz, R.S., Bamji, S.X., Pozniak, C.D., Toma, J.G., Atwal, J., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (1998). p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J. Cell Biol.* 143, 1691–1703.
- Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., et al. (2002). Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J. Exp. Med.* 195, 1303–1316.

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

Arevalo, J.C., Conde, B., Hempstead, B.L., Chao, M.V., Martin-Zanca, D., and Perez, P. (2000). TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5908–5916.

Arévalo, J.C., Yano, H., Teng, K.K., and Chao, M.V. (2004). A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *EMBO J.* 23, 2358–2368.

Arscott, W.T., Tandle, A.T., Zhao, S., Shabason, J.E., Gordon, I.K., Schlaff, C.D., Zhang, G., Tofilon, P.J., and Camphausen, K.A. (2013). Ionizing radiation and glioblastoma exosomes: implications in tumor biology and cell migration. *Transl. Oncol.* 6, 638–648.

Asano, K., Duntsch, C.D., Zhou, Q., Weimar, J.D., Bordelon, D., Robertson, J.H., and Pourmotabbed, T. (2004). Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion. *J. Neurooncol.* 70, 3–15.

Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J., and Emr, S.D. (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* 17, 2982–2993.

Babst, M., Katzmann, D.J., Snyder, W.B., Wendland, B., and Emr, S.D. (2002a). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev. Cell* 3, 283–289.

Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T., and Emr, S.D. (2002b). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev. Cell* 3, 271–282.

Bache, K.G., Brech, A., Mehlum, A., and Stenmark, H. (2003). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J. Cell Biol.* 162, 435–442.

Bailey, P., and Cushing, H. (1926). Bailey P, Cushing H (1926). A classification of the tumors of the glioma group on a histogenic basis with a correlated study of prognosis. J B Lippincott Co. Philadelphia.

Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, Y.-J., Pomeroy, S.L., Breakefield, X.O., and Skog, J. (2011). Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat. Commun.* 2, 180.

Balaña, C., Gil, M.J., Perez, P., Reynes, G., Gallego, O., Ribalta, T., Capellades, J., Gonzalez, S., and Verger, E. (2014). Sunitinib administered prior to radiotherapy in patients with non-resectable glioblastoma: results of a Phase II study. *Target. Oncol.* 9, 321–329.

Baldi, I., Huchet, A., Bauchet, L., and Loiseau, H. (2010). [Epidemiology of glioblastoma]. *Neurochirurgie.* 56, 433–440.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760.

Bard, M.P., Hegmans, J.P., Hemmes, A., Luider, T.M., Willemsen, R., Severijnen, L.-A.A., van Meerbeeck, J.P., Burgers, S.A., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2004).

Proteomic Analysis of Exosomes Isolated from Human Malignant Pleural Effusions. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31, 114–121.

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

Barker, P.A. (2004). p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* 42, 529–533.

Barker, F.G., Simmons, M.L., Chang, S.M., Prados, M.D., Larson, D.A., Sneed, P.K., Wara, W.M., Berger, M.S., Chen, P., Israel, M.A., et al. (2001). EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 51, 410–418.

Barker, P.A., Lomen-Hoerth, C., Gensch, E.M., Meakin, S.O., Glass, D.J., and Shooter, E.M. (1993). Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 15150–15157.

Barker, P.A., Barbee, G., Misko, T.P., and Shooter, E.M. (1994). The low affinity neurotrophin receptor, p75LNTR, is palmitoylated by thioester formation through cysteine 279. *J. Biol. Chem.* 269, 30645–30650.

Bauer, N., Wilsch-Bräuninger, M., Karbanová, J., Fonseca, A.-V., Strauss, D., Freund, D., Thiele, C., Huttner, W.B., Bornhäuser, M., and Corbeil, D. (2011). Haematopoietic stem cell differentiation promotes the release of prominin-1/CD133-containing membrane vesicles--a role of the endocytic-exocytic pathway. *EMBO Mol. Med.* 3, 398–409.

Berninger, B., García, D.E., Inagaki, N., Hahnel, C., and Lindholm, D. (1993). BDNF and NT-3 induce intracellular Ca²⁺ elevation in hippocampal neurones. *Neuroreport* 4, 1303–1306.

Bianco, P., Robey, P.G., and Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2, 313–319.

Bibel, M., Hoppe, E., and Barde, Y.A. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J.* 18, 616–622.

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.

Bilderback, T.R., Gazula, V.R., Lisanti, M.P., and Dobrowsky, R.T. (1999). Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 274, 257–263.

Bleau, G., Massicotte, F., Merlen, Y., and Boisvert, C. (1999). Mammalian chitinase-like proteins. *EXS* 87, 211–221.

Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2011). Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic Cph. Den.* 12, 1659–1668.

Bobrie, A., Krumeich, S., Rey, F., Recchi, C., Moita, L.F., Seabra, M.C., Ostrowski, M., and Théry, C. (2012a). Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res.* 72, 4920–4930.

Bobrie, A., Colombo, M., Krumeich, S., Raposo, G., and Théry, C. (2012b). Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J. Extracell. Vesicles* 1.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730–737.

Boregowda, R.K., Olabisi, O.O., Abushahba, W., Jeong, B.-S., Haenssen, K.K., Chen, W., Chekmareva, M., Lasfar, A., Foran, D.J., Goydos, J.S., et al. (2014). RUNX2 is overexpressed in melanoma cells and mediates their migration and invasion. *Cancer Lett.* 348, 61–70.

Bourkoula, E., Mangoni, D., Ius, T., Pucer, A., Isola, M., Musiello, D., Marzinotto, S., Toffoletto, B., Sorrentino, M., Palma, A., et al. (2014). Glioma-associated stem cells: a novel class of tumor-supporting cells able to predict prognosis of human low-grade gliomas. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 1239–1253.

Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J., and Pouysségur, J. (2007). Hypoxia and cancer. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 85, 1301–1307.

Brandes, A.A., Tosoni, A., Franceschi, E., Reni, M., Gatta, G., and Vecht, C. (2008). Glioblastoma in adults. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 67, 139–152.

Brennan, C., Momota, H., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Tandon, A., Pedraza, A., and Holland, E. (2009). Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One* 4, e7752.

Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Nounshmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., et al. (2013a). The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* 155, 462–477.

Brodeur, G.M., Nakagawara, A., Yamashiro, D.J., Ikegaki, N., Liu, X.G., Azar, C.G., Lee, C.P., and Evans, A.E. (1997). Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas. *J. Neurooncol.* 31, 49–55.

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

Bronfman, F.C. (2007). Metalloproteases and gamma-secretase: new membrane partners regulating p75 neurotrophin receptor signaling? *J. Neurochem.* 103 Suppl 1, 91–100.

Bronfman, F.C., and Fainzilber, M. (2004). Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out? *EMBO Rep.* 5, 867–871.

Bronisz, A., Wang, Y., Nowicki, M.O., Peruzzi, P., Ansari, K.I., Ogawa, D., Balaj, L., De Rienzo, G., Mineo, M., Nakano, I., et al. (2014). Extracellular vesicles modulate the glioblastoma microenvironment via a tumor suppression signaling network directed by miR-1. *Cancer Res.* 74, 738–750.

Buschow, S.I., Nolte-'t Hoen, E.N.M., van Niel, G., Pols, M.S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C.J.M., Raposo, G., Wubbolts, R., et al. (2009). MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic Cph. Den.* 10, 1528–1542.

Bussink, A.P., Speijer, D., Aerts, J.M.F.G., and Boot, R.G. (2007). Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics* 177, 959–970.

Caby, M.-P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., and Bonnerot, C. (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int. Immunol.* 17, 879–887.

Campos, B., Zeng, L., Daotrong, P.H., Eckstein, V., Unterberg, A., Mairbäurl, H., and Herold-Mende, C. (2011). Expression and regulation of AC133 and CD133 in glioblastoma. *Glia* 59, 1974–1986.

Cancer Genome Atlas Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061–1068.

Capocaccia, R., Gatta, G., Roazzi, P., Carrani, E., Santaquilani, M., De Angelis, R., Tavilla, A., and EUROCARE Working Group (2003). The EUROCARE-3 database: methodology of data collection, standardisation, quality control and statistical analysis. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 14 Suppl 5, v14-27.

Carter, B.D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhäuser, N., Böhm-Matthaei, R., Baeuerle, P.A., and Barde, Y.A. (1996). Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 272, 542–545.

Casaccia-Bonnet, P., Carter, B.D., Dobrowsky, R.T., and Chao, M.V. (1996). Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 383, 716–719.

CBTRUS (2005). CBTRUS. Central Brain Tumor Registry of the United States. Primary Brain Tumors in the United States: Statistical report, 1998-2002 (2005- 2006). www.cbtrus.org.

Chamberlain, M.C. (2015). Glioblastoma in the elderly. *Cancer Treat. Res.* 163, 159–170.

Chang, Y.S., Ahn, S.Y., Jeon, H.B., Sung, D.K., Kim, E.S., Sung, S.I., Yoo, H.S., Choi, S.J., Oh, W.I., and Park, W.S. (2014). Critical role of vascular endothelial growth factor secreted by mesenchymal stem cells in hyperoxic lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 51, 391–399.

Chao, M.V., and Hempstead, B.L. (1995). p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci.* 18, 321–326.

Chapman, B.S. (1995). A region of the 75 kDa neurotrophin receptor homologous to the death domains of TNFR-I and Fas. *FEBS Lett.* 374, 216–220.

Chen, R., Nishimura, M.C., Bumbaca, S.M., Kharbanda, S., Forrest, W.F., Kasman, I.M., Greve, J.M., Soriano, R.H., Gilmour, L.L., Rivers, C.S., et al. (2010). A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* 17, 362–375.

Cheng, J.-X., Liu, B.-L., and Zhang, X. (2009). How powerful is CD133 as a cancer stem cell marker in brain tumors? *Cancer Treat. Rev.* 35, 403–408.

Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J.K., Fang, X., Sloan, A.E., Mao, Y., Lathia, J.D., et al. (2013). Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 153, 139–152.

Cheray, M., Petit, D., Forestier, L., Karayan-Tapon, L., Maftah, A., Jauberteau, M.-O., Battu, S., Gallet, F.P., and Lalloué, F. (2011). Glycosylation-related gene expression is linked to differentiation status in glioblastomas undifferentiated cells. *Cancer Lett.* 312, 24–32.

Chien, W.W., and Ffrench, M. (2006). [Regulation of p16INK4a, senescence and oncogenesis]. *Médecine Sci. MS* 22, 865–871.

Chowdhury, R., Webber, J.P., Gurney, M., Mason, M.D., Tabi, Z., and Clayton, A. (2014). Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts. *Oncotarget* 6, 715–731.

Chowdhury, R., Webber, J.P., Gurney, M., Mason, M.D., Tabi, Z., and Clayton, A. (2015). Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts. *Oncotarget* 6, 715.

Chupp, G.L., Lee, C.G., Jarjour, N., Shim, Y.M., Holm, C.T., He, S., Dziura, J.D., Reed, J., Coyle, A.J., Kiener, P., et al. (2007). A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N. Engl. J. Med.* 357, 2016–2027.

Cintin, C., Johansen, J.S., Christensen, I.J., Price, P.A., Sørensen, S., and Nielsen, H.J. (2002). High serum YKL-40 level after surgery for colorectal carcinoma is related to short survival. *Cancer* 95, 267–274.

Clayton, A., Turkes, A., Dewitt, S., Steadman, R., Mason, M.D., and Hallett, M.B. (2004). Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 977–979.

Cohen, M.H., Shen, Y.L., Keegan, P., and Pazdur, R. (2009). FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin®) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *The Oncologist* 14, 1131–1138.

Cohen, S., Levi-Montalcini, R., and Hamburger, V. (1954). A NERVE GROWTH-STIMULATING FACTOR ISOLATED FROM SARCOM AS 37 AND 180*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 40, 1014–1018.

Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289.

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.

Corbit, K.C., Foster, D.A., and Rosner, M.R. (1999). Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4209–4218.

Cordon-Cardo, C., Tapley, P., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., Lamballe, F., Kovary, K., Klein, R., Jones, K.R., and Reichardt, L.F. (1991). The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 173–183.

Crocetti, E., Trama, A., Stiller, C., Caldarella, A., Soffietti, R., Jaal, J., Weber, D.C., Ricardi, U., Slowinski, J., Brandes, A., et al. (2012). Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 48, 1532–1542.

Curtis, R., Adryan, K.M., Stark, J.L., Park, J.S., Compton, D.L., Weskamp, G., Huber, L.J., Chao, M.V., Jaenisch, R., and Lee, K.F. (1995). Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins. *Neuron* 14, 1201–1211.

Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., et al. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462, 739–744.

Daumas-Duport, C., Varlet, P., Tucker, M.L., Beuvon, F., Cervera, P., and Chodkiewicz, J.P. (1997a). Oligodendrogliomas. Part I: Patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations: a study of 153 cases. *J. Neurooncol.* 34, 37–59.

Daumas-Duport, C., Tucker, M.L., Kolles, H., Cervera, P., Beuvon, F., Varlet, P., Udo, N., Koziak, M., and Chodkiewicz, J.P. (1997b). Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria. *J. Neurooncol.* 34, 61–78.

Daumas-Duport, C., Beuvon, F., Varlet, P., and Fallet-Bianco, C. (2000). [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. *Ann. Pathol.* 20, 413–428.

Daumas-Duport, C., Koziak, M., Miquel, C., Nataf, F., Jouvet, A., and Varlet, P. (2005). [Reappraisal of the Sainte-Anne Hospital classification of oligodendrogliomas in view of retrospective studies]. *Neurochirurgie.* 51, 247–253.

de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., and Vidal, M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102, 4336–4344.

de Groot, J.F., Lamborn, K.R., Chang, S.M., Gilbert, M.R., Cloughesy, T.F., Aldape, K., Yao, J., Jackson, E.F., Lieberman, F., Robins, H.I., et al. (2011). Phase II Study of Aflibercept in Recurrent Malignant Glioma: A North American Brain Tumor Consortium Study. *J. Clin. Oncol.* 29, 2689–2695.

DeAngelis, L.M. (2001). Brain tumors. *N. Engl. J. Med.* 344, 114–123.

de Vrij, J., Maas, S.L.N., Kwappenberg, K.M.C., Schnoor, R., Kleijn, A., Dekker, L., Luider, T.M., de Witte, L.D., Litjens, M., van Strien, M.E., et al. (2015). Glioblastoma-derived extracellular vesicles modify the phenotype of monocytic cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 137, 1630–1642.

Dechant, G., and Barde, Y.A. (1997). Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 413–418.

Del Fattore, A., Luciano, R., Saracino, R., Battafarano, G., Rizzo, C., Pascucci, L., Alessandri, G., Pessina, A., Perrotta, A., Fierabracci, A., et al. (2015). Differential effects of extracellular vesicles secreted by mesenchymal stem cells from different sources on glioblastoma cells. *Expert Opin. Biol. Ther.* 15, 495–504.

Delaguillaumie, A., Harriague, J., Kohanna, S., Bismuth, G., Rubinstein, E., Seigneuret, M., and Conjeaud, H. (2004). Tetraspanin CD82 controls the association of cholesterol-dependent microdomains with the actin cytoskeleton in T lymphocytes: relevance to co-stimulation. *J. Cell Sci.* 117, 5269–5282.

DiCicco-Bloom, E., Friedman, W.J., and Black, I.B. (1993). NT-3 stimulates sympathetic neuroblast proliferation by promoting precursor survival. *Neuron* 11, 1101–1111.

Dirks, P.B., and Rutka, J.T. (1997). Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle--a review. *Neurosurgery* 40, 1000-1013-1015.

Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., and Greenberg, M.E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661–665.

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.

ENCR (1998). ENCR, European Network of Cancer Registries. Recommendations for coding Tumours of the Brain and Central Nervous System, 1998.

ENCR (2001). ENCR, European Network of Cancer Registries. Eurocim version 4.0. European incidence database V2.2 (1999). Lyon. 2001.

Engelbraaten, O., Bjerkvig, R., Pedersen, P.H., and Laerum, O.D. (1993). Effects of EGF, bFGF, NGF and PDGF(bb) on cell proliferative, migratory and invasive capacities of human brain-tumour biopsies in vitro. *Int. J. Cancer* 53, 209–214.

Eramo, A., Ricci-Vitiani, L., Zeuner, A., Pallini, R., Lotti, F., Sette, G., Piloizzi, E., Larocca, L.M., Peschle, C., and De Maria, R. (2006). Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ.* 13, 1238–1241.

Ernfors, P., Lee, K.F., and Jaenisch, R. (1994). Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368, 147–150.

Esposito, D., Patel, P., Stephens, R.M., Perez, P., Chao, M.V., Kaplan, D.R., and Hempstead, B.L. (2001). The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 276, 32687–32695.

Faibish, M., Francescone, R., Bentley, B., Yan, W., and Shao, R. (2011). A YKL-40-neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers. *Mol. Cancer Ther.* 10, 742–751.

Falguières, T., Luyet, P.-P., Bissig, C., Scott, C.C., Velluz, M.-C., and Gruenberg, J. (2008). In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101. *Mol. Biol. Cell* 19, 4942–4955.

Fang, Y., Wu, N., Gan, X., Yan, W., Morrell, J.C., and Gould, S.J. (2007). Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *PLoS Biol.* 5, e158.

Fatima, F., and Nawaz, M. (2015). Stem cell-derived exosomes: roles in stromal remodeling, tumor progression, and cancer immunotherapy. *Chin. J. Cancer* 34, 541–553.

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.

Feng, D., Zhao, W.-L., Ye, Y.-Y., Bai, X.-C., Liu, R.-Q., Chang, L.-F., Zhou, Q., and Sui, S.-F. (2010). Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic Cph. Den.* 11, 675–687.

Figarella-Branger, D., Colin, C., Tchoghandjian, A., Baeza, N., and Bouvier, C. (2010). [Glioblastomas: gliomagenesis, genetics, angiogenesis, and microenvironment]. *Neurochirurgie.* 56, 441–448.

Figarella-Branger, D., Labrousse, F., Mohktari, K., Société française de neuropathologie, and Réseau de neuro-oncologie pathologique (2012). [Guidelines for adult diffuse gliomas

WHO grade II, III and IV: pathology and biology. Société française de neuropathologie . Réseau de neuro-oncologie pathologique]. *Ann. Pathol.* 32, 318–327.

Fike, J.R., Rosi, S., and Limoli, C.L. (2009). Neural precursor cells and central nervous system radiation sensitivity. *Semin. Radiat. Oncol.* 19, 122–132.

Fisher, J.L., Schwartzbaum, J.A., Wrensch, M., and Wiemels, J.L. (2007). Epidemiology of brain tumors. *Neurol. Clin.* 25, 867–890, vii.

Folkman, J. (1975). Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Ann. Intern. Med.* 82, 96–100.

Fontaine, D., Vandenbos, F., Lebrun, C., Paquis, V., and Frenay, M. (2008). [Diagnostic and prognostic values of 1p and 19q deletions in adult gliomas: critical review of the literature and implications in daily clinical practice]. *Rev. Neurol. (Paris)* 164, 595–604.

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.

Francescone, R., Ngernyung, N., Yan, W., Bentley, B., and Shao, R. (2014). Tumor-derived mural-like cells coordinate with endothelial cells: role of YKL-40 in mural cell-mediated angiogenesis. *Oncogene* 33, 2110–2122.

Francescone, R.A., Scully, S., Faibish, M., Taylor, S.L., Oh, D., Moral, L., Yan, W., Bentley, B., and Shao, R. (2011a). Role of YKL-40 in the angiogenesis, radioresistance, and progression of glioblastoma. *J. Biol. Chem.* 286, 15332–15343.

Fryer, R.H., Kaplan, D.R., and Kromer, L.F. (1997). Truncated trkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.* 148, 616–627.

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.

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

Gao, Y., Gu, C., Li, S., Tokuyama, T., Yokota, N., Nakayama, K.I., Kitagawa, M., and Namba, H. (2010a). p27 modulates tropism of mesenchymal stem cells toward brain tumors. *Exp. Ther. Med.* 1, 695–699.

Gao, Y., Yao, A., Zhang, W., Lu, S., Yu, Y., Deng, L., Yin, A., Xia, Y., Sun, B., and Wang, X. (2010b). Human mesenchymal stem cells overexpressing pigment epithelium-derived factor inhibit hepatocellular carcinoma in nude mice. *Oncogene* 29, 2784–2794.

Gastpar, R., Gehrmann, M., Bausero, M.A., Asea, A., Gross, C., Schroeder, J.A., and Multhoff, G. (2005). Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res.* 65, 5238–5247.

Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M.E., and Westphal, M. (2003). Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 21, 1624–1636.

Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., and Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 45.

Giraud, S., Lautrette, C., Bessette, B., Decourt, C., Mathonnet, M., and Jauberteau, M.-O. (2005). Modulation of Fas-induced apoptosis by p75 neurotrophin receptor in a human neuroblastoma cell line. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 10, 1271–1283.

Giraud, S., Loum, E., Bessette, B., Mathonnet, M., and Lalloué, F. (2011). P75 neurotrophin receptor is sequestered in the Golgi apparatus of the U-87 MG human glioblastoma cell line. *Int. J. Oncol.* 38, 391–399.

Grange, C., Tapparo, M., Collino, F., Vitillo, L., Damasco, C., Deregibus, M.C., Tetta, C., Bussolati, B., and Camussi, G. (2011). Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res.* 71, 5346–5356.

Greening, D.W., Gopal, S.K., Xu, R., Simpson, R.J., and Chen, W. (2015). Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 40, 72–81.

Gronlund, B., Høgdall, E.V.S., Christensen, I.J., Johansen, J.S., Nørgaard-Pedersen, B., Engelholm, S.A., and Høgdall, C. (2006). Pre-treatment prediction of chemoresistance in second-line chemotherapy of ovarian carcinoma: value of serological tumor marker determination (tetranectin, YKL-40, CASA, CA 125). *Int. J. Biol. Markers* 21, 141–148.

Grossman, S.A., and Batara, J.F. (2004). Current management of glioblastoma multiforme. *Semin. Oncol.* 31, 635–644.

Grotzer, M.A., Janss, A.J., Fung, K., Biegel, J.A., Sutton, L.N., Rorke, L.B., Zhao, H., Cnaan, A., Phillips, P.C., Lee, V.M., et al. (2000). TrkC expression predicts good clinical outcome in primitive neuroectodermal brain tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 18, 1027–1035.

Gu, C., Casaccia-Bonnel, P., Srinivasan, A., and Chao, M.V. (1999). Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 3043–3049.

Haga, H., Yan, I.K., Takahashi, K., Wood, J., Zubair, A., and Patel, T. (2015). Tumour cell-derived extracellular vesicles interact with mesenchymal stem cells to modulate the microenvironment and enhance cholangiocarcinoma growth. *J. Extracell. Vesicles* 4.

Hainsworth, J.D., Ervin, T., Friedman, E., Priego, V., Murphy, P.B., Clark, B.L., and Lamar, R.E. (2010). Concurrent radiotherapy and temozolomide followed by temozolomide and sorafenib in the first-line treatment of patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 116, 3663–3669.

Hakala, B.E., White, C., and Recklies, A.D. (1993). Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J. Biol. Chem.* 268, 25803–25810.

Hallböök, F. (1999). Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 616–621.

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., Westphal, M., Szönyi, E., Escandón, E., and Nikolics, K. (1993). Neurotrophin gene expression by cell lines derived from human gliomas. *J. Neurosci. Res.* **34**, 147–157.

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

Hannafon, B.N., and Ding, W.-Q. (2015). Cancer stem cells and exosome signaling. *Stem Cell Investig.* **2**.

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.

Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* **97**, 329–339.

Harvey, S., Weisman, M., O'Dell, J., Scott, T., Krusemeier, M., Visor, J., and Swindlehurst, C. (1998). Chondrex: new marker of joint disease. *Clin. Chem.* **44**, 509–516.

Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., et al. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 997–1003.

Hemler, M.E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 397–422.

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.

Herrup, K., and Shooter, E.M. (1973). Properties of the beta nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 3884–3888.

Hoang-Xuan, K., Idbaih, A., Mokhtari, K., and Sanson, M. (2005). [Towards a molecular classification of gliomas]. *Bull. Cancer (Paris)* **92**, 310–316.

Høgdaal, E.V.S., Johansen, J.S., Kjaer, S.K., Price, P.A., Christensen, L., Blaakaer, J., Bock, J.E., Glud, E., and Høgdaal, C.K. (2003). High plasma YKL-40 level in patients with ovarian cancer stage III is related to shorter survival. *Oncol. Rep.* **10**, 1535–1538.

Holgado-Madruga, M., Moscatello, D.K., Emlet, D.R., Dieterich, R., and Wong, A.J. (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 12419–12424.

Hong, B.S., Cho, J.-H., Kim, H., Choi, E.-J., Rho, S., Kim, J., Kim, J.H., Choi, D.-S., Kim, Y.-K., Hwang, D., et al. (2009). Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics* **10**, 556.

Hong, I.-S., Lee, H.-Y., and Kang, K.-S. (2014). Mesenchymal stem cells and cancer: friends or enemies? *Mutat. Res.* **768**, 98–106.

Hormigo, A., Gu, B., Karimi, S., Riedel, E., Panageas, K.S., Edgar, M.A., Tanwar, M.K., Rao, J.S., Fleisher, M., DeAngelis, L.M., et al. (2006). YKL-40 and matrix metalloproteinase-9 as potential serum biomarkers for patients with high-grade gliomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 5698–5704.

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

Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S.-I., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M.A., Bakhti, M., Grønborg, M., Möbius, W., Rhee, J., et al. (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J. Cell Biol.* 189, 223–232.

Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 609–642.

Huang, H.S., Nagane, M., Klingbeil, C.K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X.D., Huang, C.M., Gill, G.N., Wiley, H.S., and Cavenee, W.K. (1997). The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 2927–2935.

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

Huber, V., Fais, S., Iero, M., Lugini, L., Canese, P., Squarcina, P., Zaccheddu, A., Colone, M., Arancia, G., Gentile, M., et al. (2005). Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 128, 1796–1804.

Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D., and Steindler, D.A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39, 193–206.

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.

Iwamoto, F.M., Hottinger, A.F., Karimi, S., Riedel, E., Dantis, J., Jahdi, M., Panageas, K.S., Lassman, A.B., Abrey, L.E., Fleisher, M., et al. (2011). Serum YKL-40 is a marker of prognosis and disease status in high-grade gliomas. *Neuro-Oncol.* 13, 1244–1251.

Iyer, R., Varela, C.R., Minturn, J.E., Ho, R., Simpson, A.M., Light, J.E., Evans, A.E., Zhao, H., Thress, K., Brown, J.L., et al. (2012). AZ64 inhibits TrkB and enhances the efficacy of chemotherapy and local radiation in neuroblastoma xenografts. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 70, 477–486.

Jansen, P., Giehl, K., Nyengaard, J.R., Teng, K., Lioubinski, O., Sjoegaard, S.S., Breiderhoff, T., Gotthardt, M., Lin, F., Eilers, A., et al. (2007). Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat. Neurosci.* 10, 1449–1457.

Jefri, M., Huang, Y.-N., Huang, W.-C., Tai, C.-S., and Chen, W.-L. (2015). YKL-40 regulated epithelial-mesenchymal transition and migration/invasion enhancement in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 15, 590.

Jella, K.K., Rani, S., O'Driscoll, L., McClean, B., Byrne, H.J., and Lyng, F.M. (2014). Exosomes are involved in mediating radiation induced bystander signaling in human keratinocyte cells. *Radiat. Res.* 181, 138–145.

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, B.V., Johansen, J.S., and Price, P.A. (2003). High levels of serum HER-2/neu and YKL-40 independently reflect aggressiveness of metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 9, 4423–4434.

Jiao, Y., Killela, P.J., Reitman, Z.J., Rasheed, A.B., Heaphy, C.M., de Wilde, R.F., Rodriguez, F.J., Rosenberg, S., Oba-Shinjo, S.M., Nagahashi Marie, S.K., et al. (2012). Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* 3, 709–722.

Jiménez, A.J., Domínguez-Pinos, M.-D., Guerra, M.M., Fernández-Llebrez, P., and Pérez-Fígares, J.-M. (2014). Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers* 2, e28426.

Johansen, J.S. (2006). Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. *Dan. Med. Bull.* 53, 172–209.

Johansen, J.S., Williamson, M.K., Rice, J.S., and Price, P.A. (1992). Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 7, 501–512.

Johansen, J.S., Baslund, B., Garbarsch, C., Hansen, M., Stoltenberg, M., Lorenzen, I., and Price, P.A. (1999). YKL-40 in giant cells and macrophages from patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* 42, 2624–2630.

Johansen, J.S., Drivsholm, L., Price, P.A., and Christensen, I.J. (2004). High serum YKL-40 level in patients with small cell lung cancer is related to early death. *Lung Cancer Amst. Neth.* 46, 333–340.

Johansen, J.S., Høyer, P.E., Larsen, L.A., Price, P.A., and Møllgård, K. (2007). YKL-40 protein expression in the early developing human musculoskeletal system. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 55, 1213–1228.

Johnson, E.M., and Taniuchi, M. (1987). Nerve growth factor (NGF) receptors in the central nervous system. *Biochem. Pharmacol.* 36, 4189–4195.

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.

Johnstone, R.M. (2006). Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells. Mol. Dis.* 36, 315–321.

Junker, N., Johansen, J.S., Andersen, C.B., and Kristjansen, P.E.G. (2005). Expression of YKL-40 by peritumoral macrophages in human small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* 48, 223–231.

Kannan, K., Inagaki, A., Silber, J., Gorovets, D., Zhang, J., Kastenhuber, E.R., Heguy, A., Petrini, J.H., Chan, T.A., and Huse, J.T. (2012). Whole exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma. *Oncotarget* 3, 1194–1203.

Kao, S., Jaiswal, R.K., Kolch, W., and Landreth, G.E. (2001). Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 276, 18169–18177.

Kaplan, D.R., and Stephens, R.M. (1994). Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J. Neurobiol.* 25, 1404–1417.

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.

Kapsogeorgou, E.K., Abu-Helu, R.F., Moutsopoulos, H.M., and Manoussakis, M.N. (2005). Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum.* 52, 1517–1521.

Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., and Weinberg, R.A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557–563.

Katzmann, D.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106, 145–155.

Katzmann, D.J., Stefan, C.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J. Cell Biol.* 162, 413–423.

Keller, S., Sanderson, M.P., Stoeck, A., and Altevogt, P. (2006). Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol. Lett.* 107, 102–108.

Kemper, K., Sprick, M.R., de Bree, M., Scopelliti, A., Vermeulen, L., Hoek, M., Zeilstra, J., Pals, S.T., Mehmet, H., Stassi, G., et al. (2010). The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res.* 70, 719–729.

Kernohan, J.W., and Mabon, R.F. (1949). A simplified classification of the gliomas. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* 24, 71–75.

Kesari, S., Schiff, D., Henson, J.W., Muzikansky, A., Gigas, D.C., Doherty, L., Batchelor, T.T., Longtine, J.A., Ligon, K.L., Weaver, S., et al. (2008). Phase II study of temozolomide, thalidomide, and celecoxib for newly diagnosed glioblastoma in adults. *Neuro-Oncol.* 10, 300–308.

Khan, Z., Khan, N., Tiwari, R.P., Patro, I.K., Prasad, G.B.K.S., and Bisen, P.S. (2010). Down-regulation of survivin by oxaliplatin diminishes radioresistance of head and neck squamous carcinoma cells. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 96, 267–273.

Killela, P.J., Reitman, Z.J., Jiao, Y., Bettegowda, C., Agrawal, N., Diaz, L.A., Friedman, A.H., Friedman, H., Gallia, G.L., Giovannella, B.C., et al. (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 6021–6026.

Kimura, S., Yoshino, A., Katayama, Y., Watanabe, T., and Fukushima, T. (2002). Growth control of C6 glioma in vivo by nerve growth factor. *J. Neurooncol.* 59, 199–205.

Kleihues, P., and Sobin, L.H. (2000). World Health Organization classification of tumors. *Cancer* 88, 2887.

Kleihues, P., Burger, P.C., and Scheithauer, B.W. (1993). The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 3, 255–268.

Kleihues, P., Louis, D.N., Scheithauer, B.W., Rorke, L.B., Reifenberger, G., Burger, P.C., and Cavenee, W.K. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 215–225–229.

Klein, R. (1994). Role of neurotrophins in mouse neuronal development. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 8, 738–744.

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

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

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

Klein, R., Smeyne, R.J., Wurst, W., Long, L.K., Auerbach, B.A., Joyner, A.L., and Barbacid, M. (1993). Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* 75, 113–122.

Knezevic, J., Pfefferle, A.D., Petrovic, I., Greene, S.B., Perou, C.M., and Rosen, J.M. (2015). Expression of miR-200c in claudin-low breast cancer alters stem cell functionality, enhances chemosensitivity and reduces metastatic potential. *Oncogene* 34, 5997–6006.

Knüsel, B., Rabin, S.J., Hefti, F., and Kaplan, D.R. (1994). Regulated neurotrophin receptor responsiveness during neuronal migration and early differentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 1542–1554.

Kokunai, T., Iguchi, H., and Tamaki, N. (1999). Differentiation and growth inhibition of glioma cells induced by transfer of trk A proto-oncogene. *J. Neurooncol.* 42, 23–34.

Kosztowski, T., Zaidi, H.A., and Quiñones-Hinojosa, A. (2009). Applications of neural and mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 9, 597–612.

Kowal, J., Tkach, M., and Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 29, 116–125.

Ku, B.M., Lee, Y.K., Ryu, J., Jeong, J.Y., Choi, J., Eun, K.M., Shin, H.Y., Kim, D.G., Hwang, E.M., Yoo, J.C., et al. (2011). CHI3L1 (YKL-40) is expressed in human gliomas and regulates the invasion, growth and survival of glioma cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 128, 1316–1326.

Kucharzewska, P., Christianson, H.C., Welch, J.E., Svensson, K.J., Fredlund, E., Ringnér, M., Mörgelin, M., Bourseau-Guilmain, E., Bengzon, J., and Belting, M. (2013). Exosomes

reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 7312–7317.

Kumar, D., Gupta, D., Shankar, S., Srivastava, R.K., Kumar, D., Gupta, D., Shankar, S., and Srivastava, R.K. (2014). Biomolecular characterization of exosomes released from cancer stem cells: Possible implications for biomarker and treatment of cancer. *Oncotarget* 6, 3280–3291.

Kunigelis, K.E., and Graner, M.W. (2015). The Dichotomy of Tumor Exosomes (TEX) in Cancer Immunity: Is It All in the ConTEXT? *Vaccines* 3, 1019–1051.

Labouyrie, E., Dubus, P., Groppi, A., Mahon, F.X., Ferrer, J., Parrens, M., Reiffers, J., de Mascarel, A., and Merlio, J.P. (1999). Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am. J. Pathol.* 154, 405–415.

Lakkaraju, A., and Rodriguez-Boulan, E. (2008). Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol.* 18, 199–209.

Lal, A., Lash, A.E., Altschul, S.F., Velculescu, V., Zhang, L., McLendon, R.E., Marra, M.A., Prange, C., Morin, P.J., Polyak, K., et al. (1999). A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res.* 59, 5403–5407.

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.

Lamparski, H.G., Metha-Damani, A., Yao, J.-Y., Patel, S., Hsu, D.-H., Ruegg, C., and Le Pecq, J.-B. (2002). Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J. Immunol. Methods* 270, 211–226.

Laperriere, N., Zuraw, L., Cairncross, G., and Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group (2002). Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 64, 259–273.

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

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

Lau, S.H., Sham, J.S.T., Xie, D., Tzang, C.-H., Tang, D., Ma, N., Hu, L., Wang, Y., Wen, J.-M., Xiao, G., et al. (2006). Clusterin plays an important role in hepatocellular carcinoma metastasis. *Oncogene* 25, 1242–1250.

Laulagnier, K., Vincent-Schneider, H., Hamdi, S., Subra, C., Lankar, D., and Record, M. (2005). Characterization of exosome subpopulations from RBL-2H3 cells using fluorescent lipids. *Blood Cells. Mol. Dis.* 35, 116–121.

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.

Lazennec, G., and Jorgensen, C. (2008). Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 1387–1394.

Lee, C.G., and Elias, J.A. (2010). Role of breast regression protein-39/YKL-40 in asthma and allergic responses. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2, 20–27.

Lee, F.S., and Chao, M.V. (2001). Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3555–3560.

Lee, J.-K., Park, S.-R., Jung, B.-K., Jeon, Y.-K., Lee, Y.-S., Kim, M.-K., Kim, Y.-G., Jang, J.-Y., and Kim, C.-W. (2013). Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells. *PloS One* 8, e84256.

Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945–1948.

Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A.J., Canuel, M., and Morales, C.R. (2003). The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J.* 22, 6430–6437.

Lehmann, B.D., Paine, M.S., Brooks, A.M., McCubrey, J.A., Renegar, R.H., Wang, R., and Terrian, D.M. (2008). Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 68, 7864–7871.

Lessmann, V., Gottmann, K., and Malsangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 69, 341–374.

Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237, 1154–1162.

Liu, C., Yu, S., Zinn, K., Wang, J., Zhang, L., Jia, Y., Kappes, J.C., Barnes, S., Kimberly, R.P., Grizzle, W.E., et al. (2006a). Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 1375–1385.

Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., and Yu, J.S. (2006b). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* 5, 67.

Liu, X., Ernfors, P., Wu, H., and Jaenisch, R. (1995). Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF. *Nature* 375, 238–241.

Liu, Y., Xiang, X., Zhuang, X., Zhang, S., Liu, C., Cheng, Z., Michalek, S., Grizzle, W., and Zhang, H.-G. (2010). Contribution of MyD88 to the tumor exosome-mediated induction of myeloid derived suppressor cells. *Am. J. Pathol.* 176, 2490–2499.

Liu, Z., Jiang, Z., Huang, J., Huang, S., Li, Y., Sheng, F., Yu, S., Yu, S., and Liu, X. (2014). Mesenchymal stem cells show little tropism for the resting and differentiated cancer stem cell-like glioma cells. *Int. J. Oncol.* 44, 1223–1232.

Loeb, D.M., Tsao, H., Cobb, M.H., and Greene, L.A. (1992). NGF and other growth factors induce an association between ERK1 and the NGF receptor, gp140prototrkr. *Neuron* 9, 1053–1065.

Loiseau, H., Huchet, A., Rué, M., Cowppli-Bony, A., and Baldi, I. (2009). [Epidemiology of primary brain tumor]. *Rev. Neurol. (Paris)* 165, 650–670.

Londoño-Vallejo, A., Lenain, C., and Gilson, E. (2008). [Targeting telomeres to enforce cancer cells to senesce]. *Médecine Sci. MS* 24, 383–389.

Lottaz, C., Beier, D., Meyer, K., Kumar, P., Hermann, A., Schwarz, J., Junker, M., Oefner, P.J., Bogdahn, U., Wischhusen, J., et al. (2010). Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer Res.* 70, 2030–2040.

Louis, D.N. (2006). Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu. Rev. Pathol.* 1, 97–117.

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

Louis, D.N., Perry, A., Burger, P., Ellison, D.W., Reifenberger, G., von Deimling, A., Aldape, K., Brat, D., Collins, V.P., Eberhart, C., et al. (2014). International Society Of Neuropathology–Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 24, 429–435.

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

Lu, B., Pang, P.T., and Woo, N.H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 603–614.

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.

Ma, C., Ding, Y.C., Yu, W., Wang, Q., Meng, B., and Huang, T. (2015). microRNA-200c overexpression plays an inhibitory role in human pancreatic cancer stem cells by regulating epithelial-mesenchymal transition. *Minerva Med.* 106, 193–202.

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.

Margolis, B., and Skolnik, E.Y. (1994). Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 5, 1288–1299.

Marigo, I., and Dazzi, F. (2011). The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. *Semin. Immunopathol.* 33, 593–602.

Martin-Zanca, D., Mitra, G., Long, L.K., and Barbacid, M. (1986). Molecular characterization of the human trk oncogene. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 2, 983–992.

Martin-Zanca, D., Oskam, R., Mitra, G., Copeland, T., and Barbacid, M. (1989). Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 9, 24–33.

Mazella, J., Zsürger, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita, N., Gully, D., Maffrand, J.P., et al. (1998). The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 26273–26276.

Michelsen, A.E., Rathcke, C.N., Skjelland, M., Holm, S., Ranheim, T., Krohg-Sørensen, K., Klingvall, M.F., Brosstad, F., Oie, E., Vestergaard, H., et al. (2010). Increased YKL-40 expression in patients with carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 211, 589–595.

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

Mincheva-Nilsson, L., and Baranov, V. (2010). The role of placental exosomes in reproduction. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 **63**, 520–533.

Mishra, P.J., Mishra, P.J., Humeniuk, R., Medina, D.J., Alexe, G., Mesirov, J.P., Ganesan, S., Glod, J.W., and Banerjee, D. (2008). Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* **68**, 4331–4339.

Möbius, W., van Donselaar, E., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Heijnen, H.F.G., Slot, J.W., and Geuze, H.J. (2003). Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic Cph. Den.* **4**, 222–231.

Modrek, A.S., Bayin, N.S., and Placantonakis, D.G. (2014). Brain stem cells as the cell of origin in glioma. *World J. Stem Cells* **6**, 43–52.

Mohanty, A.K., Singh, G., Paramasivam, M., Saravanan, K., Jabeen, T., Sharma, S., Yadav, S., Kaur, P., Kumar, P., Srinivasan, A., et al. (2003). Crystal structure of a novel regulatory 40-kDa mammary gland protein (MGP-40) secreted during involution. *J. Biol. Chem.* **278**, 14451–14460.

Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Stolz, D.B., Sullivan, M.L.G., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., et al. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* **119**, 756–766.

Montgomery, D.L. (1994). Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet. Pathol.* **31**, 145–167.

Moodie, S.A., Willumsen, B.M., Weber, M.J., and Wolfman, A. (1993). Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* **260**, 1658–1661.

Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L.G., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., et al. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* **104**, 3257–3266.

Morrison, B.W., and Leder, P. (1994). neu and ras initiate murine mammary tumors that share genetic markers generally absent in c-myc and int-2-initiated tumors. *Oncogene* **9**, 3417–3426.

Mukherjee, B., McEllin, B., Camacho, C.V., Tomimatsu, N., Sirasanagandala, S., Nannepaga, S., Hatanpaa, K.J., Mickey, B., Madden, C., Maher, E., et al. (2009). EGFRvIII and DNA Double-Strand Break Repair: A Molecular Mechanism for Radioresistance in Glioblastoma. *Cancer Res.* **69**, 4252–4259.

Muller, L., Mitsuhashi, M., Simms, P., Gooding, W.E., and Whiteside, T.L. (2016). Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets. *Sci. Rep.* **6**, 20254.

Munck Petersen, C., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Tauris, J., Jacobsen, L., Gliemann, J., Moestrup, S.K., and Madsen, P. (1999). Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J.* **18**, 595–604.

Munoz, J.L., Bliss, S.A., Greco, S.J., Ramkissoon, S.H., Ligon, K.L., and Rameshwar, P. (2013a). Delivery of Functional Anti-miR-9 by Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes to Glioblastoma Multiforme Cells Conferred Chemosensitivity. *Mol. Ther. Acids* 2, e126.

Myers, M.P., Pass, I., Batty, I.H., Van der Kaay, J., Stolarov, J.P., Hemmings, B.A., Wigler, M.H., Downes, C.P., and Tonks, N.K. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13513–13518.

Nagpal, S., Harsh, G., Recht, L., Nagpal, S., Harsh, G., and Recht, L. (2011). Bevacizumab Improves Quality of Life in Patients with Recurrent Glioblastoma, Bevacizumab Improves Quality of Life in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Chemother. Res. Pract. Chemother. Res. Pract.* 2011, 2011, e602812.

Nakada, M., Nakada, S., Demuth, T., Tran, N.L., Hoelzinger, D.B., and Berens, M.E. (2007). Molecular targets of glioma invasion. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 64, 458–478.

Nakagawara, A., Arima-Nakagawara, M., Scavarda, N.J., Azar, C.G., Cantor, A.B., and Brodeur, G.M. (1993). Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* 328, 847–854.

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.

Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J., Chen, J., Hentschel, S., Vecil, G., Dembinski, J., et al. (2005). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* 65, 3307–3318.

Nakamura, K., Ito, Y., Kawano, Y., Kurozumi, K., Kobune, M., Tsuda, H., Bizen, A., Honmou, O., Niitsu, Y., and Hamada, H. (2004). Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther.* 11, 1155–1164.

Nakamura, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2001). Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 81, 77–82.

Nakano, I., Garnier, D., Minata, M., and Rak, J. (2015). Extracellular vesicles in the biology of brain tumour stem cells--Implications for inter-cellular communication, therapy and biomarker development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 40, 17–26.

Niel, G. van, Porto-Carreiro, I., Simoes, S., and Raposo, G. (2006). Exosomes: A Common Pathway for a Specialized Function. *J. Biochem. (Tokyo)* 140, 13–21.

Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Olivecrona, G., Gliemann, J., and Petersen, C.M. (1999). Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* 274, 8832–8836.

Nielsen, M.S., Madsen, P., Christensen, E.I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R., and Petersen, C.M. (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* 20, 2180–2190.

Niemoeller, O.M., Niyazi, M., Corradini, S., Zehentmayr, F., Li, M., Lauber, K., and Belka, C. (2011). MicroRNA expression profiles in human cancer cells after ionizing radiation. *Radiat. Oncol.* 6, 1.

Nieuwland, R., van der Post, J.A.M., Lok, C.A.R., Gemma, C.A.R.L., Kenter, G., Kenter, G., and Sturk, A. (2010). Microparticles and exosomes in gynecologic neoplasias. *Semin. Thromb. Hemost.* 36, 925–929.

Nigro, J.M., Misra, A., Zhang, L., Smirnov, I., Colman, H., Griffin, C., Ozburn, N., Chen, M., Pan, E., Koul, D., et al. (2005). Integrated array-comparative genomic hybridization and expression array profiles identify clinically relevant molecular subtypes of glioblastoma. *Cancer Res.* 65, 1678–1686.

Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Diefes, K., Phillips, H.S., Pujara, K., Berman, B.P., Pan, F., Pelloso, C.E., Sulman, E.P., Bhat, K.P., et al. (2010). Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 17, 510–522.

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

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

Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemann, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., et al. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427, 843–848.

Nykjaer, A., Willnow, T.E., and Petersen, C.M. (2005). p75NTR – live or let die. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 49–57.

Obermeier, A., Halfter, H., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1993a). Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. *EMBO J.* 12, 933–941.

Obermeier, A., Lammers, R., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1993b). Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J. Biol. Chem.* 268, 22963–22966.

Oelmann, E., Sreter, L., Schuller, I., Serve, H., Koenigsmann, M., Wiedenmann, B., Oberberg, D., Reufi, B., Thiel, E., and Berdel, W.E. (1995). Nerve growth factor stimulates clonal growth of human lung cancer cell lines and a human glioblastoma cell line expressing high-affinity nerve growth factor binding sites involving tyrosine kinase signaling. *Cancer Res.* 55, 2212–2219.

Ogawa, Y., Kanai-Azuma, M., Akimoto, Y., Kawakami, H., and Yanoshita, R. (2008). Exosome-like vesicles with dipeptidyl peptidase IV in human saliva. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1059–1062.

Ohgaki, H. (2005). Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* 25, 1–7.

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 109, 93–108.

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol.* 170, 1445–1453.

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* 100, 2235–2241.

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

Ohshima, K., Inoue, K., Fujiwara, A., Hatakeyama, K., Kanto, K., Watanabe, Y., Muramatsu, K., Fukuda, Y., Ogura, S., Yamaguchi, K., et al. (2010). Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* 5, e13247.

Onishi, M., Ichikawa, T., Kurozumi, K., and Date, I. (2011). Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain Tumor Pathol.* 28, 13–24.

Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., et al. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* 12, 19–30–13.

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.

Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., and Johnstone, R.M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* 101, 942–948.

Pap, E., Pállinger, E., Pásztoi, M., and Falus, A. (2009). Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI* 58, 1–8.

Park, J.E., Tan, H.S., Datta, A., Lai, R.C., Zhang, H., Meng, W., Lim, S.K., and Sze, S.K. (2010). Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 9, 1085–1099.

Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Mito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., et al. (2009). Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 284, 34211–34222.

Patapoutian, A., and Reichardt, L.F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 272–280.

Peinado, H., Lavotshkin, S., and Lyden, D. (2011). The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin. Cancer Biol.* 21, 139–146.

Pelloski, C.E., Mahajan, A., Maor, M., Chang, E.L., Woo, S., Gilbert, M., Colman, H., Yang, H., Ledoux, A., Blair, H., et al. (2005). YKL-40 expression is associated with poorer response to radiation and shorter overall survival in glioblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 3326–3334.

Pendleton, C., Li, Q., Chesler, D.A., Yuan, K., Guerrero-Cazares, H., and Quinones-Hinojosa, A. (2013a). Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue vs Bone Marrow: In Vitro Comparison of Their Tropism towards Gliomas. *PLoS ONE* 8, e58198.

Petersen, C.M., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H.H., Roigaard, H., Gliemann, J., Madsen, P., and Moestrup, S.K. (1997). Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 272, 3599–3605.

Pflug, B.R., Colangelo, A.M., Tornatore, C., and Mocchetti, I. (2001). TrkA induces differentiation but not apoptosis in C6-2B glioma cells. *J. Neurosci. Res.* **64**, 636–645.

Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., et al. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **9**, 157–173.

Pigati, L., Yaddanapudi, S.C.S., Iyengar, R., Kim, D.-J., Hearn, S.A., Danforth, D., Hastings, M.L., and Duelli, D.M. (2010). Selective Release of MicroRNA Species from Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells. *PLoS ONE* **5**, e13515.

Pisitkun, T., Shen, R.-F., and Knepper, M.A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13368–13373.

Prados, M.D., Lamborn, K., Yung, W.K.A., Jaeckle, K., Robins, H.I., Mehta, M., Fine, H.A., Wen, P.Y., Cloughesy, T., Chang, S., et al. (2006). A phase 2 trial of irinotecan (CPT-11) in patients with recurrent malignant glioma: A North American Brain Tumor Consortium study. *Neuro-Oncol.* **8**, 189–193.

Principe, S., Hui, A.B.-Y., Bruce, J., Sinha, A., Liu, F.-F., and Kislinger, T. (2013). Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: implications for tumor biology and biomarker discovery. *Proteomics* **13**, 1608–1623.

Qi, Z., Xing, W., Shao, C., Yang, C., and Wang, Z. (2015). The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis. *Drug Des. Devel. Ther.* **3341**.

Qu, J.-L., Qu, X.-J., Zhao, M.-F., Teng, Y.-E., Zhang, Y., Hou, K.-Z., Jiang, Y.-H., Yang, X.-H., and Liu, Y.-P. (2009). Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* **41**, 875–880.

Rabinowits, G., Gerçel-Taylor, C., Day, J.M., Taylor, D.D., and Kloecker, G.H. (2009). Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin. Lung Cancer* **10**, 42–46.

Raiborg, C., Bache, K.G., Mehlum, A., Stang, E., and Stenmark, H. (2001). Hrs recruits clathrin to early endosomes. *EMBO J.* **20**, 5008–5021.

Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **200**, 373–383.

Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**, 1161–1172.

Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C., and Desaymard, C. (1997). Accumulation of Major Histocompatibility Complex Class II Molecules in Mast Cell Secretory Granules and Their Release upon Degranulation. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2631–2645.

Rathcke, C.N., Raymond, I., Kistorp, C., Hildebrandt, P., Faber, J., and Vestergaard, H. (2010). Low grade inflammation as measured by levels of YKL-40: association with an increased overall and cardiovascular mortality rate in an elderly population. *Int. J. Cardiol.* **143**, 35–42.

Reardon, D.A., Fink, K.L., Mikkelsen, T., Cloughesy, T.F., O'Neill, A., Plotkin, S., Glantz, M., Ravin, P., Raizer, J.J., Rich, K.M., et al. (2008). Randomized Phase II Study of Cilengitide, an Integrin-Targeting Arginine-Glycine-Aspartic Acid Peptide, in Recurrent Glioblastoma Multiforme. *J. Clin. Oncol.* 26, 5610–5617.

Reardon, D.A., Turner, S., Peters, K.B., Desjardins, A., Gururangan, S., Sampson, J.H., McLendon, R.E., Herndon, J.E., Jones, L.W., Kirkpatrick, J.P., et al. (2011a). A Review of VEGF/VEGFR-Targeted Therapeutics for Recurrent Glioblastoma. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 9, 414–427.

Reardon, D.A., Neyns, B., Weller, M., Tonn, J.C., Nabors, L.B., and Stupp, R. (2011b). Cilengitide: an RGD pentapeptide $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ integrin inhibitor in development for glioblastoma and other malignancies. *Future Oncol.* 7, 339–354.

Recklies, A.D., White, C., and Ling, H. (2002). The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem. J.* 365, 119–126.

Rehli, M., Krause, S.W., and Andreesen, R. (1997). Molecular characterization of the gene for human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation. *Genomics* 43, 221–225.

Rehli, M., Niller, H.-H., Ammon, C., Langmann, S., Schwarzfischer, L., Andreesen, R., and Krause, S.W. (2003). Transcriptional regulation of CHI3L1, a marker gene for late stages of macrophage differentiation. *J. Biol. Chem.* 278, 44058–44067.

Reichardt, L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361, 1545–1564.

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105–111.

Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., and Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 4565–4574.

Ricci, A., Felici, L., Mariotta, S., Mannino, F., Schmid, G., Terzano, C., Cardillo, G., Amenta, F., and Bronzetti, E. (2004). Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30, 12–19.

Rich, J.N. (2007). Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res.* 67, 8980–8984.

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.

Rodríguez-Tébar, A., Dechant, G., Götz, R., and Barde, Y.A. (1992). Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* 11, 917–922.

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.

Rossetto, M., Ciccarino, P., Boisselier, B., Labussiere, M., and Sanson, M. (2011). Metabolism of glioma and IDH1/IDH2 mutations. *Rev. Neurol. (Paris)* 167, 699–703.

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.

Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P.G., et al. (1992). Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 360, 689–692.

Rufer, N., and Nabholz, M. (2003). Télomérage, élixir de jeunesse des cellules humaines? *MS Médecine Sci.* 19, 345–350.

Rusten, T.E., Vaccari, T., and Stenmark, H. (2012). Shaping development with ESCRTs. *Nat. Cell Biol.* 14, 38–45.

Sahm, F., Reuss, D., Koelsche, C., Capper, D., Schittenhelm, J., Heim, S., Jones, D.T.W., Pfister, S.M., Herold-Mende, C., Wick, W., et al. (2014). Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 128, 551–559.

Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A.E., and Emr, S.D. (2009). Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* 136, 97–109.

Sarrazay, V., Vedrenne, N., Bordeau, N., Billet, F., Cardot, P., Desmoulière, A., and Battu, S. (2013). Fast astrocyte isolation by sedimentation field flow fractionation. *J. Chromatogr. A* 1289, 88–93.

Sasahira, T., Ueda, N., Yamamoto, K., Bhawal, U.K., Kurihara, M., Kirita, T., and Kuniyasu, H. (2013). Trks are novel oncogenes involved in the induction of neovascularization, tumor progression, and nodal metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Clin. Exp. Metastasis* 30, 165–176.

Savina, A., Vidal, M., and Colombo, M.I. (2002). The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J. Cell Sci.* 115, 2505–2515.

Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T., and Colombo, M.I. (2005). Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic Cph. Den.* 6, 131–143.

Schnell, L., Schneider, R., Kolbeck, R., Barde, Y.A., and Schwab, M.E. (1994). Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 367, 170–173.

Schultz, N.A., and Johansen, J.S. (2010). YKL-40-A Protein in the Field of Translational Medicine: A Role as a Biomarker in Cancer Patients? *Cancers* 2, 1453–1491.

SEER (2007). SEER, SEER*Stat Release 6.3.5. In, 2007.

Segura, E., Nicco, C., Lombard, B., Véron, P., Raposo, G., Batteux, F., Amigorena, S., and Théry, C. (2005). ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* 106, 216–223.

Segura, E., Guérin, C., Hogg, N., Amigorena, S., and Théry, C. (2007). CD8⁺ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 179, 1489–1496.

Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberte, J., Lazure, C., Chrétien, M., and Murphy, R.A. (1996a). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem. J.* 314 (Pt 3), 951–960.

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

Shackelton, L.M., Mann, D.M., and Millis, A.J. (1995). Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein (gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodeling. *J. Biol. Chem.* 270, 13076–13083.

Shao, R. (2013). YKL-40 acts as an angiogenic factor to promote tumor angiogenesis. *Front. Physiol.* 4.

Shao, R., Hamel, K., Petersen, L., Cao, Q.J., Arenas, R.B., Bigelow, C., Bentley, B., and Yan, W. (2009). YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. *Oncogene* 28, 4456–4468.

Shao, R., Cao, Q.J., Arenas, R.B., Bigelow, C., Bentley, B., and Yan, W. (2011). Breast cancer expression of YKL-40 correlates with tumour grade, poor differentiation, and other cancer markers. *Br. J. Cancer* 105, 1203–1209.

Shao, R., Francescone, R., Ngernyung, N., Bentley, B., Taylor, S.L., Moral, L., and Yan, W. (2014). Anti-YKL-40 antibody and ionizing irradiation synergistically inhibit tumor vascularization and malignancy in glioblastoma. *Carcinogenesis* 35, 373–382.

Shao, R., Taylor, S.L., Oh, D.S., and Schwartz, L.M. (2015). Vascular heterogeneity and targeting: the role of YKL-40 in glioblastoma vascularization. *Oncotarget*.

Shelton, D.L., Sutherland, J., Gripp, J., Camerato, T., Armanini, M.P., Phillips, H.S., Carroll, K., Spencer, S.D., and Levinson, A.D. (1995). Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 477–491.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512.

Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., Makino, K., Saya, H., Hirano, H., Kuratsu, J.-I., et al. (2003). Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 63, 6962–6970.

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, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63, 5821–5828.

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.

Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., and Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10, 1470–1476.

Smeyne, R.J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L.K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S.A., and Barbacid, M. (1994). Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* 368, 246–249.

Smith, A., Teknos, T.N., and Pan, Q. (2013). Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 49, 287–292.

Snider, W.D. (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77, 627–638.

Sofroniew, M.V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 249–263.

Soung, Y.H., Nguyen, T., Cao, H., Lee, J., and Chung, J. (2015). Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis. *BMB Rep.*

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.

Street, J.M., Barran, P.E., Mackay, C.L., Weidt, S., Balmforth, C., Walsh, T.S., Chalmers, R.T.A., Webb, D.J., and Dear, J.W. (2012). Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J. Transl. Med.* 10, 5.

Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O.D., Zanella, F., Reulen, H.-J., and ALA-Glioma Study Group (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 7, 392–401.

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.

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10, 459–466.

Stupp, R., Hegi, M.E., Neyns, B., Goldbrunner, R., Schlegel, U., Clement, P.M.J., Grabenbauer, G.G., Ochsenbein, A.F., Simon, M., Dietrich, P.-Y., et al. (2010). Phase I/IIa Study of Cilengitide and Temozolomide With Concomitant Radiotherapy Followed by Cilengitide and Temozolomide Maintenance Therapy in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* 28, 2712–2718.

Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., and Record, M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* 89, 205–212.

Supiot, S., Gouraud, W., Campion, L., Jezéquel, P., Buecher, B., Charrier, J., Heymann, M.-F., Mahé, M.-A., Rio, E., and Chérel, M. (2013). Early dynamic transcriptomic changes during preoperative radiotherapy in patients with rectal cancer: a feasibility study. *World J. Gastroenterol.* **19**, 3249–3254.

Tabatabai, G., and Weller, M. (2011). Glioblastoma stem cells. *Cell Tissue Res.* **343**, 459–465.

Tacconelli, A., Farina, A.R., Cappabianca, L., Desantis, G., Tessitore, A., Vetusch, A., Sferri, R., Rucci, N., Argenti, B., Screpanti, I., et al. (2004). TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* **6**, 347–360.

Tacconelli, A., Farina, A.R., Cappabianca, L., Cea, G., Panella, S., Chioda, A., Gallo, R., Cinque, B., Sferri, R., Vetusch, A., et al. (2007). TrkAIII expression in the thymus. *J. Neuroimmunol.* **183**, 151–161.

Tanaka, Y., Kamohara, H., Kinoshita, K., Kurashige, J., Ishimoto, T., Iwatsuki, M., Watanabe, M., and Baba, H. (2013). Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* **119**, 1159–1167.

Taniuchi, M., Johnson, E.M., Roach, P.J., and Lawrence, J.C. (1986). Phosphorylation of nerve growth factor receptor proteins in sympathetic neurons and PC12 cells. In vitro phosphorylation by the cAMP-independent protein kinase FA/GSK-3. *J. Biol. Chem.* **261**, 13342–13349.

Tanwar, M.K., Gilbert, M.R., and Holland, E.C. (2002). Gene expression microarray analysis reveals YKL-40 to be a potential serum marker for malignant character in human glioma. *Cancer Res.* **62**, 4364–4368.

Tapley, P., Lamballe, F., and Barbacid, M. (1992). K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* **7**, 371–381.

Tauszig-Delamasure, S., Yu, L.-Y., Cabrera, J.R., Bouzas-Rodriguez, J., Mermet-Bouvier, C., Guix, C., Bordeaux, M.-C., Arumäe, U., and Mehlen, P. (2007). The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 13361–13366.

Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **110**, 13–21.

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.

Théry, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579.

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Editor. Board Juan Bonifacino AI *Chapter 3*, Unit 3.22.

Thiele, C.J., Li, Z., and McKee, A.E. (2009). On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 5962–5967.

Thoenen, H., Barde, Y.A., Davies, A.M., and Johnson, J.E. (1987). Neurotrophic factors and neuronal death. *Ciba Found. Symp.* 126, 82–95.

Tian, T., Zhu, Y.-L., Hu, F.-H., Wang, Y.-Y., Huang, N.-P., and Xiao, Z.-D. (2013). Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J. Cell. Physiol.* 228, 1487–1495.

Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244–1247.

Trams, E.G., Lauter, C.J., Salem, N., and Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 645, 63–70.

Tsoufas, P., Stephens, R.M., Kaplan, D.R., and Parada, L.F. (1996). TrkC isoforms with inserts in the kinase domain show impaired signaling responses. *J. Biol. Chem.* 271, 5691–5697.

Vaegter, C.B., Jansen, P., Fjorback, A.W., Glerup, S., Skeldal, S., Kjolby, M., Richner, M., Erdmann, B., Nyengaard, J.R., Tessarollo, L., et al. (2011). Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat. Neurosci.* 14, 54–61.

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659.

Van Meir, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.-K., Wen, P.Y., and Olson, J.J. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA. Cancer J. Clin.* 60, 166–193.

van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 121, 337–349.

van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., and Raposo, G. (2011). The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev. Cell* 21, 708–721.

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110.

Vigneswaran, K., Neill, S., and Hadjipanayis, C.G. (2015). Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann. Transl. Med.* 3, 95.

Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F., and Mittelbrunn, M. (2014). SORTING IT OUT: REGULATION OF EXOSOME LOADING. *Semin. Cancer Biol.* 28, 3–13.

Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2012). Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* 10, 717–728.

Vladimirova, V., Waha, A., Lückcrath, K., Pesheva, P., and Probstmeier, R. (2008). Runx2 is expressed in human glioma cells and mediates the expression of galectin-3. *J. Neurosci. Res.* 86, 2450–2461.

Volck, B., Ostergaard, K., Johansen, J.S., Garbarsch, C., and Price, P.A. (1999). The distribution of YKL-40 in osteoarthritic and normal human articular cartilage. *Scand. J. Rheumatol.* 28, 171–179.

Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413–431.

Vredenburgh, J.J., Desjardins, A., Herndon, J.E., Marcello, J., Reardon, D.A., Quinn, J.A., Rich, J.N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Sampson, J., et al. (2007). Bevacizumab Plus Irinotecan in Recurrent Glioblastoma Multiforme. *J. Clin. Oncol.* 25, 4722–4729.

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.

Wang, J.J., Rabizadeh, S., Tasinato, A., Sperandio, S., Ye, X., Green, M., Assa-Munt, N., Spencer, D., and Bredesen, D.E. (2000). Dimerization-dependent block of the proapoptotic effect of p75(NTR). *J. Neurosci. Res.* 60, 587–593.

Wang, J.-S., Wang, F.-B., Zhang, Q.-G., Shen, Z.-Z., and Shao, Z.-M. (2008a). Enhanced expression of Rab27A gene by breast cancer cells promoting invasiveness and the metastasis potential by secretion of insulin-like growth factor-II. *Mol. Cancer Res. MCR* 6, 372–382.

Wang, L., Rahn, J.J., Lun, X., Sun, B., Kelly, J.J.P., Weiss, S., Robbins, S.M., Forsyth, P.A., and Senger, D.L. (2008b). Gamma-secretase represents a therapeutic target for the treatment of invasive glioma mediated by the p75 neurotrophin receptor. *PLoS Biol.* 6, e289.

Wang, T.-C., Luo, S.-J., Lin, C.-L., Chang, P.-J., and Chen, M.-F. (2015). Modulation of p75 neurotrophin receptor under hypoxic conditions induces migration and invasion of C6 glioma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 32, 73–81.

Wang, Y., Hagel, C., Hamel, W., Müller, S., Kluwe, L., and Westphal, M. (1998). Trk A, B, and C are commonly expressed in human astrocytes and astrocytic gliomas but not by human oligodendrocytes and oligodendroglioma. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 96, 357–364.

Washiyama, K., Muragaki, Y., Rorke, L.B., Lee, V.M., Feinstein, S.C., Radeke, M.J., Blumberg, D., Kaplan, D.R., and Trojanowski, J.Q. (1996). Neurotrophin and neurotrophin receptor proteins in medulloblastomas and other primitive neuroectodermal tumors of the pediatric central nervous system. *Am. J. Pathol.* 148, 929–940.

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, 217–223–24.

Watanabe, T., Katayama, Y., Kimura, S., and Yoshino, A. (1999). Control of proliferation and survival of C6 glioma cells with modification of the nerve growth factor autocrine system. *J. Neurooncol.* 41, 121–128.

Wefel, J.S., Lenzi, R., Theriault, R.L., Davis, R.N., and Meyers, C.A. (2004). The cognitive sequelae of standard-dose adjuvant chemotherapy in women with breast carcinoma: results of a prospective, randomized, longitudinal trial. *Cancer* 100, 2292–2299.

Wehrman, T., He, X., Raab, B., Dukipatti, A., Blau, H., and Garcia, K.C. (2007). Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron* 53, 25–38.

Weller, M., van den Bent, M., Hopkins, K., Tonn, J.C., Stupp, R., Falini, A., Cohen-Jonathan-Moyal, E., Frappaz, D., Henriksson, R., Balana, C., et al. (2014). EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol.* 15, e395-403.

Welzel, G., Fleckenstein, K., Schaefer, J., Hermann, B., Kraus-Tiefenbacher, U., Mai, S.K., and Wenz, F. (2008). Memory function before and after whole brain radiotherapy in patients with and without brain metastases. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 72, 1311–1318.

White, I.J., Bailey, L.M., Aghakhani, M.R., Moss, S.E., and Futter, C.E. (2006). EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *EMBO J.* 25, 1–12.

Wiesmann, C., Ultsch, M.H., Bass, S.H., and de Vos, A.M. (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* 401, 184–188.

Wiestler, B., Capper, D., Holland-Letz, T., Korshunov, A., Deimling, A. von, Pfister, S.M., Platten, M., Weller, M., and Wick, W. (2013). ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 126, 443–451.

Williams, R.L., and Urbé, S. (2007). The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 355–368.

Wilson, C.M., Naves, T., Saada, S., Pinet, S., Vincent, F., Lalloué, F., and Jauberteau, M.-O. (2014a). The implications of sortilin/vps10p domain receptors in neurological and human diseases. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 13, 1354–1365.

Wilson, C.M., Naves, T., Vincent, F., Melloni, B., Bonnaud, F., Lalloué, F., and Jauberteau, M.-O. (2014b). Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J. Cell Sci.* 127, 3983–3997.

Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Théry, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., et al. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med.* 7, 297–303.

Wooten, M.W., Seibenhener, M.L., Mamidipudi, V., Diaz-Meco, M.T., Barker, P.A., and Moscat, J. (2001). The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 276, 7709–7712.

Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T.M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.-W., Geuze, H.J., and Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.* 278, 10963–10972.

Xiao, H., Lässer, C., Shelke, G.V., Wang, J., Rådinger, M., Lunavat, T.R., Malmhäll, C., Lin, L.H., Li, J., Li, L., et al. (2014). Mast cell exosomes promote lung adenocarcinoma cell proliferation - role of KIT-stem cell factor signaling. *Cell Commun. Signal. CCS* 12, 64.

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.

Xiong, J., Zhou, L.I., Lim, Y., Yang, M., Zhu, Y.-H., Li, Z.-W., Fu, D.-L., and Zhou, X.-F. (2015). Mature brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB are upregulated in human glioma tissues. *Oncol. Lett.* 10, 223–227.

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.

Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., et al. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* 360, 765–773.

Yang, C., and Robbins, P.D. (2011). The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 842849.

Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., and Buck, D.W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002–5012.

Yu, J.M., Jun, E.S., Bae, Y.C., and Jung, J.S. (2008a). Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev.* 17, 463–473.

Yu, S.-C., Ping, Y.-F., Yi, L., Zhou, Z.-H., Chen, J.-H., Yao, X.-H., Gao, L., Wang, J.M., and Bian, X.-W. (2008b). Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Lett.* 265, 124–134.

Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D.L., Black, K.L., and Yu, J.S. (2004). Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23, 9392–9400.

Zhang, J., Stevens, M.F.G., and Bradshaw, T.D. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr. Mol. Pharmacol.* 5, 102–114.

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nat. Med.* 4, 594–600.

Zouaoui, S., Rigau, V., Mathieu-Daudé, H., Darlix, A., Bessaoud, F., Fabbro-Peray, P., Bauchet, F., Kerr, C., Fabbro, M., Figarella-Branger, D., et al. (2012). [French brain tumor database: general results on 40,000 cases, main current applications and future prospects]. *Neurochirurgie.* 58, 4–13.

Zsürger, N., Mazella, J., and Vincent, J.P. (1994). Solubilization and purification of a high affinity neurotensin receptor from newborn human brain. *Brain Res.* 639, 245–252.

Zülch, K. (1979). Zülch KJ .Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organization, Geneva. 1979.

Annexes

Annexe 1. Isolement et mise en culture des CSM issues de la moelle osseuse.....	238
Annexe 2. Validation phénotypique des BM-MSL.....	239
Annexe 2.1. Clonogénicité	239
Annexe 2.2. Différenciation	239
Annexe 2.3. Mise en évidence de la présence de marqueurs de surface en cytométrie en flux	239

Annexe 1. Isolement et mise en culture des CSM issues de la moelle osseuse

La moelle osseuse est passée dans des seringues équipées d'aiguilles de calibre de plus en plus petit afin de dissocier les cellules puis est déposée sur une couche de Ficoll et centrifugée à 500g pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules situées à l'interface entre le Ficoll et la phase supérieure sont collectées, reprises dans du PBS 1X et centrifugées à 300g pendant 10 minutes à température ambiante. Le culot cellulaire est repris dans du PBS 1X, les cellules sont comptées sur un hématocytomètre de Malassez et la viabilité estimée grâce une coloration au bleu Trypan.

Les cellules sont ensuiteensemencées en flasques de 75 cm² (Sarstedt) à une densité de 50 000 cellules/cm² dans du DMEM/F12 1 :1 (Gibco) supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate sodium, 1% d'acides aminés non essentiels, 20ng/mL de FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2* ; Miltenyi Biotec), 50 UI/ml de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine (Gibco) et 1 µg/mL d'amphotéricine B (Gibco). . Les CSM sont des cellules qui ont la propriété d'adhérer au plastique. Après 24h de culture, le milieu est remplacé par du milieu frais.

Annexe 2. Validation phénotypique des BM-MSC

La validation de la nature des cellules se fait par un test de formation de CFU (*Colony Forming Unit*) ou test de clonogénicité, une analyse par cytométrie en flux de l'absence de marqueurs de cellules souches hématopoïétiques et la présence d'un panel de marqueurs de cellules souches « adultes ». En parallèle, leur pluripotence est validée testant leur différenciation selon plusieurs lignages (ostéoblastique et adipogénique).

Annexe 2.1. Clonogénicité

Après avoir été décollées à la trypsine et comptées sur hématocytomètre de Malassez, les cellules sontensemencées en plaques 6 puits à la densité minimale (dans l'idéal entre 1 et 10 cellules par puits) et maintenues en culture afin de visualiser la formation de colonies à partir d'une cellule unique.

Annexe 2.2. Différenciation

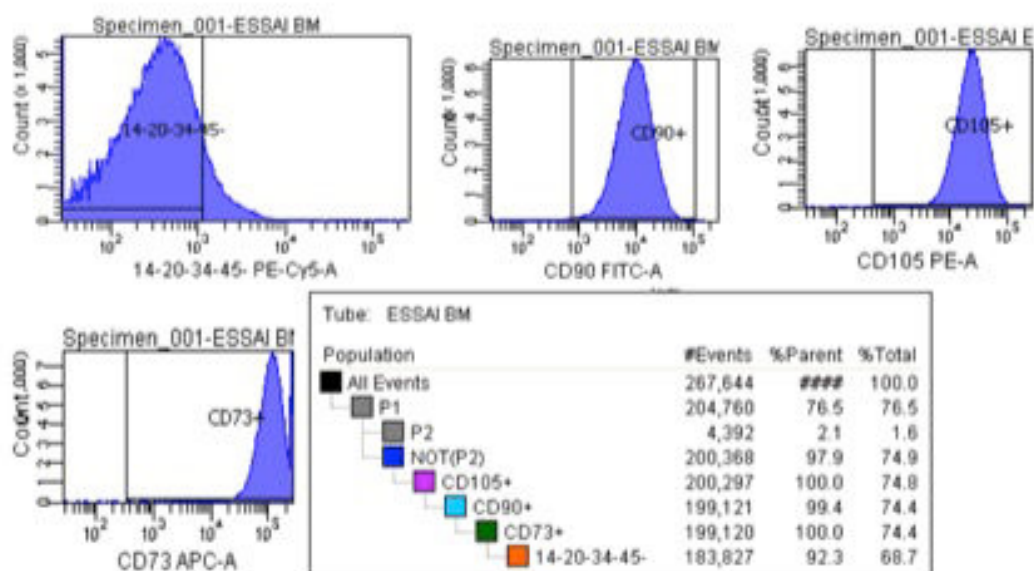
- **En ostéoblastes**

Les CSM sont ensemencées en puits de plaques 6 puits (Sarstedt) à raison de 5 à 10 000 cellules/cm² dans du MEM (Gibco) supplémenté avec 10% de SVF (IDBio), 2 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate sodium, 1% d'acides aminés non essentiels, et 50 UI/ml de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine (Gibco) et 100 nM de dexaméthasone, 3 mM de β-glycérophosphate **et** 50 µM d'acide ascorbique. La culture est maintenue pendant 21 jours en remplacement le milieu tous les 3 à 4 jours. Les cellules sont ensuite rincées au PBS 1X, fixées pendant 10 minutes à température ambiante dans une solution de paraformaldéhyde (Sigma Aldrich) à 4% en PBS et rincées à l'eau distillée. Un marquage de Von Kossa permettant de mettre en évidence la minéralisation de la matrice extracellulaire des cellules différenciées en ostéoblastes par immersion des cellules dans une solution aqueuse à 5% de nitrate d'argent (Sigma Aldrich), exposées à la lumière blanche pendant 30 secondes et rincées à l'eau distillée.

Annexe 2.3. Mise en évidence de la présence de marqueurs de surface en cytométrie en flux

Après avoir été décollées à la trypsine et comptées sur hématocytomètre de Malassez, 2 aliquots de un million de cellules (tubes avec les contrôles isotypique et tube

« essai ») et 5 aliquots de 500 000 cellules sont placés dans des tubes de cytométrie (BD Falcon (monomarquages avec des anticorps couplés à des fluorochromes utilisés dans le test pour réaliser la compensation du cytomètre).). Les marquages sont réalisés selon le protocole recommandé par le fournisseur : kit « MSC phenotyping assay » (Myltenyi Biotec).
Brièvement pour être validées comme CSM, les cellules doivent être à la fois positives pour CD90, CD73 et CD105 et négatives pour CD14, CD20, CD34 et CD45.



Résumé :

Les glioblastomes (GBM) sont des tumeurs astrocytaires au pronostic défavorable. L'échec des thérapies actuelles (chimio et radiothérapies) est principalement lié à la résistance des cellules souches cancéreuses (CSCs). Ces cellules ont besoin de communiquer en permanence avec leur microenvironnement pour leur survie et pour maintenir une niche favorable à leur développement. Le transfert de matériel entre les CSC, les cellules tumorales et le microenvironnement contribue à l'échappement thérapeutique. Des travaux récents révèlent l'importance des récepteurs aux neurotrophines TrkB et TrkC dans la survie et la croissance des CSC de GBM. Nos travaux préliminaires dans le cancer bronchique démontrent que les récepteurs aux neurotrophines sont transférés aux cellules du microenvironnement via les exosomes afin de les contrôler. Cependant, le mécanisme de diffusion de récepteurs oncogéniques à partir de CSC n'a jamais été étudié. Notre objectif principal était donc de déterminer l'implication des récepteurs des neurotrophines dans le transfert du phénotype agressif des CSC vers les cellules du microenvironnement afin de favoriser la résistance thérapeutique du glioblastome. Nos résultats ont permis d'établir un lien entre le stade de différenciation des cellules tumorales, l'expression des neurotrophines et leur interaction avec le microenvironnement tumoral via les exosomes. Le transfert de TrkB au sein des exosomes joue un rôle clé dans la progression tumorale du GBM et dans l'agressivité cellulaire. Néanmoins, le transfert des récepteurs aux neurotrophines *via* les exosomes pourrait également être impliqué dans les mécanismes de riorésistance. Des études menées sur des cellules de GBM humain irradiées et traitées par des exosomes démontrent l'implication de ces derniers dans l'échappement thérapeutique. Parmi les cellules du microenvironnement ciblées par les exosomes, les CSM sont celles qui ont été les moins étudiées bien qu'elles possèdent un tropisme spécifique pour le GBM. Nos travaux démontrent que les exosomes de GBM modifient le phénotype des CSM et augmentent leurs capacités prolifératives et migratoires. La fonction exacte du transfert des récepteurs des neurotrophines devra être analysée dans ces différents modèles afin de préciser son importance dans la physiopathologie du glioblastome et sa progression. L'expression des récepteurs aux neurotrophines dans ces exosomes permet d'envisager leur utilisation en tant que biomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques dans le GBM.

Mots clés : Glioblastomes, cellules souches cancéreuses, neurotrophines, TrkB, radiothérapie, cellules souches mésenchymateuses, exosomes.