Université Paris Cité

École doctorale 562 BioScience Paris Cité (BioSPC)

Laboratoire de RadioPathologie

Unité mixte de recherche Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiations

Rôle de JMY (Junction-Mediating and regulatorY) dans la migration et l'invasion radio-induites des progéniteurs neuraux et des cellules souches de glioblastome dans des organoïdes cérébraux

Par **Oriane BERGIERS**

Thèse de doctorat en **Physiologie et physiopathologie**

Dirigée par **Laurent GAUTHIER**

Présentée et soutenue publiquement le 8 juin 2026

Devant un jury composé de :

Hélène CASTEL, Directrice de Recherche INSERM, U. de Rouen Normandie	Rapporteuse
Alexandra WINKELER, Directrice de Recherche CEA, U. Paris-Saclay	Rapporteuse
Vincent EL GHOUZZI, Directeur de Recherche CNRS, U. Paris-Cité	Examinateur
Olivier GUIPAUD, Chercheur ASNR, U. Paris-Saclay,	Examinateur
Laurent GAUTHIER, Directeur de Recherche CEA, U. Paris-Cité	Directeur de thèse

Université Paris Cité

École doctorale 562 BioScience Paris Cité (BioSPC)

Laboratoire de RadioPathologie

Unité mixte de recherche Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiations

Rôle de JMY (Junction-Mediating and regulatorY) dans la migration et l'invasion radio-induites des progéniteurs neuraux et des cellules souches de glioblastome dans des organoïdes cérébraux

Par **Oriane BERGIERS**

Thèse de doctorat en **Physiologie et physiopathologie**

Dirigée par **Laurent GAUTHIER**

Présentée et soutenue publiquement le 8 juin 2026

Devant un jury composé de :

Hélène CASTEL, Directrice de Recherche INSERM, U. de Rouen Normandie	Rapporteuse
Alexandra WINKELER, Directrice de Recherche CEA, U. Paris-Saclay	Rapporteuse
Vincent EL GHOUZZI, Directeur de Recherche CNRS, U. Paris-Cité	Examinateur
Olivier GUIPAUD, Chercheur ASNR, U. Paris-Saclay,	Examinateur
Laurent GAUTHIER, Directeur de Recherche CEA, U. Paris-Cité	Directeur de thèse

Titre : Rôle de JMY dans la migration et l'invasion radio-induites des progéniteurs neuraux et des cellules souches de glioblastome dans des organoïdes cérébraux

Résumé : La migration cellulaire constitue un processus fondamental à la fois au cours du développement cérébral et dans la progression tumorale. Parmi les régulateurs impliqués dans ce processus, la protéine JMY, connue pour ses fonctions de cofacteur transcriptionnel de p53 et de régulateur de la dynamique de l'actine, pourrait jouer un rôle central dans les réponses adaptatives à l'irradiation. Dans ce contexte, l'axe ROS/HIF1α/JMY, activé en réponse aux rayonnements ionisants, pourrait constituer un mécanisme clé de la migration et de l'invasion radio-induites.

Dans ce but, nous avons évalué les conséquences d'une irradiation sublétale sur la migration des progéniteurs neuraux (NPC), processus essentiel à l'établissement correct de l'architecture corticale. Nous montrons qu'une irradiation modérée (entre 0,5 et 1,5 Gy) induit une augmentation rapide et significative de la migration et de l'invasion des NPC humains et murins, *in vitro* comme *in vivo*. Cette réponse est précédée d'une élévation intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ROS), conduisant à la stabilisation et à l'accumulation nucléaire de HIF-1α, puis à l'induction de JMY. L'inhibition de HIF-1α ou de JMY abolit cet effet, démontrant leur rôle essentiel dans la migration radio-induite des NPC. Ces données suggèrent qu'une migration aberrante des NPC induite par l'irradiation pourrait contribuer à des défauts de positionnement cellulaire et à des altérations du développement cérébral.

Parallèlement, nous avons étudié ces mécanismes dans un contexte tumoral, au sein des cellules souches de glioblastome (CSG), connues pour leur rôle dans l'invasion et la résistance thérapeutique. À l'aide de modèles tridimensionnels mimant une invasion de CSG dans des organoïdes cérébraux (modèle GLICO, GLioma In Cerebral Organoids), nous montrons qu'une irradiation de 0,5 Gy augmente significativement la profondeur et la vitesse d'invasion des CSG. Cette augmentation s'accompagne d'une induction de la formation et de l'allongement des microtubes tumoraux, structures riches en actine impliquées dans l'invasion et la communication intercellulaire. L'invalidation de JMY abolit ces effets radio-induits, tandis que sa surexpression est suffisante pour reproduire les phénotypes radio-induits, établissant son rôle dans la plasticité invasive des CSG.

Ces résultats mettent en évidence une convergence des mécanismes entre NPC et CSG, reposant sur l'activation d'un programme commun de migration/invasion dépendant de l'axe ROS/HIF1α/JMY. Cette similarité suggère la réactivation, dans un contexte tumoral, de programmes développementaux préexistants. Ainsi, alors que dans le cerveau en développement cette réponse pourrait perturber l'organisation tissulaire, elle favorise dans le glioblastome, l'invasion et potentiellement la récidive après radiothérapie.

En conclusion, ce travail met en évidence le rôle central de JMY dans la régulation de la migration et de l'invasion radio-induites, à la fois dans un contexte physiologique et tumoral. L'identification de cet axe moléculaire ouvre des perspectives pour le développement de stratégies thérapeutiques visant à limiter la dissémination des cellules tumorales après irradiation, tout en apportant des éléments de compréhension sur les effets de l'irradiation sur le cerveau en développement.

Mots clés : JMY, migration/invasion radio-induite, progéniteurs neuraux, glioblastome, cellule souche de glioblastome, organoïdes cérébraux, microtubes tumoraux.

Title: The role of JMY in the radio-induced migration and invasion of neural progenitors and glioblastoma stem cells in cerebral organoids

Abstract: Cell migration is a fundamental process both during brain development and in tumour progression. Among the regulators involved in this process, the JMY protein, known for its functions as a p53 transcriptional co-factor and a regulator of actin dynamics, may play a central role in adaptive responses to irradiation. In this context, the ROS/HIF1α/JMY axis, activated in response to ionising radiation, may constitute a key mechanism in radiation-induced migration and invasion.

To this end, we assessed the consequences of sublethal irradiation on the migration of neural progenitor cells (NPCs), a process essential for the correct establishment of cortical architecture. We demonstrate that irradiation at moderate doses (from 0.5 to 1.5 Gy) induces a rapid and significant increase in the migration and invasion of human and murine NPCs, both *in vitro* and *in vivo*. This response is preceded by an intracellular increase in reactive oxygen species (ROS), leading to the stabilisation and nuclear accumulation of HIF-1α, followed by the induction of JMY. Inhibition of HIF-1α or JMY abolishes this effect, demonstrating their essential role in radiation-induced NPC migration. These data suggest that aberrant NPC migration induced by irradiation could contribute to defects in cellular positioning and alterations in brain development.

At the same time, we investigated these mechanisms in a tumour context, within glioblastoma stem cells (GSCs), which are known for their role in invasion and resistance to treatment. Using three-dimensional models mimicking GSC invasion in brain organoids (the GLICO model, GLioma In Cerebral Organoids), we demonstrate that irradiation of 0.5 Gy significantly increases the depth and speed of GSC invasion. This increase is accompanied by the induction of the formation and elongation of tumour microtubules, actin-rich structures involved in invasion and intercellular communication. Knocking out JMY abolishes these radiation-induced effects, whilst its overexpression is sufficient to reproduce the radiation-induced phenotypes, establishing its role in the invasive plasticity of CSG.

These results highlight a convergence of mechanisms between NPC and CSG, based on the activation of a common migration/invasion program dependent on the ROS/HIF1α/JMY axis. This similarity suggests the reactivation, in a tumour context, of pre-existing developmental programs. Thus, whilst in the developing brain this response could disrupt tissue organisation, in glioblastoma it promotes invasion and potentially recurrence following radiotherapy.

In conclusion, this study highlights the central role of JMY in regulating radiation-induced migration and invasion, both in physiological and tumour contexts. The identification of this molecular pathway opens up prospects for the development of therapeutic strategies aimed at limiting the spread of tumour cells following irradiation, whilst providing insights into the effects of irradiation on the developing brain.

Keywords: JMY, radiation-induced migration/invasion, neural progenitors, glioblastoma, glioblastoma stem cells, cerebrals organoids, tumour microtubes.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement les membres de mon jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce manuscrit.

Je remercie tout particulièrement mes rapporteures, Hélène Castel et Alexandra Winkeler, pour la lecture attentive de ce travail, leurs remarques précieuses et le temps qu'elles y ont dédié. J'adresse également mes remerciements à Vincent El Ghouzzi et Olivier Guipaud pour avoir accepté d'examiner cette thèse et pour leur regard critique et constructif.

Je tiens à remercier Tania Vitalis, qui a été une véritable source d'inspiration et qui m'a donné envie de poursuivre en thèse après mon master en neurobiologie.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, Laurent Gauthier, pour m'avoir accompagnée tout au long de ces années. Merci pour ton encadrement, ta disponibilité et ton exigence, jusque dans les moindres détails. Tes phrases résonnent encore « qu'est-ce qu'il dit le papier ? », ou encore « là, tu peux encore t'amuser à voir si… ». Sur le moment, je souriais souvent à l'idée de "m'amuser"… mais avec le recul, tu avais raison : je ne me suis jamais ennuyée durant cette thèse. Au fil de cette thèse, j'ai découvert non seulement un sujet scientifique passionnant, mais aussi le plaisir profond de faire de la recherche, avec ses questionnements, ses doutes, ses essais, et ses moments de compréhension. Je te souhaite le meilleur pour la suite et pour la direction du LRP, avec de nombreuses publications à fort impact !

Je remercie également mon ancien directeur de laboratoire, François Boussin, pour son soutien constant, y compris dans les moments qui ont marqué ma vie personnelle durant cette thèse. Merci pour tous ces moments partagés, pour ton humanité et pour ces histoires qui ont rythmé tant de repas : les guerriers africains et les aventures de Milou resteront, sans aucun doute, mes préférées à jamais.

Merci à toute l'équipe du LRP, aux membres encore présents comme à ceux qui n'ont été que de passage, un peu comme moi.

Thierry, merci pour tout ce que tu m'as appris, et aussi pour tout ce que tu ne m'as jamais expliqué malgré ton célèbre « on s'en fout, c'est pas important, je t'expliquerai plus tard ! ». Tu es un véritable moteur et un rayon de soleil dans cette équipe. Tu vas me manquer. Tout comme ton fidèle acolyte Olivier : vos tenues de tennisman (amateurs) vont aussi me manquer ! Marc-André, merci pour tes conseils et ton accompagnement. Alexandra, merci pour ta gentillesse et tes précieux conseils. Merci à mon ancien co-thésard Jérémy de m'avoir passé le flambeau. Et maintenant, à toi ma petite Nenette, ma petite Noa : c'est à ton tour. Je te souhaite de trouver dans cette thèse tout l'épanouissement et le bonheur que j'y ai trouvés. Profite de chaque instant, car tout passe très vite. À mes Tic et Tac, mes incroyables collègues devenues de véritables amies, mon petit Bouchon et ma Charlotte : sans vous, cette aventure n'aurait jamais été la même. Vous me manquez énormément. Merci pour votre présence dans tous les moments de ma vie de thésarde, mais aussi de maman. J'ai hâte de continuer à faire vivre notre belle amitié. Christine, tu es un modèle pour moi. Merci pour ton

soutien, ton réconfort et ta bienveillance. Tu es devenue une véritable deuxième maman ici, et même une figure incontournable dans ma famille ! J'espère que nous continuerons à partager de beaux moments, et peut-être bientôt reprendre le yoga ensemble. Jozo, mon cher Deliciso, tu es sans doute la plus belle rencontre de cette thèse, même si l'on ne saura jamais vraiment ton année de naissance ! Ton grain de folie, ton humour, ta générosité et ton immense cœur ont illuminé mon quotidien. C'était un honneur de partager ce bureau avec toi. Tu es un grand homme, pas forcément par la taille, mais par le talent et la bonté. Cette fin de thèse annonce aussi bientôt ta retraite, bien méritée. Je te souhaite qu'elle soit aussi belle et riche que ta carrière, au moins sur le plan spirituel, puisque tu n'as toujours pas gagné au loto ni acheté ton manoir ! Toutes tes expressions, et notamment ton inoubliable « si c'est comme ça, je m'en va », vont terriblement me manquer. Merci pour tout ce que tu m'as apporté. Merci également à tous les étudiants, notamment Jeanne, Mathis et Catarina, Youssef, Marie-Anne pour votre bonne humeur et pour avoir animé le quotidien du laboratoire. Une pensée pour toi Haser, qui as illuminé le LRP par ton sourire et ton dynamisme durant ces quelques mois : reviens vite en France ! Merci à toi Lamya, qui m'a vue évoluer tout au long de cette thèse. Merci pour ta présence au quotidien et pour la relation de confiance que nous avons construite au fil des années. Merci aussi à Tiya, ma copine de thèse, qui a commencé cette aventure au CEA en même temps que moi. Je te souhaite une très belle soutenance, à la hauteur de la super scientifique que tu es : rigoureuse, passionnée, brillante, et toujours pleine d'énergie. Je suis très heureuse d'avoir partagé cette période avec toi, et je te souhaite le meilleur pour la suite. Je remercie aussi Uxue, notre doctorante venue de Bilbao, qui a été ma dernière belle rencontre au LRP. Collègue adorable, toujours bienveillante, elle m'a aussi permis de perfectionner mon anglais au quotidien. Très vite, elle est devenue une véritable amie, avec qui j'ai partagé beaucoup de points communs, notamment notre côté très carré et organisé, ce qui nous a rapprochées naturellement.

Je remercie ma famille et ma belle-famille, sans qui cette thèse n'aurait jamais été possible. Vous êtes mes piliers. À ma maman et à mon papa, merci pour tous ces sacrifices que vous avez faits pour moi afin que je puisse faire de belles études et devenir celle que je suis aujourd'hui. C'est aussi grâce à vous que j'en suis arrivée là. Même si la vie et la maladie nous éloigne parfois, je vous suis profondément reconnaissante et je vous porte avec moi à chaque étape. À ma sœur, merci d'être là, tout simplement. Même dans les silences ou la distance, tu comptes énormément pour moi. Merci à mon oncle Patrick et à ma tante Régine de n'avoir jamais oublié aucun moment important de ma vie. Malgré la distance, vous avez toujours su être présents, d'une manière ou d'une autre, et cela compte énormément pour moi. Votre attention et votre affection me touchent profondément. À ma tante MA, merci pour ta bienveillance et pour la femme forte que tu es. Tu es une source d'inspiration pour moi, et je t'admire profondément.

À ma belle-famille, merci pour votre présence, votre soutien indéfectible et pour l'amour que vous m'avez toujours témoigné. Vous avez occupé une place essentielle dans cette aventure, et je mesure chaque jour la chance de vous avoir dans ma vie. Nathalie, merci pour ta bienveillance et ton attention constantes. Ma Jojo, toujours présente, attentionnée et pleine de bonne humeur. Merci à mes beaux-frères, Max, PL et Nico, pour leur gentillesse et tous ces moments partagés. Vous êtes une famille formidable, et je suis vraiment heureuse d'en faire partie. Une pensée toute particulière pour mes merveilleux petits neveux, Paul et Jeanne, que j'aime de tout mon cœur. Et puis merci Francis, on ne te le dira jamais assez !

Merci à mes copines les plus proches, pour votre présence, votre soutien et tous ces moments de bonheur au quotidien qui m'ont portée tout au long de cette thèse. Salomé, ma plus ancienne amie, merci d'être là depuis toujours. Tu fais partie de mon histoire, de mes repères, et ton amitié m'est précieuse depuis toutes ces années. Sophie et Cécile, mes amies d'enfance, merci pour ces liens qui traversent le temps sans jamais s'effacer. Vous avez une place unique dans ma vie. Anthéa, merci à toi avec qui j'ai fait mes débuts en master de neuro. Te rencontrer a été une vraie chance, et t'avoir dans ma vie aujourd'hui encore plus. Tu es une personne exceptionnelle, toujours bienveillante, à l'écoute et profondément investie dans ce que tu fais. En tant que kiné, tu prends soin des autres avec une humanité et une énergie admirable. Ma petite Manon, merci d'être toujours là pour moi, à n'importe quel moment, sans jamais hésiter. Ta présence et ton écoute sont inestimables. Amélie et Alex, merci à vous deux pour votre bienveillance, votre énergie et toutes ces bonnes ondes que vous apportez autour de vous avec vos 3 petites merveilles. Clara et Nadège, mes belles rencontres de la caserne de Palaiseau, merci pour votre amitié, votre soutien et tous ces instants précieux que nous avons partagés. Je ne t'oublierai pas mon petit Jiss, tu sais tout ce que je pense de toi. Te voir réussir dans ta propre thèse, depuis le début de cette aventure, a été pour moi l'une des plus belles fiertés. Émilie, mon petit koala, même si je n'ai pas eu beaucoup de temps pour te voir ces derniers temps, j'espère que nous pourrons vite nous rattraper une fois cette thèse soutenue, car ces moments avec toi me manquent énormément.

Cette thèse a accompagné toute une partie de ma vie. Elle a traversé des moments difficiles, un doigt coupé, une appendicite, une mâchoire cassée, mais aussi les plus beaux événements de mon existence : mon mariage avec toi, mon mari, ma grossesse, et la naissance de notre petite Constance.

À toi, mon amour : tu es mon pilier, mon moteur, mon soleil. Sans toi, rien de tout cela n'aurait eu la même saveur, ni même été possible. Tu as été présent à chaque instant, dans les moments de doute comme dans les plus beaux, toujours là pour me relever, me porter et croire en moi, parfois plus que moi-même. Merci pour ton soutien sans faille, pour ta patience, pour ta force et pour cet amour immense que tu me donnes chaque jour. Tu es bien plus qu'un compagnon de vie, tu es mon équilibre, mon évidence. Tu es un homme exceptionnel, et c'est grâce à toi que j'ai réalisé la plus belle "manip" de cette thèse, la plus précieuse de toutes : notre petite Constance. Je t'aime infiniment ma garde.

Je dédie enfin cette thèse à ma Mamy, qui, j'en suis sûre, serait très fière de ce travail. J'aurais tant aimé t'avoir à mes côtés plus longtemps.

Et à toi, ma fille chérie, ma petite Constance : cette thèse a commencé avant même que tu ne sois là, et tu en es aujourd'hui la plus belle réussite. Tu m'as offert le plus beau rôle du monde. En plus de devenir docteure, je suis devenue ta maman. Je t'aime infiniment.

SOMMAIRE

Remerciements
Sommaire
LISTE DES FIGURES
LISTE DES TABLEAUX
Liste des abréviations
INTRODUCTION ***1***
1. CSN, PROGENITEURS NEURAUX ET MIGRATION ***1***
1.1 Définition et propriétés des cellules souches neurales (CSN) **1**
1.1.1 Multipotence et auto-renouvellement 1
1.1.2 Localisation des CSN dans le cerveau adulte 2
1.1.3 Rôle physiologique dans la neurogenèse et l'homéostasie 3
1.2 Régulation des CSN et mécanismes moléculaires implicites **4**
1.2.1 Voies moléculaires régulant les CSN 4
1.2.2 Interactions avec la niche neurogénique 5
1.2.3 Plasticité et différenciation 6
1.3. Migration des progéniteurs neuraux **6**
1.3.1 Mécanismes cellulaires de migration 6
1.3.2 Cytosquelette et polarisation cellulaire 7
1.3.3 Interaction avec la matrice extracellulaire 7
1.4 Rôle de cellules souches neurales dans la gliomagenèse : origine et dérégulation **8**
1.4.1 Origine des glioblastome : implication des cellules souches neurales 8
1.4.2 Dérégulation des cellules souches neurales et acquisition d'états de type cellule souche de glioblastome 9
2. GLIOBLASTOME ET CELLULES SOUCHES DE GLIOBLASTOME ***11***
2.1 Généralités **11**
2.1.1. Epidémiologie 11
2.1.2 Facteurs de risques 12
2.2 Evaluation, diagnostique et classification du GBM **13**
2.2.1 Diagnostic par imagerie IRM 13
2.2.2 Histopathologie 14
2.2.3 Classification moléculaire des glioblastomes 16
2.3 Principales altérations génétiques et moléculaires du GBM **16**
2.4 Composition cellulaire et microenvironnement du GBM **19**
2.4.1 Les cellules tumorales 19
2.4.2 Compartiment vasculaire 20
2.4.3 Microenvironnement immunitaire 20
2.4.3.1 Les lymphocytes 20
2.4.3.2 La microglie et les macrophages périphériques 21
2.4.4 Les astrocytes et les neurones 21
2.4.5 Les cellules souches de glioblastome 22
2.4.5.1 Définition et propriétés 22
2.4.5.2 Niches tumorales des CSG 24
2.5 Rôle des CSG dans l'agressivité tumorale et la récidive **24**
3 : TRAITEMENT DU GBM ET RADIOBIOLOGIE ***27***
3.1. Prise en charge thérapeutique des GBM **27**
3.1.1 Traitement de première ligne 27
3.1.2 Traitement chirurgical 27
3.1.3 Chimiothérapie 28
3.1.4 Radiothérapie 28
3.1.4.1 Traitement standard 28
3.1.4.2. La radiothérapie externe et les schémas de fractionnement 29
3.2 Les problématiques de la prise en charge du GBM **30**
3.2.1 Hétérogénéité et microenvironnement tumoral 30
3.2.2 Mécanismes de résistance 30

4 : MIGRATION, INVASION, RECIDIVE ET INVASION RADIO-INDUITE *33*
4.1 Organisation du cytosquelette **33**
4.1.1 Les microfilaments intermédiaires 33
4.1.2 Microtubules 34
4.1.2.1 Propriétés structurales et dynamique des microtubules 34
4.1.2.2 Organisation microtubulaire 35
4.1.2.3 Couplage avec l'actine, les adhérences et contrôle de l'invasivité 35
4.1.3 Cytosquelette d'actine 36
4.2 Mécanismes de la motilité cellulaire **37**
4.2.1 Polarisation cellulaire et contrôle moléculaire de la migration dirigée 37
4.2.2 Signaux régulant la migration 39
4.2.3 Plasticité cytosquelettique 41
4.2.4 Adaptation mécanique et formine 42
4.3 Les différents modes et types de migration des cellules tumorales **42**
4.3.1 Les modes de migration cellulaire 43
4.3.1.1 La migration individuelle 43
4.3.1.2 La Migration collective 43
4.3.1.3 Plasticité migratoire et états intermédiaires 44
4.3.2 Les types de migration cellulaire 45
4.3.2.1 La migration mésenchymateuse 45
4.3.1.2 La migration amiboïde 46
4.4 Interaction cellules tumorales et MEC **47**
4.4.1 Composition et propriété de la matrice extracellulaire du GBM 47
4.4.2 Architecture matricielle et stratégies migratoires des cellules de glioblastome 48
4.4.3 Interactions cellules/MEC impactant la migration des cellules de glioblastomes 48
4.4.3.1 Définition générale de l'adhésion cellule/MEC 48
4.4.3.2 Intégrines : une interface mécano-chimique entre la cellule tumorale et la matrice extracellulaire (MEC) 49
4.4.3.2.1 Reprogrammation des intégrines dans le glioblastome et lien avec l'état souche 49
4.4.3.2.2 La répartition spatiale et fonctionnelle des intégrines 50
4.4.3.2.3 Modules intégrines/actine spécifiques de la migration des cellules souches de glioblastome 51
4.4.3.3 Les récepteurs de l'acide hyaluronique 51
4.4.3.4 Rigidité de la MEC et adhérences focales 52
4.4.3.5 Rigidité matricielle et invasion des cellules de glioblastomes 52
4.5 L'invasion des cellules de glioblastome **53**
4.5.1 Transition épithélio-mésenchymateuse et invasion du glioblastome 54
4.5.2 Voies moléculaires impliquées dans l'invasion du GBM 54
4.6 Microtubes tumoraux (MT) **57**
4.6.1 Les protrusions intercellulaires 57
4.6.1.1 Les tunneling nanotubes (TNT) 57
4.6.1.2 Les microtubes tumoraux 58
4.6.2 Sous-types de MT et états cellulaires associés 59
4.6.2.1 Microtubes tumoraux (MT) non connectés 59
4.6.2.2 Microtubes tumoraux (MT) connectés (interconnectés) 59
4.6.3 Rôle des MT dans les gliomes 59
4.6.3.1 Fonctions cellulaires 60
4.6.3.1.1 Communication inter cellulaire 60
4.6.3.1.2 Migration et Invasion 61
4.6.4 Régulation moléculaire et génétique de la formation des MT 61
4.6.5 Transduction du signal intracellulaire 62
4.7. Effets de l'irradiation sur l'invasion des cellules de GBM **63**
4.7.1 Influence de l'irradiation sur la motilité des cellules de glioblastome 64
4.7.1.1 Modification du déplacement cellulaire après irradiation 64
4.7.1.2 Modifications phénotypiques radio-induites et transition épithélio-mésenchymateuse 64
4.7.1.3 Altérations biomécaniques et réorganisation du cytosquelette 65
4.7.1.4 Renforcement des adhésions cellulaires et signalisation associée à la motilité 65
4.7.2 Effets de l'irradiation sur les capacités invasives des cellules de glioblastome 66
4.7.3. Activité protéolytique et remodelage de la matrice extracellulaire post-irradiation 67
4.8 La récidive du glioblastome **67**
4.8.1 Rôles des cellules souches de glioblastome 68
4.8.2 Contribution des altérations génétiques à la récidive du glioblastome 69

4.8.3 Altérations des voies de signalisation et récidive du glioblastome 73
4.8.4 Rôle de l'invasion radio-induite dans la récidive du glioblastome 74
4.8.4.1 L'invasion radio-induite comme programme adaptatif 74
4.8.4.2 Nœuds moléculaires centraux de l'invasion radio-induite 77
4.8.4.3 Reprogrammation des cellules souches et rôle du microenvironnement irradié 77
4.8.4.4 Implications cliniques et limites des stratégies thérapeutiques 78
4.8.5 Contribution des MT dans la récidive des cellules de GBM 79
4.8.5.1 Résistance thérapeutique 79
4.8.5.2 Récidive tumorale 80
4.8.5.3 Stratégies thérapeutiques ciblant les MT 80
4.8.5.3.1 Interventions médicamenteuses 80
4.8.5.3.2 Thérapie génique 82
5. MODELISATION EXPERIMENTALE DU GBM 83
5.1 Modèles d'études des gliomes 83
5.1.1 Modèles d'étude in vitro du glioblastome 83
5.1.1.1 Lignées cellulaires de glioblastome 83
5.1.1.2 Cellules souches de glioblastomes et cultures en gliosphère 83
5.1.1.3 Cultures adhérentes sur matrice extracellulaire 84
5.1.2 Modèles *in vivo* du glioblastome 84
5.1.2.1 Modèles de xénogreffe (xénotransplantation) 84
5.1.2.2 Modèles syngéniques 85
5.1.2.3 Modèles murins génétiquement modifiés 85
5.1.2.4 Modèles de souris humanisées 85
5.1.2.5 Limites et complémentarité des modèles *in vivo* 86
5.2 Généralités sur les organoïdes et leurs applications 86
5.2.1. Génération des organoïdes 86
5.2.1.1 Cellules Pluripotentes Induites (iPSC) 87
5.2.1.2 Matrice extracellulaire naturelle : le Matrigel 87
5.2.1.3 Réactifs et Milieux de Culture 87
5.2.2 Applications en médecine personnalisée 88
5.2.3. Réduction de l'expérimentation animale 88
5.3 Les organoïdes cérébraux 88
5.3.1 Organoïdes cérébraux non dirigés 89
5.3.2 Organoïdes corticaux dirigés 90
5.3.3. Autres type d'organoïdes neuraux 90
5.3.4 Organoïdes complexes 91
5.4 Modèle d'organoïde pour l'étude du GBM 92
5.4.1 Tumoroïde de GBM 92
5.4.2 Organoïde cérébral néoplasique (NeoCOR) 93
5.4.3 Modèle de coculture GLICO (*glioma on cerebral organoid*) 93
6 : Junction-Mediating and regulatorY (JMY) 99
6.1 Généralités 99
6.2 Structure et domaines fonctionnels 100
6.2.1 Domaine N-terminal (transcription – interaction avec p53) 100
6.2.2 Domaine central (régulation et trafic intracellulaire) 101
6.2.3 Domaine C-terminal WCA (régulation de l'actine) 102
6.3 Régulation de JMY 104
6.3.1 Régulation transcriptionnelle de JMY 104
6.3.1.1 E2F1 104
6.3.1.2 HIF-1α 104
6.3.2 Régulation post-traductionnelles 105
6.3.2.1 Régulation par les ARN non codants 105
6.3.2.2 Régulation de JMY par phosphorylation 106
6.3.2.3 Régulation de JMY par la voie ubiquitine Mdm2/protéasome 107
6.3.3. Régulation de la localisation subcellulaire de JMY 107
6.4 Rôles biologiques de JMY 109
6.4.1 Fonctions cellulaires de JMY 109
6.4.1.1 Régulation de la dynamique de l'actine 109
6.4.1.2 Réponse au stress, réparation de l'ADN et apoptose 111
6.4.1.3 Rôle dans le trafic membranaire et vésiculaire 113

6.4.1.4 Rôle dans l'autophagie 113
6.4.2 Fonctions physiologiques de JMY 114
6.4.2.1 Rôle au cours de l'embryogenèse 114
6.4.2.2 Rôle dans le système nerveux en développement 115
6.4.2.3 Potentiel biomarqueur diagnostique et thérapeutique 116
6.5 Implication de JMY en physiopathologie 117
6.5.1 Maladies génétiques associées à JMY 117
6.5.1.1 Maladies génétiques 117
6.5.1.2 Autres pathologies 118
6.5.2 Cancer 118
6.5.2.1 Altérations génomiques associées 118
6.5.2.2 Implication dans différents cancers 118
6.5.3 Perspectives thérapeutiques 119
6.6 Conclusion 120
OBJECTIFS DE THESE 121
RESULTATS ET DISCUSSION :* Article 1 : *A ROS/HIF-1α/JMY signaling axis drives radiation-induced migration and invasion of neural progenitor cells 123
I. Introduction 125
II. Publication 127
ABSTRACT 129
1. Background 131
2. Material and Methods 133
3. Results 141
4. Discussion 149
5. Conclusion 151
6. List of abbreviations 153
7. Supplementary material 155
8. References 169
RESULTATS ET DISCUSSION : Rôle de JMY dans la migration et l'invasion radio-induites des cellules souches de glioblastome dans des organoïdes cérébraux : 197
I. Introduction : 199
II. Matériel et méthodes 201
III. Résultats expérimentaux 213
IV. Discussion 239
CONCLUSION GENERALE 244
BIBLIOGRAPHIE 265
ANNEXE 305

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Imagerie par résonance magnétique (IRM) multiparamétrique d'un GBM _____ *14*

Figure 2 : Aspect histologique typique d'un GBM _____ *15*

Figure 3 : Comparaison des classifications des gliomes de 2016 et 2020 reposant sur des critères histologiques et moléculaires _____ *17*

Figure 4 : Schéma représentatif du modèle hiérarchique des cellules souches cancéreuses par rapport au modèle stochastique de la tumorigenèse _____ *23*

Figure 5 : Organisation multi-échelle des trois principaux réseaux du cytosquelette : actine, microtubules et filaments intermédiaires _____ *34*

Figure 6 : Structure et dynamique des microtubules _____ *36*

Figure 7 : Organisation moléculaire de la migration cellulaire : polarité front–arrière et dynamique des protrusions et de la rétraction _____ *41*

Figure 8 : Plasticité des modes de migration tumorale : transition EMT–amiboïde et caractéristiques des cellules cancéreuses amiboïdes _____ *47*

Figure 9 : Organisation des complexes d'adhésion focale et couplage intégrines–cytosquelette d'actine _____ *50*

Figure 10 : ETM/MET, plasticité phénotypique au cours de la dissémination tumorale _____ *55*

Figure 11 : Voies de signalisation et contrôle du cycle cellulaire dans le glioblastome _____ *70*

Figure 12 : Principales voies de signalisation oncogéniques et leurs interconnexions dans le glioblastome _____ *73*

Figure 13: Organisation cellulaire dans un organoïde cérébral _____ *89*

Figure 14: Localisation chromosomique et structure génique et protéique de JMY _____ *101*

Figure 15 : Régulation du transport nucléaire de JMY par l'actine et les importines _____ *109*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Données épidémiologiques et pronostic du glioblastome chez l'adulte *12*

Tableau 2 : Principaux facteurs de risque impliqués dans la survenue des gliomes *12*

Tableau 3 : Altérations moléculaires majeures du GBM et leurs conséquences biologiques et cliniques *18*

Tableau 4 : Comparaison des stratégies d'hyperfractionnement et d'hypofractionnement en radiothérapie du GBM ... *29*

Tableau 5 : Principaux signaux du microenvironnement impliqués dans la régulation de l'invasion et de la migration des cellules de glioblastome *40*

Tableau 6: Voies de signalisation impliquées dans l'invasion des cellules de GBM *56*

Tableau 7 : Principales voies de signalisation impliquées dans l'invasion, la plasticité et la résistance thérapeutique des cellules de glioblastome et des CSG *73*

Tableau 8 : Principales voies de signalisation impliquées dans la progression du glioblastome et le maintien des CSG .. *77*

Tableau 9: Modèles d'organoïdes cérébraux humains : stratégies de patterning et diversité cellulaire *91*

Tableau 10 : Modèles de co-culture glioblastome–organoïdes cérébraux (GLICO et dérivés) : avancées expérimentales, applications et limites *97*

Tableau 11 : Comparaison structurale et fonctionnelle des principaux membres de la famille WASP impliqués dans la régulation de l'actine *103*

LISTE DES ABREVIATIONS

R3R : Remplacer, Reduction, Raffinement (principe éthique en expérimentation animale)
A2B5 : antigène de surface glial (ganglioside)
ABC : ATP-Binding Cassette
ABCB1 : ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1
ABCG2 : ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2
AMP : Adénosine Monophosphate
APC : Astrocyte Progenitor Cells
Arp2/3 : Actin-Related Protein 2/3 Complex
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP : Adénosine Triphosphate
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
BLBP : Brain Lipid-Binding Protein
Ca2+ : Ion calcium
CBP : CREB-Binding Protein
CD133 : Cluster of Differentiation 133
CD15 / SSEA : Stage-Specific Embryonic Antigen
CD4 : Cluster of Differentiation 4
CD8 : Cluster of Differentiation 8
CHK1 : Checkpoint Kinase 1
CHK2 : Checkpoint Kinase 2
CSG : Cellules Souches de Glioblastome
CSN : Cellules Souches Neurales
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
Cx43 : Connexin 43
CXCL12 : C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
CXCR4 : C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
E2F1: E2F Transcription Factor 1
EOR : Extent Of Resection
FLAIR : Fluid Attenuated Inversion Recovery
GAP43 : Growth Associated Protein 43
GBM : Glioblastome
GBO : Glioblastoma Organoid
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
GLAST : Glutamate Aspartate Transporter
GLICO : GLIoblastoma Cerebral Organoid
GPC : Glial Progenitor Cells
Gy : Gray
HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HER3 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 3
HERV-K (HML-2) : Human Endogenous RetroVirus K
HIF1α : Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha
ICWs : Intercellular Calcium Waves
IDH : Isocitrate Dehydrogenase
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
JMY : Junction-Mediating and regulatorY protein
JNK : c-Jun N-terminal Kinase
KPS : Karnofsky Performance Status
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MDM2 : Mouse Double Minute 2 homolog
MET : Mesenchymal-Epithelial Transition factor
MGMT : O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
miARN : microARN
MT : Microtube Tumoral
NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule
NF-κB : Nuclear Factor kappa B
NGF : Nerve Growth Factor
NLGN3 : Neuroligin-3
NeoCOR : Neoplastic Cerebral Organoid
NPC : Neural Progenitor Cells
OCT4 : Octamer-binding Transcription Factor 4
Olig2 : Oligodendrocyte Transcription Factor 2
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OPC : Oligodendrocyte Progenitor Cells
PARN : Poly(A)-Specific Ribonuclease
PD-1 : Programmed Cell Death-1
PDGFRA : Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha
PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog
RMS : Rostral Migratory Stream
ROS : Reactive Oxygen Species
RPL34 : Ribosomal Protein L34
RPS11 : Ribosomal Protein S11
RPS20 : Ribosomal Protein S20
RPS6 : Ribosomal Protein S6
RTK : Receptor Tyrosine Kinase
SGZ : Subgranular Zone
Shh : Sonic Hedgehog
SNC : Système Nerveux Central
SOX2 : SRY-Box Transcription Factor 2

STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3
STRAP : Serine-Threonine Kinase Receptor-Associated Protein
SVZ : Subventricular Zone
T1 : pondération T1
T1CE : T1 avec injection de contraste
T2 : pondération T2
TERT : Telomerase Reverse Transcriptase
TFPI2 : Tissue Factor Pathway Inhibitor 2
TNT : Tunneling Nanotube
TMZ : Témozolomide
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VZ : Ventricular Zone
WASP : Wiskott–Aldrich Syndrome Protein
WAVE : WASP-family Verprolin-homologous protein
WH2 : WASP Homology 2 domain
WHAMM : WASP Homolog Associated with Actin, Membranes and Microtubules
Wnt : Wingless/Integrated signaling pathway
ZO-1 : Zonula Occludens-1
ZO-2 : Zonula Occludens

INTRODUCTION

1. CSN, PROGENITEURS NEURAUX ET MIGRATION

1.1 Définition et propriétés des cellules souches neurales (CSN)

1.1.1 Multipotence et auto-renouvellement

Les cellules souches neurales (CSN) se caractérisent par leur capacité d'auto-renouvellement et leur multipotence, leur permettant de générer neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Duan et al., 2008 ; Terskikh et al., 2006). Issues de l'ectoderme, elles occupent une position hiérarchique précoce, assurant à la fois le maintien du compartiment souche et la production des lignées neurales au cours du développement (Kriegstein et Alvarez-Buylla, 2009 ; Ma et al., 2009). Ces propriétés persistent après la naissance et forment la base de la neurogenèse postnatale chez les mammifères (Grandel et al., 2006 ; Ming et Song, 2011). L'idée défendue au début au 20e siecle par Ramón y Cajal selon laquelle le cerveau adulte était incapable de générer de nouveaux neurones a depuis été revue. En effet, dans les années soixante, les travaux d'Altman ont pu démontrer la présence d'une neurogenèse dans le cerveau adulte de rat notamment au niveau de l'hippocampe et du bulbe olfactif (Altman et Das, 1965). Ce processus désormais bien établi chez les mammifères, y compris chez l'humain, reste cependant limité à des niches spécifiques dans lesquelles sont retrouvées des cellules souches neurales (CSN) et des cellules progénitrices neurales (ou progéniteurs neuraux ; NPC ; Ming et Song, 2011 ; Gage et Temple, 2013).

L'auto-renouvellement des CSN repose majoritairement sur des divisions asymétriques qui permet donner une cellule souche et une cellule progénitrice neurale engagée vers la différenciation (Knoblich, 2008 ; Jurkowski et al., 2020). Ce mécanisme de division asymétrique permet de maintenir l'équilibre entre le maintien du pool de cellules souches et la production de progéniteurs (Ramalho-Santos et Willenbring, 2007 ; Sun et al., 2021 ; Duan et al., 2008 ; Morrison et Kimble, 2006). Les mécanismes mis en place dans ces phénomènes de divisions sont bien entendu influencés par le microenvironnement de la niche, *via* des signaux transmis par les cellules voisines et par la

matrice extracellulaire, qui va permettre d'orienter le destin des cellules filles (Kazanis et ffrench-Constant, 2011 ; Valamparamban et Spéder, 2023).

La multipotence des CSN se manifeste par la production de progéniteurs neuraux intermédiaires capables de donner eux-mêmes naissance aux différents types cellulaires retrouvés dans un cerveau adulte. Ces progéniteurs intermédiaires sont capables de s'auto renouveler mais de manière plus limitée que les CSN (Okano et Temple, 2009 ; Ma et al., 2009). Au cours du développement cérébral une neurogenèse précoce (production de neurones) précède la gliogenèse (production de cellules gliales comprenant les astrocytes et les oligodendrocytes), traduisant une restriction progressive du potentiel différenciatif (Okano et Temple, 2009). Chez l'adulte, cette multipotence persiste de manière plus contrainte dans des niches spécialisées, contribuant au renouvellement neuronal et glial, à l'homéostasie et à la réponse aux lésions (Ming et Song, 2005 ; Encinas et Fitzsimons, 2017 ; Gage et Temple, 2013 ; Magavi et al., 2000 ; Devesa et al., 2014). Cette plasticité, centrale en médecine régénérative, comporte néanmoins un risque de transformation tumorale en cas de dérégulation (Matarredona et Pastor, 2019 ; Mousaei Ghasroldasht et al., 2022).

1.1.2 Localisation des CSN dans le cerveau adulte

Chez l'adulte, les CSN sont restreintes à des niches neurogéniques définies, retrouvées principalement dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) et la zone sous-granulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe (Carlén et al., 2002 ; Gonçalves et al., 2016). Cette organisation spatiale restreinte reflète un contrôle étroit de la neurogenèse adulte par le microenvironnement au sein d'unités fonctionnelles complexes, associant CSN, progéniteurs, cellules en différenciation, et cellules de soutien (endothéliales, microglie et populations gliales ; Kazanis et Ffrench-Constant, 2011 ; Matarredona et Pastor, 2019 ; Valamparamban et Spéder, 2023). La SVZ, principale niche neurogénique adulte, présente une organisation cytoarchitecturale structurée et fortement vascularisée autour des CSN (Alvarez-Buylla et García-Verdugo, 2002 ; Kazanis etFfrench-Constant, 2011). Ces cellules, de phénotype glial (GFAP, GLAST et BLBP), sont polarisées avec un pôle apical en contact avec le liquide céphalo-rachidien, et un pôle basal associé aux vaisseaux sanguins, qui leur permet d'intégrer des signaux issus à la fois du compartiment vasculaire et du milieu ventriculaire (Jurkowski et al., 2020 ; Abdissa et al., 2020 ; Sun et al., 2022). Ces cellules souches

vont générer des progéniteurs neuraux qui, eux-mêmes, se différencient en neuroblastes en migrant *via* le rostral migratory stream (RMS) vers le bulbe olfactif, où ils se différencient majoritairement en interneurones impliqués dans le traitement de l'information olfactive (Curtis et al., 2007 ; Lledo et al., 2006 ; Paß et al., 2020 ; Chen et al., 2023).

Dans l'hippocampe, la neurogenèse adulte est restreinte à la SGZ du gyrus denté (Ehninger et Kempermann, 2008 ; Abdissa et al., 2020) qui présente elle aussi une vascularisation importante et une organisation adaptée au contrôle de la prolifération et de la différenciation des CSN (Matarredona et Pastor, 2019). Les cellules souches hippocampiques, cellules radiales GFAP+ majoritairement quiescentes, génèrent des progéniteurs intermédiaires prolifératifs, puis des neuroblastes, qui maturent en neurones granulaires pour s'intégrer dans les circuits hippocampiques préexistants (Kempermann, 2022 ; Encinas et Fitzsimons, 2017 ; Kozareva et al., 2019). Ainsi, la SGZ aussi bien que la SVZ illustrent que le maintien des CSN à la fois restreint spatialement et stratégiquement organisé, est sous le contrôle déterminant du microenvironnement local (Kazanis et ffrench-Constant, 2011 ; Matarredona et Pastor, 2019). Contrairement à la SVZ, cette neurogenèse hippocampique soutient un remodelage local des réseaux impliqués dans les fonctions cognitives et émotionnelles. Plusieurs travaux s'appuyant sur des expériences de formation de neurosphères et sur des analyses histologiques ont suggéré l'existence d'une activité neurogénique bien plus limitée (en comparaison a la SVG et à la SGZ) dans d'autres régions du cerveau adulte comme le striatum, le cortex, l'amygdale ou encore la substantia nigra (Curtis et al., 2012). Néanmoins, la portée fonctionnelle de ces sites reste encore débattue.

1.1.3 Rôle physiologique dans la neurogenèse et l'homéostasie

Les CSN jouent un rôle central dans la neurogenèse adulte et le maintien de l'homéostasie cérébrale, assurant un renouvellement cellulaire limité dans un tissu majoritairement post-mitotique (Ming et Song, 2011 ; Gage et Temple, 2013). Dans l'hippocampe, les neurones issus de la SGZ contribuent à l'apprentissage et à la mémoire grâce à une excitabilité et une plasticité synaptique accrues lors de leur maturation, favorisant leur intégration progressive du stade de neuroblaste à neurone mature, ce qui conditionne leur impact sur les fonctions cognitives (Kronenberg et al., 2003 ; Ming et Song, 2011 ; Encinas et Fitzsimons, 2017 ; Kozareva et al., 2019 ; Kempermann, 2022).

Dans le bulbe olfactif, la neurogenèse issue de la SVZ assure le renouvellement des interneurones impliqués dans le traitement de l'information olfactive et dans la plasticité des circuits sensoriels *via* l'intégration des neuroblastes qui établissent de nouvelles connexions synaptiques avec les neurones de projection (Alvarez-Buylla et García-Verdugo, 2002 ; Lledo et al., 2006 ; Curtis et al., 2007 ; Sakamoto et al., 2014 ; Paß et al., 2020 ; Chen et al., 2023). Ce renouvellement cellulaire soutient la plasticité du système olfactif (Okano et Sawamoto, 2008 ; Bonafina et al., 2020 ; Jurkowski et al., 2020). Contrairement à l'hippocampe, la neurogenèse issue de la SVZ alimente un circuit distant sensoriel, illustrant la diversité des rôles physiologiques des CSN selon leur niche d'origine (Zhao et al., 2006 ; Ghosh, 2019).

Plus largement, l'activité des CSN est régulée par des facteurs intrinsèques et extrinsèques, et peut être modulée par divers stimuli, contribuant au renouvellement cellulaire en conditions physiologiques (vieillissement) ou pathologiques (neurodégénératives) (Gould, 2007 ; Horgusluoglu et al., 2017 ; Matsubara et al., 2021 ; Magavi et al., 2000 ; Devesa et al., 2014 ; Finkel et al., 2021). Ce potentiel reste cependant dépendant du microenvironnement de la niche, dont la perturbation peut compromettre l'homéostasie cérébrale et favoriser des pathologies, notamment neurodégénératives ou tumorales (Kazanis et ffrench-Constant, 2011 ; Matarredona et Pastor, 2019 ; Gage et Temple, 2013). Dans cette perspective, les CSN apparaissent comme des acteurs essentiels de la plasticité et de la réparation, mais aussi comme des cellules dont la dérégulation peut engager le cerveau sur des trajectoires pathologiques.

1.2 Régulation des CSN et mécanismes moléculaires implicites

1.2.1 Voies moléculaires régulant les CSN

La régulation des CSN adultes repose sur l'intégration de signaux intrinsèques et extrinsèques issus de la niche, qui contrôlent l'équilibre entre quiescence, prolifération et différenciation (Balu et Lucki, 2009 ; Encinas et Fitzsimons, 2017 ; Matsubara et al., 2021). Parmi ces voies, Sonic hedgehog (Shh) joue un rôle central, notamment dans la SVZ. Des études menées chez la souris ont montré que toute altération de son activité perturbe la neurogenèse adulte, soulignant son importance dans le

contrôle des CSN (Jin et al., 2003). Au-delà de l'homéostasie, Shh participe également aux réponses aux lésions cérébrales, notamment dans les processus de réparation et de régénération. Par exemple, l'administration d'un agoniste de Smoothened favorise la récupération fonctionnelle et la neurogenèse après un AVC chez la souris (Gonzalez-Reyes et al., 2019). La voie Wnt constitue un autre régulateur majeur de la neurogenèse, notamment hippocampique, en contrôlant la prolifération des CSN, la production de progéniteurs intermédiaires et l'engagement neuronal (Horgusluoglu et al., 2017 ; Curtis et al., 2012). Son activation dans la SVZ comme dans la SGZ favorise une expansion du compartiment progéniteur par la stimulation de la neurogenèse (Curtis et al., 2012). Au contraire, la voie Notch maintient l'état souche et le réservoir de CSN. Dans le gyrus denté, Notch1, un récepteur de la voie Notch, est indispensable au maintien des cellules souches et progénitrices, et sa perturbation modifie l'équilibre entre auto-renouvellement et différenciation (Ables et al., 2010). Dans la SVZ, son interaction avec la voie de l'EGFR contribue à ajuster la taille du compartiment des cellules souches et des progéniteurs (Aguirre et al., 2010 ; Curtis et al., 2012). La complémentarité entre Notch, qui maintient la quiescence, et des voies pro-activatrices comme Wnt et Shh illustre l'équilibre existant entre stabilité et activation au sein des niches neurogéniques adultes.

1.2.2 Interactions avec la niche neurogénique

La régulation des CSN dépend de leur niche et varie selon les territoires neurogéniques (SVZ et SGZ) ainsi que du contexte physiologiques ou pathologiques (Gould, 2007 ; Horgusluoglu et al., 2017). Des facteurs environnementaux, comme l'enrichissement du milieu, l'exercice physique ou l'alimentation, stimulent la neurogenèse hippocampique alors qu'au contraire, le vieillissement, l'inflammation chronique ou le stress prolongé la réduisent (Gould, 2007). Ces données soulignent la dépendance des CSN à l'état physiologique global de l'organisme. La voie VEGF (vascular endothelial growth factor) régule les CSN en lien étroit avec la niche vasculaire, en contrôlant leur prolifération, leur survie, leur migration et la maturation des progéniteurs neuraux (Wittko et al., 2009). Sa forte expression dans les régions neurogéniques suggère une contribution directe à la neurogenèse (Schänzer et al., 2004). Les facteurs neurotrophiques constituent une autre composante essentielle de la niche. Des molécules tels que le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) ou le NGF (Nerve Growth Factor), régulent la survie, la prolifération et la différenciation des

progéniteurs neuraux. Elles sont notamment produites par les cellules endothéliales, et soutiennent la neurogenèse adulte (Hussain et al., 2024). Ainsi, la niche neurogénique intègre des signaux vasculaires, trophiques et systémiques pour réguler finement le comportement des CSN.

1.2.3 Plasticité et différenciation

Ces signaux de la niche, incluant notamment les voies Shh, Wnt et Notch, s'intègrent dans un continuum dynamique qui régule la plasticité des CSN, de la quiescence à la différenciation. Les voies Shh et Wnt favorisent leur activation, tandis que Notch maintient le réservoir de cellules souches. Les signaux issus de la niche, dont le VEGF et les facteurs neurotrophiques tels que le BDNF, le NGF et le NT-3 (Neurotrophin-3), modulent finement leur prolifération, leur survie et leur engagement différenciatif. Dès lors, la régulation des CSN adultes repose sur un réseau de signaux interconnectés (Shh, Wnt, Notch, VEGF et facteurs neurotrophiques) ajustant l'équilibre entre quiescence, prolifération et différenciation (Gould, 2007 ; Horgusluoglu et al., 2017 ; Matsubara et al., 2021). Lorsque cet équilibre est altéré (vieillissement, inflammation, pathologies), la neurogenèse adulte est perturbée, révélant la plasticité des CSN et leur dépendance à ces mécanismes de régulation qui les contrôlent.

1.3. Migration des progéniteurs neuraux

1.3.1 Mécanismes cellulaires de migration

La migration des progéniteurs neuraux de la SVZ est un processus central de la neurogenèse adulte. Les progéniteurs neuraux (et les neuroblastes) dérivés des CSN migrent le long du rostral migratory stream (RMS) vers le bulbe olfactif, où ils se différencient en interneurones fonctionnels (Lois et Alvarez-Buylla, 1994 ; Doetsch et al., 1999 ; Alvarez-Buylla et Garcia-Verdugo, 2002). Cette migration collective s'effectue en chaîne, les neuroblastes progressant en groupes au sein d'un tunnel glial astrocytaire, qui guide et stabilise leur déplacement (Doetsch et al., 1997 ; Kaneko et Sawamoto, 2009 ; Kaneko et al., 2017). Cette migration repose sur des interactions cellule–cellule médiées par des molécules d'adhésion, incluant notamment la Neural Cell Adhesion Molecule, dont la polysialylation (PSA-NCAM) réduit l'adhérence et favorise la mobilité des neuroblastes (Cremer et

al., 1994), mais également les intégrines, les cadhérines (en particulier N-cadhérine) et des molécules de la famille L1-CAM, qui participent à l'adhésion dynamique et au guidage migratoire. La migration est aussi contrôlée par des gradients chimiotactiques, notamment l'axe CXCL12/CXCR4 qui dirige les neuroblastes le long du RMS (Imitola et al., 2004 ; Kokovay et al., 2010). Des signaux répulsifs Slit/Robo, et d'autres systèmes de guidance (éphrines/Eph et les sémaphorines) contribuent également à l'orientation de cette migration (Wu et al., 1999 ; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004 ; Bagri et al., 2003). Ainsi, la migration des neuroblastes repose sur des mécanismes coordonnés associant migration collective, interactions cellule-cellule et signaux de guidance.

1.3.2 Cytosquelette et polarisation cellulaire

La migration des progéniteurs neuraux et des neuroblastes repose sur une dynamique du cytosquelette (actine, microtubules), avec un cycle migratoire impliquant l'extension d'un prolongement leader, la translocation du centrosome puis une nucléokinèse (Tsai et al., 2005 ; Bellion et al., 2005). Ces étapes reposent sur une coordination fine entre les réseaux d'actine et de microtubules régulée par les Rho GTPases (Rac1, Cdc42 et RhoA), qui contrôlent la polarité et la dynamique du cytosquelette (Govek et al., 2005). Rac1 et Cdc42 favorisent la formation de lamellipodes et filopodes au front migratoire, tandis que RhoA régule la contractilité actomyosine nécessaire à la translocation cellulaire (Hall et Lalli, 2010). Des protéines associées aux microtubules (LIS1, DCX, dynein) contrôlent la nucléokinèse en régulant le déplacement nucléaire et l'organisation des microtubules (Gleeson et al., 1999 ; Tsai et Gleeson, 2005).

1.3.3 Interaction avec la matrice extracellulaire

Les interactions avec le microenvironnement sont essentielles à la migration des progéniteurs neuraux. Des molécules d'adhésion (intégrines, N-cadhérine, β1-intégrine) assurent l'ancrage transitoire au substrat extracellulaire, constitué notamment de laminine, fibronectine, collagènes et protéoglycanes, ainsi qu'aux astrocytes du RMS, permettant une progression coordonnée (Murase et Horwitz, 2002 ; Belvindrah et al., 2007). Les vaisseaux sanguins servent de support migratoire et de guide physique aux progéniteurs neuraux (Bovetti et al., 2007 ; Tavazoie et al., 2008). Les cellules endothéliales et astrocytaires sécrètent des facteurs (VEGF, BDNF, Shh, Wnt) qui modulent la motilité, la survie et la différenciation des progéniteurs neuraux (Paredes et al., 2018 ;

Goldberg et al., 2010 ; Gonçalves et al., 2016). Ainsi, la migration des progéniteurs neuraux et des neuroblastes résulte de l'intégration de signaux de la matrice extracellulaire, assurant un déplacement dirigé pour une intégration finale fonctionnelle.

1.4 Rôle de cellules souches neurales dans la gliomagenèse : origine et dérégulation

1.4.1 Origine des glioblastome : implication des cellules souches neurales

L'hypothèse selon laquelle les CSN pourraient représenter les cellules d'origine potentielles de glioblastomes s'est progressivement imposée, à la croisée des données issues de la biologie du développement, de la neurogenèse adulte et des modèles expérimentaux de tumorigenèse cérébrale (Matarredona et Pastor, 2019 ; Lee et al., 2018).

Les CSN possèdent des propriétés distinctes des cellules neurales différenciées, notamment une capacité d'auto-renouvellement à long terme associée à un fort potentiel prolifératif, susceptibles de favoriser l'accumulation progressive d'altérations génétiques au fil du temps et, dès lors, leur transformation oncogénique (Walcher et al., 2020 ; Duan et al., 2015). Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'initiation du GBM repose sur l'accumulation d'événements oncogéniques, souvent liés à des erreurs de réplication de l'ADN, ce qui positionne les CSN comme des candidates privilégiées (Walcher et al., 2020). La modification de voies clés du GBM dans des CSN ou des progéniteurs neuraux adultes suffit à induire des astrocytomes malins, contrairement aux cellules différenciées, suggérant qu'une accumulation de divisions successives favorise l'émergence tumorale (Zhu et al., 2005 ; Tomasetti et al., 2017 ; Lee et al., 2018 ; Almengló et al., 2021).

Chez l'humain, des tissus apparemment normaux de la SVZ peuvent porter des mutations caractéristiques du GBM, identiques à celles des tumeurs, et des CSN mutées issues de cette niche sont capables d'initier des gliomes à distance, soutenant le rôle de la SVZ comme réservoir de cellules initiatrices (Lee et al., 2018). Ces données, associées aux similitudes phénotypiques et fonctionnelles entre les CSN de la SVZ et les cellules souches de glioblastome (CSG), suggèrent que les CSN de la SVZ pourraient être plus sensibles à une transformation oncogénique que celles de la

SGZ hippocampique (Matarredona et Pastor, 2019). Des études ont montré que des astrocytes différenciés, après reprogrammation et altérations génétiques, peuvent acquérir un potentiel tumorigène et donner naissance à des gliomes de haut grade (Friedmann-Morvinski et al., 2012 ; Friedmann-Morvinski et Verma, 2014). Néanmoins, ces modèles ciblent souvent des populations exprimant la GFAP, ce qui n'exclut pas l'implication de progéniteurs gliaux. Ces résultats soutiennent l'existence de cellules d'origine multiples, avec un rôle majeur des cellules souches et progénitrices dans l'initiation des gliomes de haut grade (Matarredona et Pastor, 2019 ; Walcher et al., 2020).

1.4.2 Dérégulation des cellules souches neurales et acquisition d'états de type cellule souche de glioblastome

Les CSG ont des propriétés proches des CSN, notamment leur capacité d'auto-renouvellement, leur capacité de différenciation et leur potentiel d'initiation tumorale, suggérant que la gliomagenèse pourrait résulter en partie d'une dérégulation des équilibres entre quiescence, prolifération et différenciation des CSN (Singh et al., 2003 ; Gimple et al., 2019 ; Matarredona et Pastor, 2019).

Les cellules tumorales présentent une forte plasticité, pouvant alterner entre états différenciés et immatures sous l'effet de contraintes génétiques, épigénétiques et microenvironnementales, permettant à des cellules différenciées de réacquérir des caractéristiques de type souche et de maintenir le compartiment CSG (Buruiana et al., 2025 ; Walcher et al., 2020 ; Iwadate et al., 2018 ; Safa et al., 2015). Cette dynamique, incompatible avec une organisation strictement hiérarchique, rapproche les CSG des CSN, notamment par l'expression de marqueurs communs (CD133, nestine, SOX2, OCT4, NANOG), dont la spécificité reste débattue (He et al., 2023 ; Hattermann et al., 2016 ; Pasqualetti et al., 2023 ; Seymour et al., 2015).

Plus récemment, les approches de séquençage unicellulaire et d'analyse du paysage ribosomal ont révélé, au sein des CSG, des signatures transcriptionnelles et traductionnelles spécifiques, notamment un enrichissement en protéines ribosomales (RPS6, RPL34, RPS11 ou RPS20). Ces profils traduisent une reprogrammation translationnelle liée à la survie, à la résistance thérapeutique et à la plasticité tumorale (Arce et al., 2026 ; Miller et al., 2023 ; Hide et al., 2022 ; Benelli et al., 2026).

Enfin, la dérégulation du microenvironnement constitue un élément important dans la transition CSN vers CSG. En effet, les altérations de la niche qu'elles soient d'origine vasculaire inflammatoire, matricielle ou liées aux interactions cellulaires favorisent l'émergence et le maintien d'états tumoraux immatures (Matarredona et Pastor, 2019). Dès lors, la gliomagenèse peut être envisagée comme le détournement progressif des programmes de plasticité des CSN vers des états pathologiques conservant un caractère souche qui joue un rôle central dans l'agressivité du GBM.

2. GLIOBLASTOME ET CELLULES SOUCHES DE GLIOBLASTOME

2.1 Généralités

Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur cérébrale primitive la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte (Tan AC et al., 2020). Il est caractérisé par une croissance cellulaire rapide et anarchique, une infiltration diffuse du parenchyme cérébral, une angiogenèse marquée et une forte instabilité génomique (Louis et al., 2021 ; Wen et Kesari, 2008). Souvent associées à de nombreuses altérations génétiques et/ou épigénétiques, ces tumeurs sont très hétérogènes autant d'un point de vue moléculaire que cellulaire (d'où son appellation glioblastome multiforme).

Plusieurs types cellulaires pourrait être à l'origine de ces tumeurs : les cellules souches neurales (voir le chapitre 1.4.2), ou une origine plus gliale comprenant les progéniteurs oligodendrocytaires et de manière plus rare des astrocytes qui auraient la possibilité de se dédifférencier (Sojka et al., 2024). La cellule d'origine serait en plus dépendant du contexte moléculaire et des altérations génétiques.

2.1.1. Epidémiologie

Le GBM représente environ 14 % des tumeurs cérébrales primitives et près de la moitié des formes primitives malignes, occupant ainsi une place prédominante parmi l'ensemble des gliomes (Ostrom et al., 2023). Sur le plan épidémiologique, son incidence est évaluée à 3,3 cas pour 100 000 habitants en France comme aux États-Unis (Ostrom et al., 2023). L'âge médian au moment du diagnostic se situe autour de 65 ans. Par ailleurs, cette pathologie touche plus fréquemment les hommes, avec un sex-ratio d'environ 1,5 en faveur du sexe masculin. La médiane de survie globale en population (tous patients confondus) est d'environ 10 mois (Woehrer et al., 2014) alors que la survie à 5 ans est de 7 % (Ostrom et al., 2023).

L'ensemble de ces données épidémiologiques ont été regroupé dans le tableau 1.

Caractéristique	Description	Références
Proportion	~14 % des tumeurs cérébrales primitives ~50 % des formes malignes	Ostrom et al., 2023
Incidence	~3,3 cas / 100 000 habitants (France et États-Unis)	Ostrom et al., 2022
Âge médian	Environ 65 ans au diagnostic	Ostrom et al., 2022
Sex-ratio	~1,5 en faveur des hommes	Ostrom et al., 2022
Survie médiane	~ 10 mois	Woehrer et al., 2014
Survie à 5 ans	~ 7 %	Ostrom et al., 2022

Tableau 1 : Données épidémiologiques et pronostic du glioblastome chez l'adulte

2.1.2 Facteurs de risques

Même si, l'âge, le sexe masculin et l'ethnie semblent être des facteurs contributifs, il n'existe aujourd'hui que peu de facteurs de risques avérés dans la survenue des gliomes. Ces derniers demeurent de plus en grande partie mal caractérisés (Hanif et al. 2017).

Dans un souci de synthèse et de clarté, j'ai résumé les principaux facteurs de risque impliqués dans la survenue des gliomes dans le tableau 2.

	Facteurs de risque	Description / mécanisme	Niveau de preuve	Références
Génétiques / familiaux	Neurofibromatose de type 1 (NF1), syndrome de Li-Fraumeni (TP53), syndrome de Lynch (MSH2, MLH1, MSH6, PMS2), syndrome de Turcot (MLH1, PMS2), polypose adénomateuse familiale (APC, MMR)	Syndromes héréditaires de prédisposition aux cancers liés à des altérations de gènes suppresseurs de tumeur ou de réparation de l'ADN ; contribution globale faible (~cas rares, souvent chez sujets jeunes)	Établi (rare)	Ostrom et al., 2014 ; 2019
	Polymorphismes (TERT, RTEL1, CDKN2B-AS1)	Variants associés à la maintenance des télomères et au contrôle du cycle cellulaire	Modéré	Ostrom et al., 2019
	Formes familiales	~5 % des cas de gliomes	Rare	van Opijnen et al., 2025
Rayonnements ionisants	Radiothérapie, exposition nucléaire	Induction de dommages à l'ADN, effet dose-dépendant avec latence prolongée	Fort	Casey et al., 2024 Brenner et al., 2020
Environnement	Expositions professionnelles (pesticides, solvants)	Données hétérogènes, rôle non clairement établi	Limité / incertain	Samkange-Zeeb et al., 2010
	Nitrosourées / nitrosoguanidines	Reconnu comme maladie professionnelle (GBM)	Établi (contextuel)	INRS
Infectieux	Cytomégalovirus humain (HCMV)	Effets oncomodulateurs : prolifération, angiogenèse, reprogrammation cellulaire	Débattu	Cobbs et al., 2002 El Baba et al., 2023
Facteurs débattus	Champs électromagnétiques (téléphones)	Absence d'association significative avec le risque de gliome	Faible / non démontré	Schüz et al., 2022 Karipidis et al., 2024

Tableau 2 : Principaux facteurs de risque impliqués dans la survenue des gliomes

Synthèse des principaux facteurs de risque des gliomes. Les prédispositions génétiques incluent des syndromes héréditaires de susceptibilité aux cancers (neurofibromatose de type 1, syndrome de Li-Fraumeni, syndrome de Lynch, syndrome de Turcot, polypose adénomateuse familiale) ainsi que des formes familiales rares. Les facteurs

environnementaux, notamment les expositions professionnelles, présentent des niveaux de preuve hétérogènes. Le cytomégalovirus humain (HCMV) est proposé comme facteur oncomodulateur potentiel, bien que son rôle causal demeure débattu comme pour les champs éléctromagnétique. Le niveau de preuve est indiqué pour chaque catégorie sur la base des données disponibles dans la littérature.

2.2 Evaluation, diagnostique et classification du GBM

La prise en charge du GBM requiert une évaluation rapide en raison de son évolution agressive. Les symptômes initiaux, incluant céphalées atypiques, déficit neurologique focal, crises épileptiques ou troubles cognitifs, doivent conduire sans délai à une IRM cérébrale. Parallèlement, l'état général du patient est évalué à l'aide du score de Karnofsky Performance Status (KPS) ou de l'indice de performance, qui mesurent le degré d'autonomie fonctionnelle et la capacité à réaliser les activités quotidiennes. Ces échelles permettent d'orienter la stratégie thérapeutique et de fournir une première estimation pronostique (Królikowska et al., 2025). Ces tests sont également utilisés pour sélectionner les patients pour des essais cliniques. Les examens histologiques et les analyses moléculaires sont généralement effectués à partir du tissu tumoral obtenu après la résection chirurgicale lorsqu'elle est possible ou d'une biopsie par stéréotaxique si la résection n'est pas possible. Ces analyses permettent de classifier la tumeur et d'orienter le traitement thérapeutique (Gough et al., 2025).

2.2.1 Diagnostic par imagerie IRM

Le diagnostic initial du glioblastome repose principalement sur l'imagerie cérébrale, en particulier l'imagerie par résonance magnétique (IRM), qui constitue la modalité de référence pour la détection et la caractérisation des gliomes. Les protocoles d'IRM incluent généralement des séquences T1, T2 et FLAIR, souvent associées à l'injection d'un agent de contraste permettant de visualiser les zones d'hypervascularisation tumorale (Kwiatkowska-Miernik et al., 2023 ; Figure 1). Les techniques d'IRM avancées, telles que l'imagerie de diffusion, la perfusion ou la spectroscopie par résonance magnétique, apportent des informations complémentaires sur la cellularité, la vascularisation et le métabolisme tumoral, contribuant ainsi à améliorer la caractérisation du glioblastome et la planification thérapeutique (Shukla et al., 2017 ; Bernstock et al., 2022 ; Martucci et al., 2023).

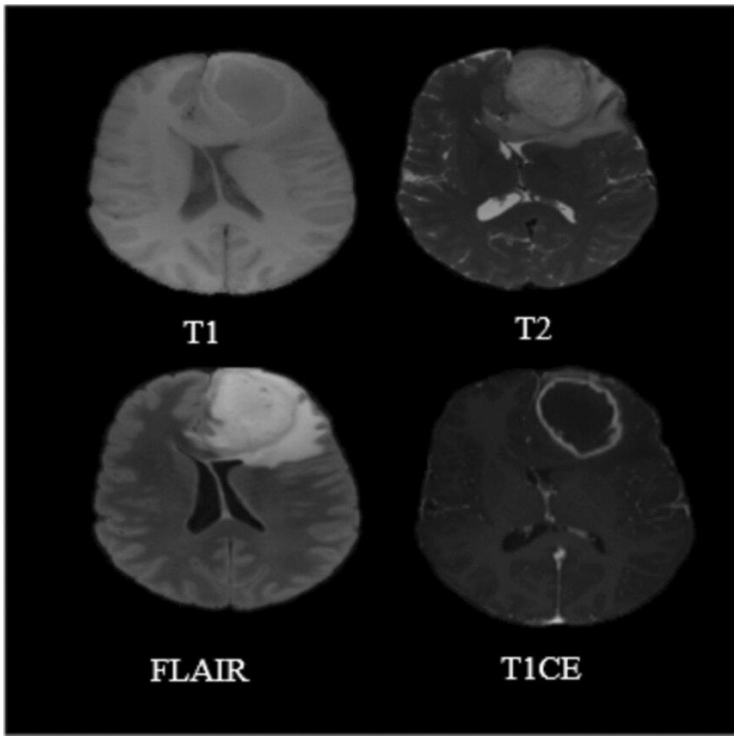


Figure 1 : Imagerie par résonance magnétique (IRM) multiparamétrique d'un GBM

Exemples d'images IRM cérébrales illustrant les différentes séquences utilisées dans le diagnostic des glioblastomes. La séquence T1 met en évidence la morphologie globale de la lésion. La séquence T2 révèle l'hyperintensité tumorale associée à l'œdème périlésionnel. La séquence FLAIR permet de mieux visualiser l'infiltration tumorale et l'œdème dans le parenchyme cérébral environnant. Enfin, la séquence T1 avec injection de contraste (T1CE) met en évidence un rehaussement annulaire caractéristique, lié à la rupture de la barrière hémato-encéphalique et à la vascularisation tumorale, fréquemment observé dans les glioblastomes (d'après Samartha et al., 2024).

Les données obtenues, entre autres, par IRM ont permis de déterminer les localisations préférentielles des tumeurs au niveau cérébral. Ainsi, les gliomes de l'adulte siègent préférentiellement au niveau des hémisphères cérébraux avec 61 % de tous les gliomes primaires se produisant dans les quatre lobes du cerveau : frontal (25 %), temporal (20 %), pariétal (13 %) et occipital (3 %) (Davis ME et al., 2016). Le pronostic est directement lié à leur degré de différenciation (de bénin, grade I à malin, grade IV). Ils sont infiltrants et le plus souvent de haut grade, le plus fréquent étant le glioblastome, classé grade IV par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

2.2.2 Histopathologie

Le GBM se caractérise histologiquement par une forte cellularité et un polymorphisme cellulaire marqué, reflétant son agressivité et son hétérogénéité morphologique et génétique. Les cellules

néoplasiques présentent fréquemment des noyaux irréguliers, hyperchromatiques et pléomorphes associés à une activité mitotique élevée, témoignant d'une prolifération cellulaire intense (Louis et al., 2021 ; Wen et Kesari, 2008).

Un critère histologique majeur du GBM est la présence de nécrose tumorale entourée de cellules en pseudo-palissades, correspondant à un alignement radial de cellules tumorales viables autour de zones nécrotiques (Figure 2). Ce phénomène est généralement lié à une hypoxie locale et à une migration des cellules tumorales viables vers des régions mieux perfusées (Brat et Van Meir, 2004 ; Louis et al., 2021). Un autre critère histologique clé du GBM est la prolifération microvasculaire, correspondant à une angiogenèse intense avec la formation de structures vasculaires épaissies et tortueuses, souvent décrites comme des formations gloméruloïdes (Figure 2). Cette angiogenèse exacerbée est notamment due au VEGF sécrété par les cellules tumorales (Plate et al., 1992 ; Brat et Van Meir, 2004). Ce processus contribue à la croissance rapide du GBM et à l'augmentation de sa vascularisation, bien que ces néovaisseaux soient souvent anormaux et dysfonctionnels. Associée à la nécrose pseudo-palissadique, elle constitue une signature diagnostique permettant de distinguer le GBM des gliomes de grade inférieur (Louis et al., 2021).

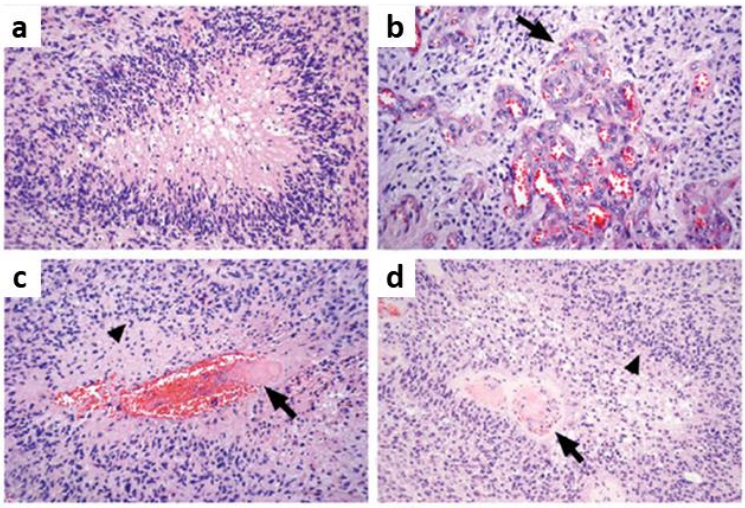


Figure 2 : Aspect histologique typique d'un GBM

(a) Les pseudo-palissades correspondent à une accumulation de cellules tumorales disposées autour de zones centrales de nécrose. (b) L'hyperplasie microvasculaire (flèche) reflète une angiogenèse induite par l'hypoxie et est généralement observée à proximité des zones nécrotiques. (c–d) Présence de thromboses intravasculaires (flèches) associées à la formation de pseudo-palissades et au développement de la nécrose (d'après Brat et al., 2004).

2.2.3 Classification moléculaire des glioblastomes

La classification des gliomes initialement fondée sur des critères histologique par Bailey et Cushing en 1926, a été standardisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) avec une gradation en quatre niveaux (grade I à IV) reflétant le degré de malignité et l'agressivité biologique des tumeurs (Bailey et Cushing, 1926 ; Louis et al., 2007). Elle a ensuite évolué pour intégrer progressivement les avancées en neuropathologie et en biologie moléculaire, notamment dans les versions révisées de 2007 et 2016 (Louis et al., 2007 ; 2016).

La classification OMS de 2016, a marqué une avancée majeure en intégrant des critères moléculaires, notamment le statut mutationnel du gène IDH (isocitrate déshydrogénase) et la codélétion chromosomique 1p/19q, permettant ainsi une meilleure stratification des gliomes et une corrélation plus précise avec le pronostic clinique (Louis et al., 2016 ; Eckel-Passow et al., 2015).

Dans la continuité de ces avancées, la classification OMS publiée en 2021 a renforcé l'intégration des critères moléculaires dans la définition des gliomes. En effet, elle distingue notamment, les GBM IDH non mutés (grade IV) des gliomes IDH mutés, subdivisés en astrocytomes (grades II à IV), et oligodendrogliomes avec codélétion 1p/19q (grades II-III), permettant une stratification plus précise en lien avec le pronostic et la réponse aux traitements (Louis et al., 2021). La classification de 2006 et de 2021 sont présentées dans la Figure 3.

2.3 Principales altérations génétiques et moléculaires du GBM

Les marqueurs moléculaires les plus étudiés sont l'IDH, p53, le récepteur du facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor receptor ou EGFR), l'expression de TERT et la méthylation du promoteur de la O6 - méthylguanine–DNA méthyltransférase (MGTM). La Tableau 3 reprend les principales altérations moléculaires retrouvées dans le GBM. Leurs conséquences biologiques et clinique y sont également mentionnés.

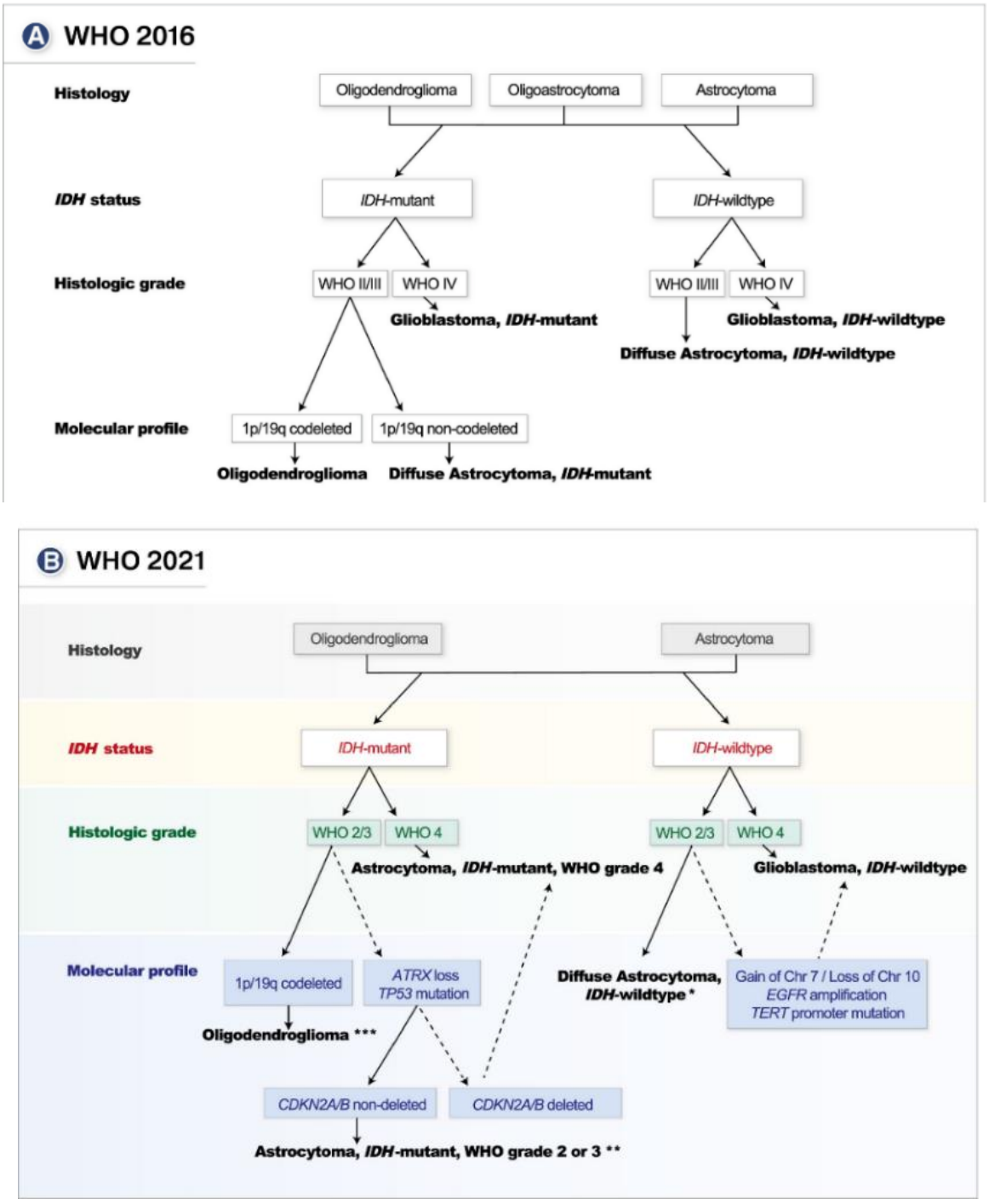


Figure 3 : Comparaison des classifications des gliomes de 2016 et 2020 reposant sur des critères histologiques et moléculaires

Les astrocytomes IDH-mutant sont gradués 2 à 4 selon l'histologie et CDKN2A/B, les astrocytomes IDH-wildtype rares nécessitent des tests moléculaires pour exclure un glioblastome, et les oligodendrogliomes IDH-mutant 1p/19q co-délétion sont de grade 2 ou 3 (d'après Gritsch et al., 2021).

Catégorie	Altération	Gènes impliqués	Mécanisme moléculaire	Fréquence	Impact biologique	Impact clinique / pronostique	Particularités	Référence
Métabolisme tumoral	Mutation IDH1/2	IDH1 (R132), IDH2	Conversion anormale α-KG → D-2HG → inhibition dioxygénases α-KG dépendantes → hyperméthylation (G-CIMP) → blocage différenciation	Rare dans GBM IDH-wt	Reprogrammation métabolique et épigénétique	Meilleur pronostic dans gliomes IDH mutés	Absent en IHC dans GBM IDH-wt	Kitagawa et al., 2024
Organisation génomique	Variants structuraux (SVs)	—	Translocations, inversions, duplications → formation de néoloops → contacts aberrants enhancer/promoteur → activation oncogénique	Fréquent	Remodelage 3D du génome	Contribue à l'hétérogénéité et résistance	Signature spécifique patient	Xie et al., 2024
Cytogénétique	Gain chr 7 / perte chr 10	EGFR, PDGFA, PTEN	Déséquilibre oncogènes/suppresseurs → amplification voies prolifératives	Très fréquent (GBM IDH-wt)	Augmentation prolifération et survie	Mauvais pronostic	Critère OMS 2021	Ordóñez-Rubiano et al., 2026
Signalisation RTK	Amplification EGFR	EGFR	Activation constitutive voies MAPK et PI3K/AKT	40–50 %	Prolifération, invasion, angiogenèse	Marqueur majeur GBM	Cible thérapeutique potentielle	Oukhdouch et al., 2025
	Mutation EGFRvIII	EGFR	Récepteur tronqué → activation ligand-indépendante	25–33 %	Signalisation oncogénique persistante	Impact pronostique débattu	Hétérogénéité intratumorale	Zhu et al., 2025
Voies suppresseurs	Mutation PTEN	PTEN	Activation PI3K/AKT/mTOR → survie cellulaire	~35 %	Résistance apoptose	Mauvais pronostic	Fréquent GBM primaires	Yang, 2017
	Mutation TP53	TP53	Perte contrôle cycle cellulaire, apoptose	Variable	Instabilité génétique	Plus fréquent GBM secondaires	Voie distincte d'oncogenèse	Pouyan et al., 2025
Télomères	Mutation promoteur TERT	TERT	Activation télomérase → stabilisation télomères	70–90 %	Immortalisation cellulaire	Associée à agressivité	Fréquente IDH-wt	Lee et al., 2024
	ALT	ATRX, DAXX	Recombinaison homologue → allongement télomères	10–15 %	Maintien prolifération sans télomérase	Sous-type spécifique	Présence APBs, ADN extra-chromosomique	Heaphy et al., 2011
	Perte ATRX/DAXX	ATRX, DAXX	Désorganisation chromatine télomérique	Associée ALT	Instabilité chromatinienne	Marqueur ALT	Signature moléculaire spécifique	Jiao et al., 2012
Épigénétique	Méthylation MGMT	MGMT	Silençage réparation ADN (O6-méthylguanine)	~40 %	Accumulation dommages ADN	Meilleure réponse au TMZ	Marqueur prédictif majeur	Brouland et al., 2017
Angiogenèse	Activation VEGF	VEGFA	Hypoxie → HIF1α → VEGF → néovascularisation	Très fréquent	Angiogenèse intense	Croissance rapide tumorale	Vaisseaux anormaux	Plate et al., 1992
Diagnostic OMS	Signature moléculaire intégrée	IDH, TERT, EGFR, chr7/10	Classification basée sur critères moléculaires + histologie	—	Stratification tumorale précise	Diagnostic même sans histologie classique	Révolution OMS 2021	Brat et al., 2021

Tableau 3 : Altérations moléculaires majeures du GBM et leurs conséquences biologiques et cliniques

Ce tableau synthétise les principales altérations génétiques et voies de signalisation impliquées dans la physiopathologie du glioblastome, incluant les variants structuraux, l'activation des voies RTK, les mutations de gènes suppresseurs de tumeur, les altérations des télomères et les mécanismes d'angiogenèse. Pour chaque catégorie, sont indiqués les gènes impliqués, les mécanismes moléculaires associés, leur fréquence, ainsi que leurs impacts biologiques et cliniques. L'ensemble met en évidence le rôle central de ces dérégulations dans la prolifération tumorale, l'invasion, la survie cellulaire et le maintien de phénotypes souches, contribuant à l'agressivité du glioblastome et à la résistance aux traitements. Ces altérations constituent des cibles clés pour le développement de stratégies thérapeutiques ciblées.

2.4 Composition cellulaire et microenvironnement du GBM

Le GBM se caractérise par une forte hétérogénéité cellulaire, à la fois inter- et intra-tumorale, avec des sous-populations aux profils moléculaires et fonctionnels distincts contribuant à la progression tumorale et à la résistance thérapeutique (Pouyan et al., 2025). Les avancées en génomique, notamment le séquençage à cellule unique, ont permis d'identifier différents sous-types moléculaires du glioblastome. La mise en en évidence des CSG, minoritaires mais essentielles dans l'initiation, la progression et la résistance thérapeutique, contribuant à l'hétérogénéité tumorale avec le microenvironnement (Lu et al., 2025). Un chapitre à part lui sera consacré (Chapitre 2.4.5).

2.4.1 Les cellules tumorales

Les cellules tumorales du GBM se caractérisent par une forte hétérogénéité génomique, transcriptionnelle et fonctionnelle (Yao et al., 2020). Cette diversité intratumorale est liée, à la plasticité cellulaire et à la présence de CSG, qui contribuent au maintien et à la progression tumorale. Les analyses transcriptomiques à cellule unique ont révélé que les cellules tumorales du glioblastome adoptent des états transcriptionnels dynamiques, (proneural, mésenchymateux, astrocytaire ou oligodendrocyte-progenitor-like) ce qui reflète une forte plasticité phénotypique permettant aux cellules tumorales de s'adapter aux contraintes du microenvironnement tumoral (Patel et al., 2014 ; Neftel et al., 2019).

Par ailleurs, les cellules tumorales du GBM possèdent un forte capacité d'invasion dans le parenchyme cérébral. Cette propriété infiltrante est liée à des mécanismes d'invasion, de dégradation de la matrice extracellulaire et d'interaction avec le microenvironnement (Giese et al., 2003 ; Quail et Joyce, 2017). Cette infiltration est l'une des principales difficultés à obtenir une résection chirurgicale complète et contribue aux récidives locales quasi systématique observées chez les patients. Enfin, les CSG qui représentent une population tumorale bien distincte des cellules tumorales du GBM contribuent à la résistance aux traitements *via* des mécanismes renforcés de réparation de l'ADN, de gestion du stress oxydatif et d'adaptation métabolique, favorisant leur survie et la rechute tumorale (Bao et al., 2006 ; Chen et al., 2012). Un chapitre leur sera consacré plus en aval de ce manuscrit.

2.4.2 Compartiment vasculaire

La tumeur de GBM se caractérise par une angiogenèse aberrante conduisant à une forte vascularisation associée à un pronostic défavorable chez les patients (Ballato et al., 2025). Dans des conditions physiologiques, la barrière hémato-encéphalique (BHE) (constituée de cellules endothéliales, d'une lame basale et de péricytes) assure une régulation stricte des échanges entre le sang et le parenchyme cérébral (Abbott et al., 2010). Au cours de la progression tumorale, l'angiogenèse induite par la tumeur altère l'intégrité de la BHE, entraînant une perte de sélectivité et favorisant le recrutement de cellules immunitaires périphériques. Ce recrutement repose sur la sécrétion de chimiokines (telles que CCL2 ou CXCL12), l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF et l'activation de l'endothélium, permettant l'adhésion et l'extravasation des leucocytes. Ces cellules contribuent ensuite à entretenir l'angiogenèse tumorale. (Read et al., 2024).

2.4.3 Microenvironnement immunitaire

En conditions physiologiques, le SNC possède des macrophages résidents, la microglie, qui assure une immunosurveillance du parenchyme et qui contribue au maintien de l'homéostasie cérébrale. L'entrée de macrophages dérivés de la circulation périphérique dans le SNC est limitée tant que l'intégrité de la BHE est préservée, empêchant l'infiltration de cellules immunitaires périphériques dans le tissu cérébral sain (Chamkouri & Motlagh Mohavi, 2025). En revanche, en présence d'une tumeur de GBM au sein du tissu cérébral, une infiltration importante de cellules immunitaires est retrouvée. La grande majorité de ces cellules immunitaires infiltrées sont des macrophages associés à la tumeur qui représentent jusqu'à 30 à 50 % de la masse tumorale. Cet apport important de macrophages favorise l'immunosuppression, la progression tumorale et la résistance aux traitements (Chen et al., 2025). Les lymphocytes quant à eux, bien qu'en moindre proportion sont également présents (Orrego et al., 2018).

2.4.3.1 Les lymphocytes

Les lymphocytes constituent des acteurs majeurs de la réponse immunitaire adaptative et se divisent principalement en lymphocytes T (LT) et lymphocytes B. Dans le GBM, les LT constituent la principale population adaptative, avec une sous-population lymphocytaire $CD8^+$ associée à une activité majoritairement antitumorale (contrôle de la croissance tumorale) et des LT $CD4^+$ associés

à des fonctions hétérogènes, incluant des sous-populations avec une activité immunosuppressive souvent associés à des fonctions pro-tumorales, influençant la dynamique tumorale et le pronostic des patients (Zhang et al., 2025). En raison de leur rôle central dans la modulation de la réponse immune, les LT constituent des cibles thérapeutiques clés, l'expression accrue de molécules inhibitrices telles que Programmed Cell Death-1 (PD-1) et Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA-4) est corrélée à une immunosuppression tumorale et à un pronostic défavorable (Kamran et al., 2018).

2.4.3.2 La microglie et les macrophages périphériques

Au cours de la progression du GBM, des monocytes périphériques infiltrent la tumeur et se différencient en macrophages associés aux tumeurs, dont les phénotypes fonctionnels sont orientés par les signaux présents dans le microenvironnement tumoral (Wang et al., 2025). Parallèlement, la microglie résidente est reprogrammée par la tumeur vers des états majoritairement immunosupresseur qui favorisent l'évasion immune et la progression tumorale (Chen et al., 2025).

2.4.4 Les astrocytes et les neurones

Les interactions entre les cellules cérébrales non tumorales et le microenvironnement tumoral jouent un rôle majeur dans la progression du GBM. Les astrocytes contribuent notamment activement à la croissance tumorale (Brandao et al., 2019). En effet, les astrocytes réactifs favorisent l'invasion et la résistance thérapeutique *via* l'activation de voies pro-invasives et des métalloprotéases, tandis que les neurones contribuent à la croissance tumorale, notamment *via* la libération de neuroligine-3 (NLGN3) activant des voies oncogéniques (Wu et al., 2025 ; Wang et al., 2025). Plusieurs médiateurs d'origine neuronale ont été impliqués dans la promotion de l'angiogenèse tumorale (Sun, 2006). Notamment le glutamate, participent à la progression du glioblastome en favorisant l'angiogenèse, la prolifération et l'invasion tumorale via l'activation de récepteurs glutamatergiques. Ces observations soulignent l'impact des signaux neuronaux dans la progression du GBM (Cueto-Ureña et al., 2025). Ces observations soulignent l'influence directe de l'activité astrocytaire et neuronale sur le développement du glioblastome (Wang et al., 2025).

2.4.5 Les cellules souches de glioblastome

2.4.5.1 Définition et propriétés

Au sein d'une tumeur de GBM est retrouvée la présence d'une sous-population cellulaire qui partage avec les cellules souches normales des caractéristiques propriétés fondamentales comme la capacité d'auto-renouvellement et l'aptitude à générer une descendance cellulaire hétérogène et diversifiée constituant l'essentiel de la masse tumorale (Bao et al., 2006). En rapport avec leurs propriétés biologiques, elles sont désignées sous le terme de cellules souches de glioblastome (CSG). (Bayin et al., 2014 ; Safa et al., 2015 ; Tang et al., 2025)

Elles représentent la fraction de la tumeur responsable de la propagation, alors que la majorité des cellules tumorales non souches (« plus différenciées ») présentent un potentiel prolifératif et tumorigène plus limité (Reya et al., 2001 ; Lathia et Liu, 2017). Cette organisation hiérarchique est soutenue par des approches fonctionnelles montrant que seules certaines cellules sont capables de régénérer la tumeur après transplantation *in vivo* et d'en reproduire l'hétérogénéité de la tumeur d'origine (Al-Hajj et al., 2003 ; Galli et al., 2004).

Les CSG jouent un rôle central dans l'initiation, la progression, la résistance thérapeutique et la récidive du GBM (Lathia et al., 2015 ; Gimple et al., 2019 ; Flavahan et al., 2016). Elles présentent des signatures transcriptionnelles, épigénétiques et métaboliques spécifiques et se caractérisent par une résistance accrue aux traitements par rapport aux cellules tumorales non souches (Colwell et al., 2017 ; Diehn et al., 2009).

Sur le plan moléculaire, les CSG détournent des voies clés de régulation des cellules souches normales (Notch, Hedgehog, Wnt/β-caténine, STAT3), soutenant leur auto-renouvellement, leur survie et leur résistance thérapeutique (Agosti et al., 2024 ; Wang et al., 2013). Des axes spécifiques, tels que STAT3–PARN ou TFPI2–JNK–STAT3, renforcent respectivement la prolifération, le caractère souche et l'immunosuppression tumorale (Yin et al., 2023 ; Pang et al., 2023). Par ailleurs, l'expression d'éléments rétroviraux endogènes comme HERV-K (HML-2) participe à la plasticité et au maintien de programmes transcriptionnels embryonnaires (Shah et al., 2023).

Deux modèles expliquent l'organisation des CSG (Figure 4) : un modèle hiérarchique classique qui repose sur une organisation unidirectionnelle dans laquelle les CSG se maintiennent par des divisions symétriques, tandis que des divisions asymétriques génèrent des cellules tumorales différenciées. À l'inverse, le modèle de plasticité hiérarchique propose une organisation plus dynamique, dans laquelle les cellules tumorales peuvent transiter entre des états différenciés et indifférenciés, remettant en cause l'existence d'une hiérarchie strictement figée (Kreso et al., 2014).

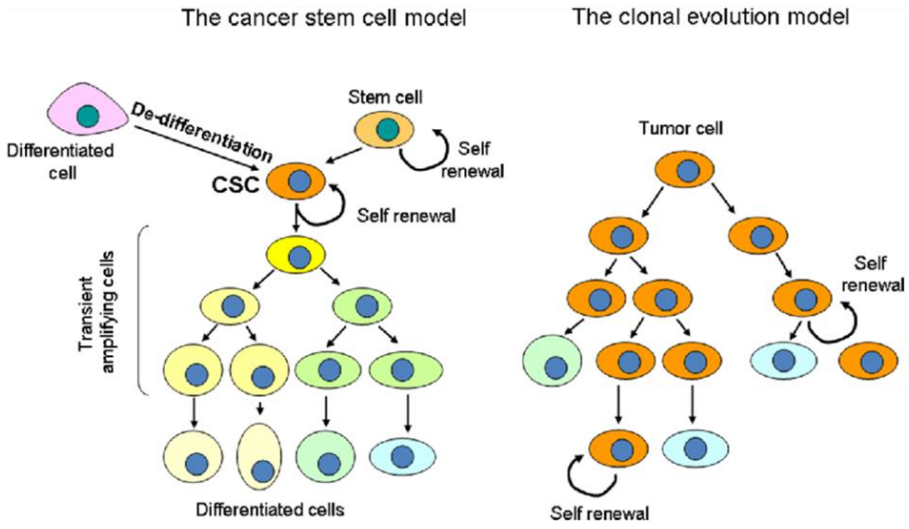


Figure 4 : Schéma représentatif du modèle hiérarchique des cellules souches cancéreuses par rapport au modèle stochastique de la tumorigenèse

Deux modèles conceptuels ont été proposés pour expliquer l'organisation cellulaire et l'hétérogénéité des tumeurs. Le modèle des cellules souches cancéreuses (CSC) décrit une organisation hiérarchique dans laquelle une sous-population de cellules souches tumorales s'auto-renouvelle et génère des cellules progénitrices puis différenciées. À l'inverse, le modèle d'évolution clonale propose que la tumeur résulte de l'accumulation progressive d'altérations génétiques dans différentes cellules tumorales, conduisant à l'expansion de clones multiples et à une forte hétérogénéité tumorale (d'après Carnero A. et al., 2016).

L'identification des CSG repose sur l'expression des marqueurs tels que CD15/SSEA, Sox2, Nestine, Olig2, CD44, CD133 ou A2B5, dont la spécificité reste controversée (Prager et al., 2020). En effet, des populations $CD15^{+}$ et $CD15^{-}$ isolées de biopsies de GBM présentent des propriétés similaires (Kenney-Herbert et al., 2015). De même, CD133 n'est pas systématiquement associé aux phénotypes souches (Ahmed et al., 2018).

Les cultures primaires 3D de glioblastome révèlent une hétérogénéité intra-tumorale avec des sous-population aux capacités prolifératives distinctes et une organisation spatiale dynamique (Dirkse et al., 2019). Cette plasticité permet aux CSG d'adopter différents sous-types moléculaires et de moduler leur état prolifératif ou quiescent selon le microenvironnement tumoral (Wang et al., 2021).

2.4.5.2 Niches tumorales des CSG

Le maintien des propriétés de type souche des CSG dépend étroitement de leur niche tumorale, c'est-à-dire du microenvironnement dans lequel elles évoluent. Cette niche est composée d'éléments vasculaires, immunitaires, cellules stromales et de la matrice extracellulaire, qui soutiennent leur survie, leur auto-renouvellement et leur plasticité (Gilbertson et Rich, 2007 ; Calabrese et al., 2007). Les CSG participent à l'organisation de ce microenvironnement *via* la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, FGF, angiopoïétines) (Folkins et al., 2009). Par ailleurs, des cellules endothéliales de type lymphatique sécrétant CCL21 stimulent la prolifération des CSG $CCR7^{+}$ et favorisent des adaptations métaboliques pro-tumorales (Zhao et al., 2024).

2.5 Rôle des CSG dans l'agressivité tumorale et la récidive

Les CSG sont des acteurs centraux de l'agressivité du glioblastome. Leur capacité à initier des tumeurs *in vivo*, absente dans la majorité des cellules tumorales différenciées, les situe au sommet de la hiérarchie tumorale et justifie leur définition de cellules initiatrices de tumeurs (Galli et al., 2004 ; Al-Hajj et al., 2003). Dès lors, elles participent à la fois à l'initiation du GBM et à sa reconstitution après traitements (Lathia et al., 2015 ; Dean et al., 2005).

Le glioblastome présente une hétérogénéité intratumorale, à la fois génétique, épigénétique et phénotypique, qui constitue un déterminant majeur de la progression et de la résistance thérapeutique (Snuderl et al., 2011 ; Patel et al., 2014). Les CSG y contribuent directement en générant, par différenciation, plusieurs lignées tumorales et en favorisant l'émergence de sous-clones au cours de l'évolution tumorale (Chen et al., 2012 ; Wang et al., 2018).

Des travaux récents montrent que les CSG se déclinent en sous-types transcriptionnels aux dépendances moléculaires distinctes, soulignant leur hétérogénéité et leur plasticité sous l'effet des

pressions tumorale et thérapeutiques (MacLeod et al., 2024). Sur le plan clinique, la récidive peut être attribuée à la persistance de CSG résistantes, capables de survivre aux traitements et de relancer la croissance tumorale (Sottoriva et al., 2013 ; Chen et al., 2012). La chirurgie, même optimisée, ne supprime pas toutes les cellules infiltrantes (Sanai et Berger, 2018 ; Senft et al., 2011), et les traitements ciblent surtout les cellules prolifératives, laissant persister une fraction quiescente enrichie en CSG (Xie et al., 2022 ; Moore et Lyle, 2011). Dès lors, ces cellules résiduelles constituent un réservoir à l'origine de rechutes souvent plus agressives et résistantes (Chen et al., 2012 ; Wang et al., 2016). Enfin les CSG participent à la reconfiguration du microenvironnement tumoral en stimulant l'angiogenèse et l'immunosuppression, deux processus favorisant la progression et limitant l'efficacité thérapeutique (Folkins et al., 2009 ; Wu et al., 2010). Par la sécrétion de cytokines immunosuppressives et l'expression de checkpoints immunitaires, elles freinent les réponses antitumorales et instaurent un environnement permissif (Yao et al., 2020). Dès lors, elles constituent des cibles thérapeutiques majeures au cœur de l'agressivité et de la résilience du glioblastome.

3 : TRAITEMENT DU GBM ET RADIOBIOLOGIE

3.1. Prise en charge thérapeutique des GBM

3.1.1 Traitement de première ligne

Les patients âgés de 18 à 70 ans, présentant un bon état général avec des fonctions hématologiques, hépatiques et rénales conservées, sont éligibles au traitement de référence contre le GBM, reposant sur le protocole de Stupp (Stupp, 2005). Celui-ci associe, lorsque cela est possible, une exérèse tumorale maximale, suivie d'une radiochimiothérapie concomitante sur six semaines, puis d'une chimiothérapie adjuvante avec le témozolomide (TMZ) (Stupp, 2005). Ce schéma thérapeutique a permis une amélioration faible mais significative de la survie globale médiane par rapport à la radiothérapie seule (14,6 mois versus 12,1 mois) (Stupp, 2005). Ces résultats ont été confirmés par des analyses à plus long terme, démontrant un bénéfice durable sur la survie globale et la survie sans progression chez les patients atteints de GBM (Stupp, 2009).

3.1.2 Traitement chirurgical

La prise en charge initiale du glioblastome repose sur la chirurgie, qui permet à la fois le diagnostic histologique et la réduction du volume tumoral. Toutefois, l'étendue de la résection dépend fortement de la localisation de la tumeur et des contraintes fonctionnelles, limitant souvent une exérèse complète malgré son association à une meilleure survie (Kernbach et al., 2025).

Plusieurs études récentes, dont une méta-analyse incluant plus de 26 000 patients montre une corrélation robuste entre l'étendue de résection EOR (Extent of Resection : proportion de volume tumoral retirée lors de la chirurgie) et la survie des patients (Geens et al., 2025).

Cependant même si les données soutiennent une résection la plus large possible sous contrainte de sécurité neurologique, l'infiltration du glioblastome entraîne dans la majorité des patients, une persistance de cellules tumorales responsables de récidives, justifiant une prise en charge multimodale associant la chirurgie à la radiochimiothérapie à base de témozolomide (Johnson, 2014).

3.1.3 Chimiothérapie

Après chirurgie, le traitement repose sur une radiothérapie concomitante avec témozolomide (TMZ ; 75 mg/m²/j pendant 6 semaines), suivie d'une phase adjuvante en cycles de 5 jours tous les 28 jours (150–200 mg/m²), généralement sur 5 à 6 cycles (Stupp, 2005).

Le TMZ appartient à la classe des agents alkylants et exerce son activité cytotoxique par l'addition de groupements alkyles sur la guanine de l'ADN, entraînant la formation de lésions moléculaires appelées adduits (Oshiro, 2009). Même si ces lésions activent les systèmes de réparation de l'ADN, l'accumulation des dommages non réparés conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et à la mort des cellules tumorales (Ortiz et al., 2021).

3.1.4 Radiothérapie

3.1.4.1 Traitement standard

La radiothérapie externe constitue la modalité de référence dans le traitement des GBM. Elle repose sur l'administration de rayonnements ionisants selon des schémas de fractionnement visant à optimiser l'efficacité antitumorale tout en limitant la toxicité. Le protocole de Stupp demeure le standard, avec 60 Gy délivrés en 30 fractions de 2 Gy sur six semaines, *via* des faisceaux multiples orientés autour de la lésion (Stupp et al., 2005). Elle cible le volume tumoral ainsi que la zone d'infiltration périphérique identifiée à l'imagerie, afin de maximiser l'effet cytotoxique tout en limitant la toxicité pour les tissus cérébraux sains (Stupp et al., 2005 ; Weller et al., 2021). Ces traitements utilisent majoritairement des rayons X de haute énergie produits par des accélérateurs linéaires (6–15 MV), dont la pénétration conditionne la distribution de dose en profondeur. Dans le GBM, les photons de 6 MV restent largement utilisés, y compris dans des essais récents, confirmant leur rôle central en radiothérapie conventionnelle (Rodland et al., 2025).

Malgré ces protocoles multimodaux, le GBM demeure hautement radiorésistant, avec des récidives locales fréquentes, liées notamment à l'hétérogénéité tumorale, aux CSG et à l'hypoxie du microenvironnement (Bao et al., 2006 ; Weller et al., 2021). La radiothérapie repose sur l'utilisation de radiations ionisantes, dont les propriétés physiques conditionnent à la fois l'efficacité tumorale et la préservation des tissus sains (Zhang et al., 2025). En pratique, ces radiations affectent

l'ensemble du tissu exposé, incluant les cellules tumorales et non tumorales, ainsi que la matrice extracellulaire et l'eau, contribuant à la réponse globale à l'irradiation. La phase physique correspond à l'interaction initiale des rayonnements avec la matière, entraînant l'ionisation des atomes par transfert d'énergie, en fonction de l'énergie du rayonnement et des propriétés atomiques des tissus (Banks et al., 2025 ; Zhang et al., 2025).

3.1.4.2. La radiothérapie externe et les schémas de fractionnement

Bien que le protocole de radiothérapie de Stupp soit appliqué de manière standardisée, des stratégies alternatives de fractionnement ont été développées afin d'essayer d'améliorer le contrôle tumoral ou d'adapter le traitement à certains profils de patients. Le Tableau 4 suivant présente les deux principales modalités de fractionnement, à savoir l'hyperfractionnement et l'hypofractionnement.

Comparaison : Hyperfractionnement vs Hypofractionnement		
Paramètre	**Hyperfractionnement**	**Hypofractionnement**
Principe	Doses unitaires réduites, fractions multiples/jour	Doses unitaires élevées, moins de fractions
Dose par fraction	≈ 1–1,8 Gy	≥ 2,5 Gy (souvent 3 Gy)
Fréquence	2 fractions/jour	1 fraction/jour
Dose totale	Équivalente ou augmentée	Réduite ou équivalente
Durée traitement	Similaire ou légèrement réduite	2–3 semaines (réduite)
Objectif	Limiter toxicité tardive	Augmenter effet biologique tumoral
Tolérance	Bonne tolérance tardive théorique	Toxicité tardive possible
Indications	Exploratoire	Patients âgés / fragiles
Résultats GBM	Pas de gain de survie	Pas de gain de survie
Exemples	1,5 Gy x2/j ; 69 Gy total	45 Gy en 15 fractions + TMZ
Avantages	Moins de toxicité tardive (théorique)	Traitement plus court
Limites	Complexité organisationnelle	Bénéfice limité

Tableau 4 : Comparaison des stratégies d'hyperfractionnement et d'hypofractionnement en radiothérapie du GBM

Ce tableau compare les deux principales stratégies de fractionnement utilisées en radiothérapie du glioblastome, à savoir l'hyperfractionnement et l'hypofractionnement, en intégrant leurs caractéristiques dosimétriques, leurs objectifs radiobiologiques et leurs implications cliniques. L'hyperfractionnement repose sur l'administration de faibles doses unitaires (1–1,8 Gy) délivrées à une fréquence accrue, généralement deux fois par jour, afin de limiter la toxicité tardive tout en permettant une escalade de dose. Cependant, les données cliniques montrent des résultats hétérogènes, sans bénéfice significatif en termes de survie globale par rapport aux schémas conventionnels (Shibamoto, 1997 ; Lewitzki, 2019). À l'inverse, l'hypofractionnement utilise des doses par fraction plus élevées (> 2,5 Gy) dans le but de réduire le nombre total de fractions et la durée globale du traitement, tout en maintenant un effet biologique tumoral élevé. Bien que cette approche présente un intérêt pratique, notamment chez les patients fragiles, les études cliniques récentes n'ont pas démontré d'amélioration significative de la survie globale comparativement aux protocoles standards, malgré l'utilisation de schémas tels que 45 Gy en 15 fractions associés à la témozolomide (Beckham et al., 2024 ; Kim et al., 2024).

3.2 Les problématiques de la prise en charge du GBM

3.2.1 Hétérogénéité et microenvironnement tumoral

Le GBM se caractérise par une forte hétérogénéité morphologique, cellulaire et moléculaire liée à des altérations génétiques et épigénétiques (Singh et al., 2025 ; Ordóñez-Rubiano et al., 2025). Ces analyses ont conduit à la définition de plusieurs sous-types moléculaires de glioblastome, reflétant des trajectoires tumorales distinctes. Parmi eux, le sous-type proneural est notamment associé à des altérations de PDGFRA et à des mutations d'IDH1, tandis que le sous-type mésenchymateux est fréquemment lié à des anomalies de PTEN. Le sous-type classique, quant à lui, se caractérise par une amplification du chromosome 7 incluant EGFR, combinée à une perte du chromosome 10 (Wang et al., 2017).

Cependant, cette classification ne reflète qu'en partie la complexité du glioblastome, marqué par une forte hétérogénéité intratumorale avec des clones aux profils génétiques et fonctionnels distincts. Dans ce contexte, les cellules souches tumorales, dotées de capacités d'autorenouvellement et de différenciation, jouent un rôle central dans le maintien tumoral, la résistance aux traitements et la récidive (Arbatskiy et al., 2024 ; Singh et al., 2025).

La plasticité du GBM implique des interactions étroites avec le microenvironnement, la tumeur reprogrammant des cellules cérébrales normales pour favoriser prolifération, invasion, angiogenèse et immunosuppression, notamment *via* la libération de vésicules extracellulaires qui renforcent la migration tumorale (Read et al., 2024 ; Tang et al., 2025 ; Tamborini et al., 2025).

3.2.2 Mécanismes de résistance

Le GBM est associé à une forte résistance thérapeutique, pouvant être présente dès le diagnostic ou acquise au cours des traitements, constituant un obstacle majeur à leur efficacité. Dans ce contexte, les CSG présentent des mécanismes de résistance préexistants aux traitements, notamment une capacité accrue de réparation de l'ADN, des adaptations métaboliques et des signatures moléculaires qui les protègent des effets cytotoxiques (Tang et al., 2025).

Sous pression thérapeutique, cette résistance est amplifiée par la plasticité du GBM, qui favorise l'émergence de sous-populations résistantes, lesquelles, dotées de capacités d'autorenouvellement et de différenciation, présentent une tolérance accrue aux dommages induits par les traitements et contribuent aux récidives (Osuka et Van Meir, 2017). Ainsi, la résistance du GBM repose à la fois sur une hétérogénéité génétique intrinsèque et sur des mécanismes adaptatifs induits par les traitements, comme illustré pour le TMZ, dont l'efficacité est limitée par l'activation des voies de réparation de l'ADN.

En particulier, la surexpression de MGMT favorise la réparation des lésions induites par le TMZ et contribue à la résistance thérapeutique, tandis que la co-activation de voies alternatives, notamment au sein de la famille ErbB (HER2/HER3), permet aux cellules tumorales de contourner les thérapies ciblant EGFR (Duan et al., 2024 ; Mulliqi et al., 2025). Dès lors, le ciblage d'EGFR seul apparaît insuffisant face à la plasticité des voies de signalisation du glioblastome, en raison de mécanismes compensatoires (HER2/HER3, MET, PDGFR), de la faible pénétration à travers la BHE et de mutations secondaires, limitant l'efficacité des approches ciblées (Mulliqi et al., 2025).

Par ailleurs, la résistance tumorale implique également des mécanismes d'efflux médicamenteux. Les transporteurs de la famille ABC, notamment ABCB1 et ABCG2, fortement exprimés dans les cellules souches tumorales, assurent l'extrusion active de nombreux agents anticancéreux, dont le TMZ, réduisant leur accumulation intracellulaire et contribuant à la chimiorésistance (Xu et al., 2024).

Au-delà des propriétés intrinsèques des cellules tumorales, le microenvironnement joue également un rôle déterminant. Il contribue activement à la résistance *via* des niches vasculaires immunosuppressives impliquant cellules tumorales, endothéliales et macrophages, qui limitent l'accès des traitements et des effecteurs immunitaires (Yang et al., 2024). Plus largement, cette organisation dynamique du microenvironnement favorise la survie cellulaire et l'acquisition de résistances secondaires en modulant la réponse immunitaire et l'efficacité des traitements.

Dans ce contexte, les stratégies thérapeutiques actuelles reposent majoritairement sur des agents cytotoxiques (TMZ, nitrosourées) ciblant les cellules prolifératives sans spécificité tumorale, ce qui entraîne des effets indésirables sur les tissus à renouvellement rapide et limite leur utilisation

(Fernandes et al., 2017 ; Amjad et al., 2026 ; Akbarali et al., 2022). Afin de réduire cette toxicité, des thérapies ciblées ont été développées, mais leur sélectivité reste imparfaite, en raison de l'expression de leurs cibles dans les tissus normaux, ce qui restreint leur efficacité clinique et expose à des effets secondaires, comme observé avec le bévacizumab (Hama et al., 2025).

Les GBM présentent également une sensibilité limitée aux rayonnements ionisants, se traduisant cliniquement par une persistance tumorale. Cette radiorésistance repose sur l'activation de mécanismes limitant les effets cytotoxiques de l'irradiation. Par exemple, les cellules de GBM renforcent leur capacité à neutraliser le stress oxydatif *via* une surexpression d'enzymes anti-oxydantes, notamment SOD1, SOD2 et les enzymes du métabolisme du glutathion (Zhong et al., 1999). Cliniquement, une forte expression de SOD1 est associée à un mauvais pronostic, tandis que sa diminution améliore la survie après radiothérapie (Yoshii et al., 1999). Par ailleurs, la radiorésistance dépend de la capacité à réparer les cassures double brin de l'ADN. Dans le GBM, cette propriété repose sur une activation accrue de la voie de réparation par jonction non homologue (NHEJ), particulièrement dans les CSG, *via* un recrutement renforcé des complexes de réparation. Cette activation favorise la survie après irradiation, alors que son inhibition restaure la radiosensibilité (Mi et al., 2025).

De manière cohérente, les thérapies ciblées et les immunothérapies présentent une efficacité variable dans le glioblastome et sont associées à des toxicités parfois sévères (Mantica et al., 2018). Ainsi, la combinaison d'une résistance tumorale élevée et d'un manque de spécificité des traitements actuels contribue aux récidives fréquentes et souligne la nécessité de développer des stratégies thérapeutiques plus ciblées et adaptées aux sous-populations résistantes.

4 : MIGRATION, INVASION, RECIDIVE ET INVASION RADIO-INDUITE

4.1 Organisation du cytosquelette

La migration et l'invasion des cellules de GBM repose sur leur capacité à réorganiser leur structure. Cette plasticité morphologique dépend du cytosquelette qui constitue un réseau intracellulaire dynamique. Il intègre des signaux mécaniques et biochimiques indispensables à la migration cellulaire (Hohmann et Dehghani, 2019). Dans les cellules de GBM, ce cytosquelette dépasse un simple rôle de soutien structural. Il régule la polarité cellulaire, les interactions d'adhérence avec le microenvironnement, et la génération de forces motrices. Ces fonctions sont cruciales dans le parenchyme cérébral puisque la migration des cellules impose des ajustements continus de la forme cellulaire et des points d'ancrage (van Bodegraven EJ et al., 2025).

Sur le plan organisationnel, ce réseau repose sur trois systèmes filamentaires aux propriétés complémentaires : filaments intermédiaires, microtubules et filaments d'actine. Leur coordination conditionne l'efficacité des programmes de migration des cellules tumorales (Pradeau-Phélut et al. 2024 ; Figure 5).

4.1.1 Les microfilaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires présentent une grande diversité moléculaire. Ils sont codés par au moins 70 gènes et répartis en cinq classes selon leur structure et leur homologie. Ils forment des filaments d'environ 10 nm (Romano et al., 2025 ; Coelho-Rato et al., 2024). Les quatre premières classes sont cytoplasmiques et incluent kératines, vimentine, nestine et GFAP, exprimées dans les astrocytes et les cellules de gliomes. La cinquième classe correspond aux lamines nucléaires (A/C, B1, B2) qui assurent l'architecture nucléaire et la mécano-transduction. Les filaments intermédiaires cytoplasmiques ont une structure conservée avec un domaine central en hélice α et des régions terminales non hélicoïdales. Leur assemblage est progressif : dimères, tétramères, puis protofilaments. La structure finale comprend huit tétramères. Cette organisation confère une forte

résistance mécanique, essentielle lors des déformations liées à la migration (Van Bodegraven et al., 2022 ; Pradeau-Phélut et al., 2024).

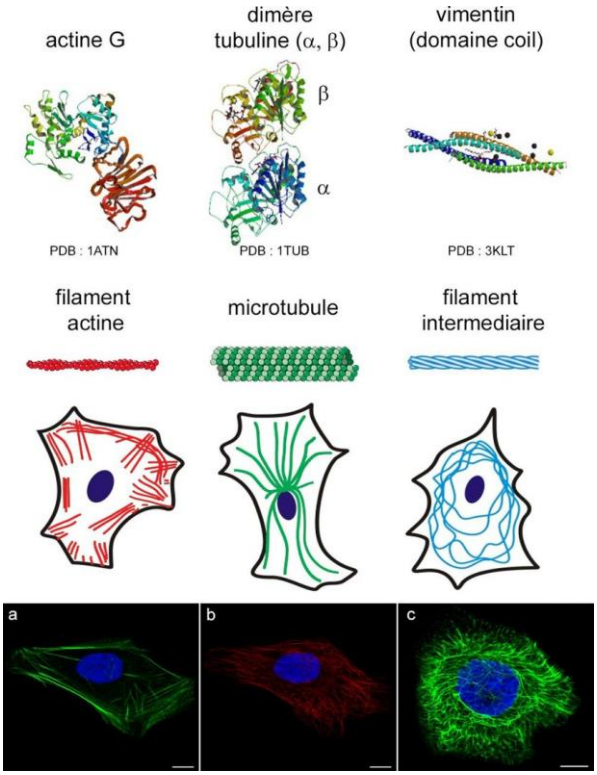


Figure 5 : Organisation multi-échelle des trois principaux réseaux du cytosquelette : actine, microtubules et filaments intermédiaires

Cette figure illustre, pour chacun des trois grands réseaux du cytosquelette, le continuum structure–polymérisation–organisation cellulaire. En haut, sont représentées les structures atomiques des sous-unités : actine G, dimère de tubuline α/β et vimentine. Au centre, ces sous-unités s'assemblent en polymères : filaments d'actine, microtubules et filaments intermédiaires, avec des schémas indiquant leur distribution typique dans la cellule (faisceaux d'actine cortico–basaux, réseau microtubulaire radial, maillage de filaments intermédiaires souvent périnucléaire). En bas (a–c), des images de fluorescence illustrent ces organisations : (a) actine (vert), (b) vimentine/filaments intermédiaires (rouge), (c) microtubules (vert) (d'après Osseman ; 2014).

4.1.2 Microtubules

4.1.2.1 Propriétés structurales et dynamique des microtubules

Les microtubules sont dynamiques. Ils s'assemblent et se désassemblent rapidement. Ils sont formés d'hétérodimères d'α- et β-tubuline organisés en tubes creux de treize protofilaments (Figure 6). Leur longueur peut atteindre celle de la cellule. La nucléation a lieu aux centrosomes et au Golgi,

via des complexes à γ-tubuline (Oakley et al., 2015). La croissance radiale établit un réseau polarisé. Ce réseau supporte un transport vectoriel des organites, des vésicules et de multiples complexes protéiques. Cette architecture, couplée à des cycles rapides de polymérisation et de dépolymérisation, contribue directement au contrôle de la polarité cellulaire. Elle conditionne, en conséquence, l'efficacité des programmes migratoires (Ezzo et al., 2025)

4.1.2.2 Organisation microtubulaire

Dans les cellules de GBM, l'invasion du parenchyme cérébral s'accompagne d'une réorganisation du réseau microtubulaire. Plusieurs travaux rapportent une polarisation des microtubules vers le front migratoire qui canalise le trafic intracellulaire de vésicules, de récepteurs d'adhérence et d'enzymes protéolytiques impliquées dans le remodelage de la MEC. Cette distribution asymétrique favorise l'installation d'une polarité avant/arrière et soutient une progression directionnelle, notamment le long des fibres de la matrice et des structures périvasculaires. La dynamique des microtubules reste modulable localement : elle dépend de modifications post-traductionnelles de la tubuline, telles que l'acétylation ou la tyrosination, qui ajustent leur stabilité. Ce contrôle conditionne l'équilibre entre l'extension des protrusions, la formation des adhérences et la rétraction du pôle arrière et contribue ainsi à la persistance du mouvement migratoire (Otani et al., 2019).

4.1.2.3 Couplage avec l'actine, les adhérences et contrôle de l'invasivité

Le rôle des microtubules dans l'invasion ne se limite pas au transport intracellulaire. Il repose sur leur couplage avec l'actine et les adhérences *via* les kinésines et la dynéine, ils contrôlent le trafic et le recyclage des intégrines. Ils régulent ainsi la formation et le désassemblage des adhérences focales. Cette coordination intègre des signaux mécaniques et biochimiques, ajuste la traction et oriente la migration. Dans les cellules de glioblastome la nucléation des microtubules peut être modulée par les protéines GIT1 et GIT2, qui interagissent avec ces complexes au niveau des centrosomes. En particulier, la phosphorylation de GIT2 par la protéine kinase C (PKC) constitue un mécanisme de régulation de ce processus (Sulimenko et al., 2025). Ces ajustements affectent la polarité cellulaire et influencent la migration et l'invasion en soulignant le rôle central de la plasticité du réseau microtubulaire dans les cellules de glioblastome (Sulimenko et al., 2025 ; Ju RJ et al., 2024 ; Hohmann et al., 2019).

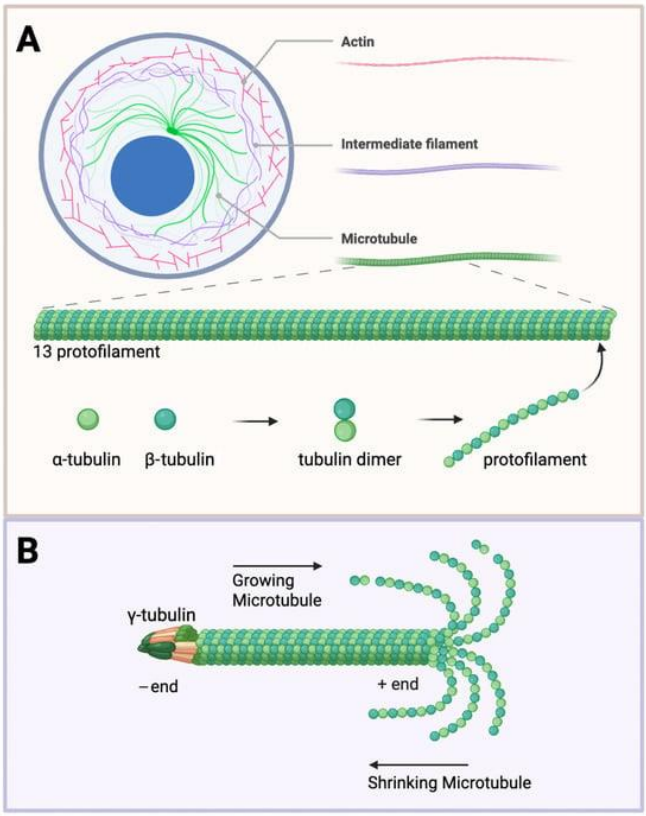


Figure 6 : Structure et dynamique des microtubules

Les microtubules sont des cylindres creux (25 nm) formés par l'assemblage d'hétérodimères de tubuline α/β en 13 protofilaments. Leur nucléation est initiée par le complexe en anneau de γ-tubuline. La croissance se fait majoritairement à l'extrémité plus (exposant la β-tubuline), alors que la rétraction progresse vers l'extrémité moins (exposant la α-tubuline) (d'après Ezzo et Etienne-Manneville, 2025).

4.1.3 Cytosquelette d'actine

Le réseau d'actine est la composante la plus dynamique du cytosquelette. Il génère les forces de déformation membranaire et de migration. Les filaments d'actine (F-actine) résultent de l'assemblage polarisé de monomères d'actine-G et présentent une polymérisation au pôle positif et une dépolymérisation au pôle négatif. Cette dynamique est spontanée ; toutefois, son organisation nécessite une régulation fine (Oosterheert et al., 2025). Ainsi, ce contrôle repose sur des complexes nucléateurs et sur des protéines de coiffage, de sectionnement et de pontage. Ces effecteurs ajustent l'équilibre entre actine monomérique et filamentaire. De plus, ils modulent l'architecture du cytosquelette en réponse aux contraintes mécaniques et aux signaux du microenvironnement.

Par exemple, la gelsoline peut sectionner et coiffer les filaments d'actine, modulant la polymérisation et la dépolymérisation. Elle influence ainsi la formation de protrusions membranaires et la migration cellulaire (Barrie et al., 2025). Au front de migration, dès lors, cette régulation permet l'émergence de structures adaptées aux propriétés mécaniques et biochimiques de la MEC : les lamellipodes, riches en actine branchée, assurent la protrusion, tandis que les filopodes, formés de faisceaux parallèles, permettent l'exploration directionnelle et la détection de trajectoires permissives. En milieu confiné, la formation de filopodes est renforcée par des protéines comme Espin, ce qui favorise la migration (Wang et al., 2025). Par ailleurs, les fibres de stress génèrent des forces contractiles ; elles stabilisent les adhérences focales et assurent la traction. En parallèle, les blebs constituent des protrusions sphériques liées à la pression intracellulaire et à une rupture locale cortex/membrane ; ils soutiennent une migration amoeboïde, adaptée aux matrices denses sans forte protéolyse (Driscoll et al., 2024). Enfin, les invadopodes concentrent des métalloprotéinases et favorisent l'invasion locale ainsi que le remodelage de la matrice. Leur efficacité dépend d'une organisation précise de l'actine. Ainsi, la polymérisation et la réorganisation coordonnées de l'actine couplent protrusion, adhérence et traction, conditionnant le déplacement cellulaire (Ridley et al., 2011).

4.2 Mécanismes de la motilité cellulaire

La dissémination des cellules tumorales est centrale dans la progression cancéreuse. Elle peut survenir précocement. Elle repose sur l'activation de programmes de migration finement régulés. La migration est un processus séquentiel qui implique des étapes coordonnées. La cellule forme des protrusions, établit des adhésions avec la MEC, génère des forces contractiles, puis désassemble ces adhésions au pôle arrière pour progresser (García-Arcos, 2024).

4.2.1 Polarisation cellulaire et contrôle moléculaire de la migration dirigée

La migration cellulaire dirigée nécessite une polarité avant/arrière. Elle dépend de signaux extracellulaires et d'une organisation asymétrique du cytosquelette (Mayor et al., 2016 ; Ridley et al. 2003). À ce titre, elle implique le repositionnement du noyau, du MTOC (centre organisateur des

microtubules) et du Golgi vers l'avant, ce qui permet une migration orientée (Figure 7 ; Lauffenburger and Horwitz, 1996 ; Watanabe et al., 2005). Sur le plan morphologique, la cellule émet des protrusions membranaires, notamment les lamellipodes et les filopodes. Cette asymétrie repose en grande partie sur les GTPases de la famille Rho (Ridley et al., 2015). Rac1 pilote l'initiation des protrusions et leur stabilisation au front migratoire. En parallèle, Cdc42 contribue à l'orientation globale de la cellule et à la persistance directionnelle, notamment en activant localement Rac1 et la polymérisation de l'actine (Patwardhan et al. 2024 ; Ma et al., 2023). À l'inverse, RhoA exerce un rôle complémentaire mais spatialement distinct : il règle la contractilité postérieure via ROCK et la myosine II, favorisant la rétraction de l'arrière. Ainsi, l'antagonisme Rac1–RhoA cloisonne leurs domaines d'activité et renforce la polarité (Ridley et al., 2015). Ce cloisonnement s'accompagne d'une augmentation des tensions mécaniques, de l'ouverture de canaux calciques sensibles à l'étirement et de l'activation de protéases Ca^{2+}dépendantes qui participent au remodelage des adhérences focales. Dans le glioblastome, cette régulation varie selon le contexte. Les cellules infiltrantes présentent une activation accrue de Rac1 et Cdc42 au niveau des protrusions, et une activité réduite de RhoA. Dès lors, elles adoptent un phénotype plus migratoire et invasif que les cellules de la masse tumorale centrale (Ridley et al., 2003 ; Hirata et al., 2012 ; Figure 7).

Au front de migration, la poussée est générée par l'addition de monomères d'actine G à l'extrémité positive des filaments, ce qui entraîne un déplacement de la membrane plasmique vers l'avant (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Dans ce cadre, le complexe Arp2/3, activé par les protéines de la famille WASP et par Rac1/Cdc42, construit des réseaux ramifiés typiques des lamellipodes. Parallèlement, les formines (notamment mDia1 et mDia2), activées en particulier par RhoA et Cdc42, soutiennent l'élongation de filaments linéaires et l'organisation de faisceaux parallèles (Figure 7). Elles fonctionnent avec la profiline et les protéines Ena/VASP. L'ensemble reste toutefois sous contrainte d'un recyclage permanent : des protéines de coiffage et de sectionnement, dont la gelsoline et les cofilines, maintiennent la disponibilité en actine et participent à la dynamique arrière du réseau (Barrie et al., 2025).

Dans ce contexte, JMY occupe une position clé à l'interface entre signalisation du stress et cytosquelette. Elle agit comme cofacteur de p53 et comme nucléateur d'actine. Elle active le complexe Arp2/3 et initie également une nucléation indépendante. Ainsi, ces propriétés favorisent

la formation de protrusions et une migration directionnelle. Elles illustrent plus largement le couplage entre reprogrammation transcriptionnelle et dynamique mécanique, essentiel à l'invasion tumorale (Zuchero et al., 2009 ; Coutts et al., 2009 ; Pollard, 2016).

4.2.2 Signaux régulant la migration

La migration tumorale dépend étroitement des signaux du microenvironnement. En particulier, le glutamate libéré par les cellules gliales induit des oscillations de Ca^{2+}. Ces fluctuations ioniques renforcent la contractilité et les adhérences focales. Ainsi, cet effet ne se limite pas aux cellules tumorales mais concerne également le tissu sain adjacent (Cui et al. 2021 ; Catacuzzeno et al., 2015). Par ailleurs, l'acidification du milieu extracellulaire favorise la migration. D'une part, elle facilite la dégradation de la matrice, la mort des cellules voisines et stimule l'angiogenèse. Dès lors, elle contribue à créer un environnement permissif pour la progression tumorale (Casciari et al., 1992 ; Cappellesso et al., 2024 ; Tamai et al., 2022). Plus largement, l'invasion des cellules de glioblastome repose sur une interaction complexe avec de multiples signaux du microenvironnement, dont les principaux mécanismes sont résumés dans la Table 5.

Catégorie	Signal / facteur	Mécanisme	Effet sur l'invasion
Hypoxie	Hypoxie (↓ O_2)	Stabilisation de HIF-1α	Activation transcriptionnelle de gènes pro-invasifs, angiogenèse, migration
	HIF-1α → ZEB1	Répression des cadherines	Perte d'adhérence cellulaire, phénotype invasif
	HIF-1α → intégrines (αvβ3, αvβ5)	Activation FAK / RhoB	Renforcement adhésion dynamique et migration
Matrice extracellulaire (MEC)	Rigidité ECM	Mécanotransduction	Corrélée à agressivité et invasion
	Fibronectine / FNMA	Renforce adhérence Cellule / cellule	↓ invasion (effet inhibiteur)
	Testican-3	Inhibition MT-MMPs	↓ invasion (perdu dans GBM)
Remodelage MEC	MMP2, MMP9	Dégradation ECM	Facilite infiltration tumorale
	MT-MMPs	Activation pro-MMP2 + protéolyse	Invasion accrue
	ADAM / ADAMTS	Protéolyse + adhésion	Remodelage ECM et invasion
	uPA / cathepsine B	Activation MMP	Amplification protéolyse MEC
Interactions cellulaires	Astrocytes (tumor-associated)	Sécrétion facteurs pro-invasifs	Promotion invasion
	Microglie/macrophages	Sécrétion MMP9, cytokines	Expansion tumorale et infiltration
	Interaction cellule–cellule tumorale	Coopération entre cellules GBM	Invasion collective
Adhésion cellulaire	Intégrines	Lien cytosquelette / MEC	Migration, traction, invasion
Plasticité tumorale	Transition proneural ↔ mésenchymateuse	Reprogrammation transcriptionnelle	Phénotype plus invasif
Effets thérapeutiques	Radiothérapie / chimiothérapie	Modification microenvironnement	Favorise invasion secondaire

Tableau 5 : Principaux signaux du microenvironnement impliqués dans la régulation de l'invasion et de la migration des cellules de glioblastome

Ce tableau synthétise les principaux facteurs du microenvironnement tumoral impliqués dans la régulation de l'invasion des cellules de glioblastome, en distinguant les signaux liés à l'hypoxie, au remodelage de la matrice extracellulaire (MEC), à l'adhésion cellulaire et aux effets des traitements. L'hypoxie constitue un stimulus central en induisant la stabilisation de HIF-1α, qui active des programmes transcriptionnels pro-invasifs, notamment via ZEB1 et les intégrines. Le remodelage de la MEC repose sur l'activité de protéases telles que les métalloprotéinases matricielles (MMP), les MT-MMPs, les ADAM/ADAMTS ainsi que l'axe uPA/cathépsine B, facilitant la dégradation de la matrice et l'infiltration tumorale. Les intégrines assurent le couplage entre le cytosquelette et la MEC, permettant la migration et la traction cellulaire. Enfin, les traitements anticancéreux, notamment la radiothérapie et la chimiothérapie, modifient le microenvironnement tumoral et peuvent favoriser des processus d'invasion secondaire (d'après Tamai et al., 2022).

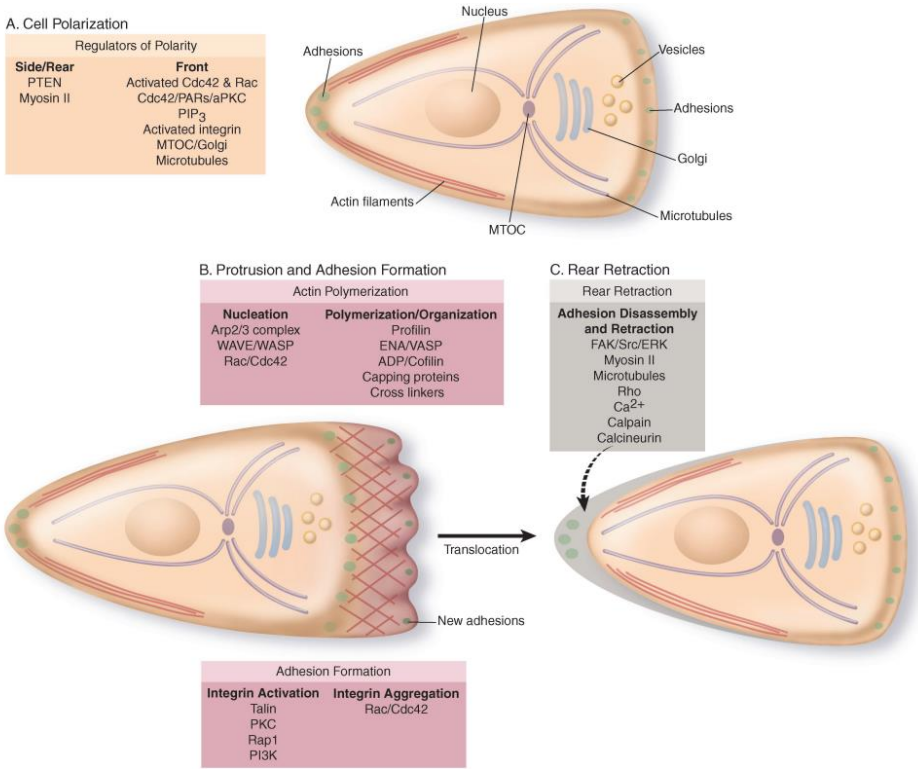


Figure 7 : Organisation moléculaire de la migration cellulaire : polarité front–arrière et dynamique des protrusions et de la rétraction

Schéma illustrant les étapes clés de la migration cellulaire et l'organisation asymétrique des compartiments frontaux et postérieurs. (A) La polarisation cellulaire repose sur une distribution spatiale différenciée des régulateurs moléculaires : le front migratoire est caractérisé par l'activation de Rac1 et Cdc42, associée à la signalisation PIP3 et à l'organisation des microtubules depuis le centrosome/Golgi, tandis que l'arrière de la cellule est dominé par la contractilité acto-myosine dépendante de la myosine II et de PTEN. (B) Au front, la formation de protrusions repose sur la polymérisation de l'actine, initiée par les complexes Arp2/3 et WAVE/WASP sous le contrôle de Rac1/Cdc42, suivie de l'organisation et de l'élongation des filaments d'actine. Parallèlement, la formation d'adhésions focales implique l'activation et l'agrégation des intégrines. (C) À l'arrière, le désassemblage des adhésions et la rétraction cellulaire sont régulés par des voiess impliquant notamment RhoA, la myosine II et des signaux calciques, permettant la translocation cellulaire. L'ensemble de ces processus coordonnés assure une migration directionnelle efficace (d'après Ridley et al., 2003).

4.2.3 Plasticité cytosquelettique

Des contraintes thérapeutiques, comme l'irradiation, peuvent modifier la migration des cellules tumorales. En effet, elle réorganise le cytosquelette d'actine et peut augmenter la migration. Cet effet repose notamment sur l'activation des GTPases Rho. En particulier, Rac1, qui contrôle la polymérisation de l'actine et la formation de protrusions, joue un rôle central. Xu et al. (2025) l'ont montré dans des cellules de carcinome hépatocellulaire : après irradiation, Rac1 est activée. Il en résulte une réorganisation du cytosquelette, une augmentation de la migration, ainsi que l'activation de voies anti-apoptotiques (Xu et al., 2025). À l'inverse, selon les modalités d'irradiation,

les formes actives de Rac1 et de RhoA peuvent être dégradées. Dans ce cas, les protrusions sont moins bien formées et la migration diminue (Lawson et al., 2018 ; Fujita et al., 2015). Ainsi, ces travaux soulignent la sensibilité de la dynamique de l'actine aux signaux de stress génotoxique.

4.2.4 Adaptation mécanique et formine

Dans le glioblastome, l'infiltration dépend d'une adaptation mécanique liée à l'actine. À ce titre, les cellules les plus invasives expriment fortement la formine FMN1, qui favorise la formation de filaments linéaires longs et cohésifs (Monzo et al., 2021). Plus précisément, les structures générées par FMN1 forment des faisceaux parallèles. Elles soutiennent des protrusions persistantes, transmettent les forces et augmentent la rigidité cellulaire. En conséquence, sa déplétion désorganise l'actine, réduit la stabilité des protrusions et diminue la motilité. À l'inverse, sa surexpression renforce l'élongation des filaments, la persistance directionnelle et l'adaptation mécanique. Ainsi, la régulation par FMN1 apparaît comme un déterminant majeur de la plasticité migratoire et de l'invasivité du glioblastome (Monzo et al., 2021).

4.3 Les différents modes et types de migration des cellules tumorales

Les cellules cancéreuses ne migrent pas toutes de la même manière. Ces comportements complexes dépendent à la fois de l'identité cellulaire et des contraintes mécaniques et architecturales imposées localement par le microenvironnement (Friedl et al., 2011). Dans les cancers, on décrit classiquement deux grands modes de migration : la migration individuelle et la migration collective. Dans le glioblastome, les mouvements collectifs dominent dans les régions périphériques et péri-nécrotiques, tandis que des formes de migration individuelle, ou hybrides, sont plus souvent observées dans le corps calleux et les espaces périvasculaires (Martınez-Gonzalez et al., 2010 ; Suarez-Meade et al., 2026). Ces deux modes de migration s'appuient sur des mécanismes cellulaires et moléculaires, notamment de types mésenchymateux et/ou amiboïdes, qui sont différents tant au point de vue morphologique que moléculaire.

4.3.1 Les modes de migration cellulaire

4.3.1.1 La migration individuelle

Dans le glioblastome, certaines cellules quittent la masse tumorale pour envahir les tissus adjacents, notamment lors de l'expansion périphérique. Ce processus repose sur une adaptation du déplacement aux contraintes physiques du microenvironnement (Harwood et al., 2025). Au front d'invasion, une fraction de cellules adopte un rôle de « leader cells ». Elles présentent des protrusions riches en actine F et une forte capacité de remodelage de la matrice extracellulaire. Ainsi, en exploitant les zones de moindre résistance, elles guident les cellules suiveuses et facilitent l'invasion collective (Vilchez Mercedes et al., 2021).

Par ailleurs, les cellules tumorales sécrètent des signaux chimioattractants qui orientent la migration vers des zones déjà infiltrées (Roussos et al., 2011). Des approches multi-échelles ont montré que, dans des modèles sphéroïdaux de glioblastome, une fraction des cellules situées en périphérie se détache et envahit progressivement la matrice environnante, notamment lorsque celle-ci est enrichie en composants de la matrice extracellulaire cérébrale tels que l'acide hyaluronique (Safarians et al., 2023 ; Chen et al., 2018). Ces données indiquent un comportement infiltrant précoce à l'échelle unicellulaire. En l'absence d'interactions cellule/cellule, l'invasion repose sur une migration individuelle dépendante des interactions cellule/matrice, de la contractilité et du remodelage matriciel. Dès lors, selon les contraintes mécaniques, cette migration adopte des modes mésenchymateux ou amiboïdes.

4.3.1.2 La migration collective

La migration collective correspond à un déplacement coordonné de cellules maintenant des contacts intercellulaires. Essentielle au développement, elle est réactivée dans les tumeurs et contribue à l'invasion locale (Liu et al., 2026). Contrairement à la migration individuelle, toutes les cellules ne sont pas directement en contact avec la MEC, certaines interagissant surtout avec leurs voisines. Dans le glioblastome, ce mode est fréquent : des « leader cells » initient l'infiltration en explorant le microenvironnement, en formant des protrusions et en remodelant la MEC, notamment *via* des métalloprotéases. Dans leur sillage, les cellules suiveuses progressent en conservant des jonctions stables.

Des analyses de vidéomicroscopie tridimensionnelle ont confirmé que ce déplacement collectif s'effectue tout en maintenant des contacts cellule-cellule, traduisant une organisation multicellulaire cohésive au cours de l'invasion (Jo et al., 2024 ; Ozturk et al., 2020). La cohésion et la coordination des cellules reposent sur des jonctions intercellulaires assurant adhésion et transmission des forces. Les jonctions adhérentes, organisées par les cadhérines et leurs partenaires (β-caténine, p120-caténine), stabilisent des contacts dynamiques et ajustent les interactions mécaniques tout en modulant l'engagement des intégrines (Barcelona Estaje et al., 2024). Dans le GBM, leur inhibition perturbe la migration collective et favorise l'individualisation ; la perte de p120-caténine réduit notamment la progression tumorale in vivo (Gritsenko et al., 2020).

Les jonctions serrées contribuent également à cette coordination. Leur altération (ZO-1, ZO-2) désorganise les forces intercellulaires et diminue la directionnalité, tandis que leur intégrité synchronise le cytosquelette et le mouvement collectif (Tornavaca et al., 2015). Les jonctions communicantes, *via* la connexine 43 (Cx43), permettent des échanges de signaux, notamment calciques, impliqués dans la synchronisation migratoire (Espinoza et al., 2023 ; Ribeiro-Rodrigues et al., 2017). Dans le GBM, une faible expression de Cx43 favorise une migration individuelle, alors qu'une expression élevée renforce la migration collective et l'activité protéolytique (Aftab et al., 2019 ; Aftab et al., 2015 ; McCutcheon & Spray et al., 2022). De plus, la Cx43 cytoplasmique interagit avec les microtubules dans les CSG, soutenant survie et tumorigenicité. La perturbation réduit la formation de gliosphères et la croissance tumorale (Smyth et al., 2025), et diminue l'infiltration ainsi que les transferts calciques *in vivo* (Osswald et al., 2015). Ainsi, la migration collective peut adopter des architectures variées (feuillets, chaînes, amas), résultant d'un équilibre entre adhésions cellule/cellule, interactions avec la MEC, remodelage matriciel et contraintes mécaniques (Cheung & Horne Badovinac, 2025). Bien que plus lente, elle confère une robustesse à l'invasion tumorale dans des tissus denses.

4.3.1.3 Plasticité migratoire et états intermédiaires

Un mode migratoire qualifié d'intermédiaire existe aussi, dans lequel des cellules se déplacent de manière individuelle tout en s'inscrivant dans des flux multicellulaires orientés. Dans ce contexte, chaque cellule conserve une autonomie mécanique, son cytosquelette générant indépendamment des forces de traction sur la matrice extracellulaire, tandis que des contacts cellule-cellule faibles et

transitoires assurent une coordination minimale du déplacement. Ce compromis fonctionnel place ce mode de migration à l'interface entre les migrations strictement individuelle et collective. L'organisation du flux repose sur des mécanismes de guidage par contact et peut être renforcée par des signaux chimiotactiques relayés au sein du groupe, permettant l'alignement directionnel des cellules en mouvement. La brièveté des adhérences intercellulaires, associée à l'indépendance contractile de chaque cellule, confère à ce mode migratoire une efficacité élevée, caractérisée par des vitesses supérieures à 1 µm/min. De tels flux multicellulaires ont été observés in vivo dans des modèles orthotopiques de glioblastome (Friedl et al. 2012, Cheung et al., 2025).

4.3.2 Les types de migration cellulaire

Outre le fait que les cellules puissent alterner entre un mode de migration individuelle ou collective en fonction du temps et du microenvironnement, il existe également deux grands types de migration s'appuyant sur des mécanismes moléculaires spécifiques qui, comme les modes de migration, sont mise en œuvre en fonction et en réponse à de nombreux paramètres internes ou externe à la cellule. Cette plasticité migratoire assimilée à une capacité d'adaptation confère aux cellules tumorales de GBM un avantage certain qui favorisent leur infiltration et leur résistance aux traitements.

4.3.2.1 La migration mésenchymateuse

La migration mésenchymateuse est le mode le plus fréquent des cellules tumorales. Elle se caractérise par une dépendance aux adhérences focales, une morphologie allongée et un remodelage protéolytique actif de la MEC (Figure 8). Ainsi, les intégrines assurent l'ancrage, tandis que l'actomyosine génère la traction et oriente la cellule (Navratil et al., 2025). Le déplacement débute par des protrusions riches en actine (lamellipodes, filopodes) qui permettent l'établissement d'adhérences focales reliant actine et MEC. La contractilité génère des forces de traction dynamiques, régulées par des oscillations mécanotransductrices impliquant FAK, paxilline et vinculine (Fernández Yagüe et al., 2025). Par ailleurs, ces adhérences servent de plateformes de signalisation et de protéolyse, facilitant le remodelage matriciel et la migration en milieu dense (Wang et al., 2012 ; Nagano et al., 2012). Cependant, ce mode reste relativement lent en raison du renouvellement progressif des adhérences. Dans le GBM, des modèles 3D montrent que les cellules

leaders adoptent majoritairement ce phénotype. Ce comportement s'accompagne d'une polarisation accrue et d'une activation des voies d'adhésion. En particulier, le remodelage du collagène VI augmente la rigidité matricielle, active les intégrines et les voies mécanosensibles (FAK, Src), et favorise l'invasion (Cha et al., 2024). Ainsi, l'interaction cytosquelette/adhérences/microenvironnement constitue un déterminant clé de l'invasion glioblastomale.

4.3.1.2 La migration amiboïde

La migration amiboïde est associée à des cellules avec une morphologie arrondie, avec peu d'adhérence à la MEC et des changements de forme rapides. Initialement décrite chez les amibes, elle est aussi observée chez des cellules très mobiles, dont certaines cellules cancéreuses (Paluch et al., 2016). Dans ce cadre, des cellules de mélanome peuvent migrer sans dégrader la matrice en utilisant des blebs membranaires, protrusions sphériques et transitoires permettant de progresser dans des environnements denses (Driscoll et al., 2024). Ainsi, ce mode est rapide, flexible et complémentaire de la migration mésenchymateuse (Figure 8). Contrairement à cette dernière, il dépend peu des adhérences intégrine/MEC et de la protéolyse. La propulsion repose principalement sur une forte contractilité actomyosine et la déformation cellulaire, permettant l'infiltration des cellules (Driscoll et al., 2024). De plus, le niveau de contractilité module la formation de blebs, transitoires ou stables, issus d'un décollement local membrane/cortex (García Arcos et al., 2024). Dans certains cas, une augmentation de la pression intracellulaire contribue à la progression en déformant la matrice (Liu et al., 2015). Ce mode de migration confère un avantage adaptatif en permettant aux cellules de contourner les contraintes mécaniques et de s'affranchir des mécanismes dépendants des adhérences et de la protéolyse, contribuant ainsi à la plasticité invasive tumorale (Paňková et al., 2010). Enfin, un mode amiboïde adaptatif, dit « inchworm », combine adhérences transitoires à l'avant et contraction à l'arrière via l'actomyosine. Ce mécanisme, dépendant de ROCK et de la myosine II, repose sur des cycles d'ancrage/contraction sans larges lamellipodes et illustre la plasticité de ce mode migratoire (Paluch et al., 2016).

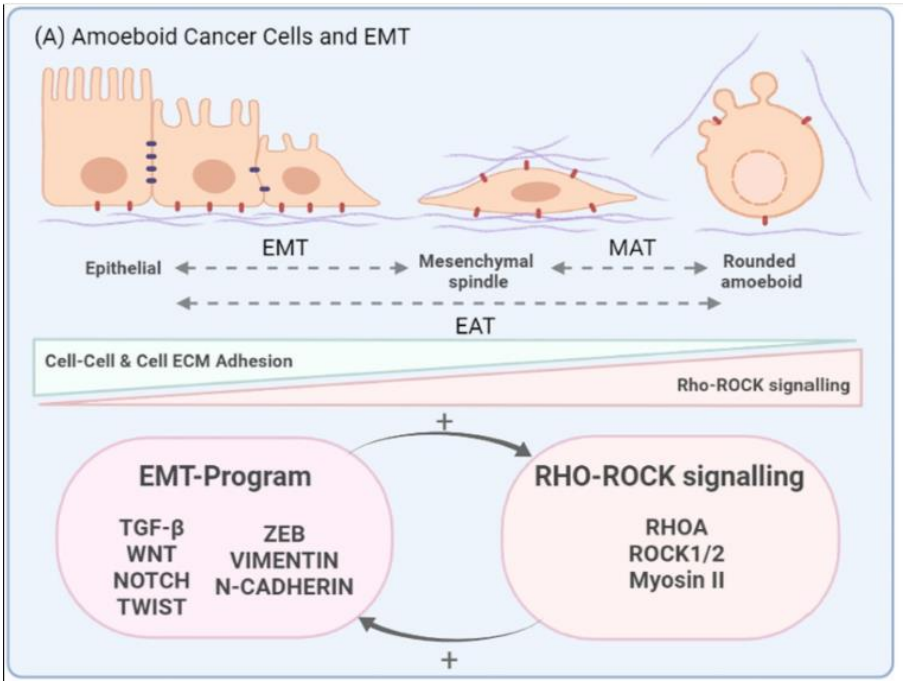


Figure 8 : Plasticité des modes de migration tumorale : transition EMT–amiboïde et caractéristiques des cellules cancéreuses amiboïdes

Schéma illustrant la plasticité des cellules tumorales au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et de la transition mésenchymo-amiboïde (MAT). Les cellules épithéliales subissent une EMT pour acquérir un phénotype mésenchymateux allongé, caractérisé par une augmentation de la motilité et une modification des interactions cellule–cellule et cellule–matrice extracellulaire (MEC). Ces cellules peuvent ensuite adopter un mode de migration amiboïde, associé à une morphologie arrondie et à une contractilité accrue. Cette plasticité repose sur l'interaction entre le programme EMT (TGF-β, WNT, NOTCH, TWIST, ZEB, vimentine, N-cadhérine) et la signalisation RHO–ROCK (RHOA, ROCK1/2, myosine II), qui régule la contractilité acto-myosine (d'après Graziani et al., 2022).

4.4 Interaction cellules tumorales et MEC

4.4.1 Composition et propriété de la matrice extracellulaire du GBM

Dans le GBM, la MEC tumorale est remaniée. Ainsi, elle devient plus abondante, dense et rigide, avec un enrichissement en ténascine C, fibronectine et collagène IV, ce qui reconfigure les interactions cellule/matrice et favorise l'invasion (Winkler et al. 2020 ; Miroshnikova et al., 2016). Dans les gliomes récurrents, cette rigidification est associée à des phénotypes plus infiltrants et à une progression accrue, plaçant le remodelage matriciel au cœur de la récidive. Au-delà de la contrainte mécanique, la rigidité conditionne durablement les cellules vers un état migratoire.

En effet, une rigidité hétérogène (cœur plus souple, périphérie plus rigide) favorise l'émergence de phénotypes invasifs persistants *via* une mémoire mécanique. Dès lors, des cellules exposées à un substrat rigide conservent un programme pro-migratoire, possiblement *via* des mécanismes transcriptionnels et épigénétiques, contribuant à la formation de niches invasives et résistantes aux marges tumorales (Miroshnikova et al. 2016).

4.4.2 Architecture matricielle et stratégies migratoires des cellules de glioblastome

Au-delà de sa composition, la géométrie tridimensionnelle de la MEC influence fortement l'invasion des gliomes. Ainsi, son organisation orientée et structurée guide les contacts cellule/matrice, la polarisation et la persistance directionnelle. De plus, cette architecture est activement remodelée par les cellules tumorales. Dans ce cadre, les cellules de GBM déposent du collagène VI, augmentant la rigidité locale et activant une mécanosignalisation dépendante des intégrines et de β-caténine, ce qui favorise l'invasion (Cha et al., 2024). Dès lors, l'invasion dépend autant de la matrice que de sa reconfiguration par les cellules. De manière cohérente, des sphéroïdes U87 montrent une invasion plus profonde et individuelle dans des matrices de collagène I organisées, alors que des matrices riches en acide hyaluronique induisent une infiltration plus limitée mais plus collective (Pereira et al., 2020). Ainsi, la MEC oriente un choix de mode migratoire selon sa topographie et sa composition. Dans des modèles tridimentionels plus physiologiques, comme les tumoroïdes ou les organoïdes cérébraux, il coexiste différents modes de migration, associés à des interactions dynamiques cellule/cellule et cellule/matrice difficilement observables en conditions 2D. Ces approches soulignent le rôle central de l'architecture tridimensionnelle dans l'invasion du glioblastome (Linkous et al., 2019 ; Jacob et al., 2020 ; Azzarelli, 2020).

4.4.3 Interactions cellules/MEC impactant la migration des cellules de glioblastomes

4.4.3.1 Définition générale de l'adhésion cellule/MEC

Lors d'une migration individuelle, les cellules tumorales s'ajustent aux contraintes du microenvironnement extracellulaire. Ainsi, elles interprètent la rigidité et la composition de la MEC pour moduler leurs forces de traction. Cette interface repose sur les intégrines, qui assurent une connexion dynamique entre la matrice et le cytosquelette. Au fur et à mesure, l'engagement des intégrines induit la formation de complexes d'adhésion, initialement instables puis maturant en

adhérences focales selon les contraintes mécaniques. La rigidité matricielle et la contractilité cellulaire contrôlent leur stabilisation et leur renouvellement, permettant une mécanosensation et une mécanotransduction adaptées aux tissus hétérogènes (Mierke, 2024).

Dans le GBM, cette dynamique se traduit par une forte plasticité migratoire des CSG. À l'image des progéniteurs neuraux, elles empruntent différentes voies anatomiques (vaisseaux, fibres myélinisées, interfaces glio-vasculaires) et ajustent en continu leurs forces d'adhérence et de traction. Dès lors, leur infiltration repose sur une intégration de la mécanosensation dépendante des intégrines, de la signalisation pro-migratoire, de la guidance chimiotactique et de la protéolyse matricielle, favorisant une invasion diffuse et persistante (Gupta R et al., 2024).

4.4.3.2 Intégrines : une interface mécano-chimique entre la cellule tumorale et la matrice extracellulaire (MEC)

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimères, composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β. Plus d'une vingtaine de combinaisons fonctionnelles permettent de reconnaître des motifs spécifiques de la MEC. Parmi ces motifs, la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) est particulièrement fréquente, présente dans la fibronectine, la laminine, certains collagènes, les ténascines et la vitronectine. Les intégrines assurent un couplage direct entre la MEC et le cytosquelette d'actine, jouant un rôle central en mécanosensation et en transduction de signaux. En conséquence, elles régulent la polarité, la survie, la migration et l'invasion. Leur activation induit la formation de complexes d'adhésion focale (FAK, Src, protéines adaptatrices), intégrant les signaux mécaniques et biochimiques du microenvironnement (Dibus M et al., 2024 ; Figure 9).

4.4.3.2.1 Reprogrammation des intégrines dans le glioblastome et lien avec l'état souche

Dans le GBM, le profil d'expression des intégrines est très reconfiguré. Ainsi, certains hétérodimères, comme αvβ3, sont enrichis aux adhérences focales et associés à une agressivité accrue, notamment *via* le renforcement du phénotype infiltrant (Echavidre et al., 2022). Par ailleurs, certaines intégrines jouent des rôles spécifiques selon les sous-populations. L'intégrine α6, fortement exprimée dans une fraction des CSG, soutient la prolifération, le maintien de l'état souche et la survie après traitement, contribuant à la résistance thérapeutique (Franco et al., 2024).

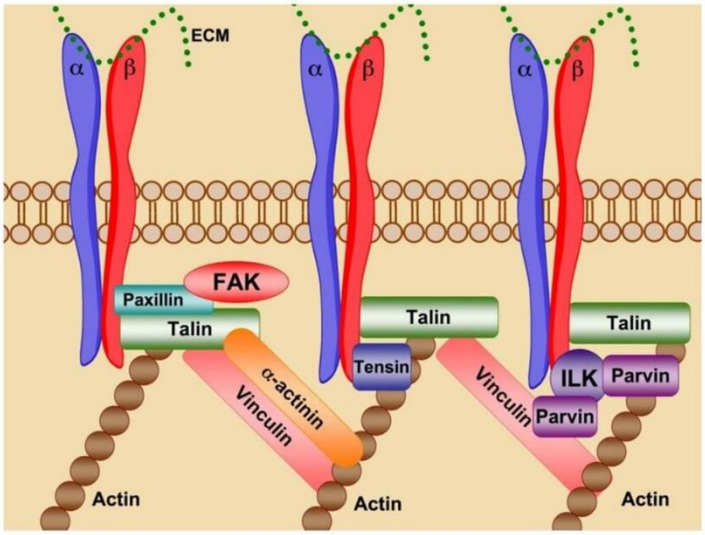


Figure 9 : Organisation des complexes d'adhésion focale et couplage intégrines–cytosquelette d'actine

Schéma illustrant l'organisation des intégrines au sein des complexes d'adhésion focale et leur rôle dans le couplage entre la matrice extracellulaire (MEC) et le cytosquelette d'actine. Les intégrines, hétérodimères composés de sous-unités α et β, interagissent avec les ligands de la MEC et recrutent des protéines adaptatrices intracellulaires telles que talin, paxillin et tensin. Ces complexes permettent l'ancrage des intégrines aux filaments d'actine via des protéines de liaison comme la vinculine et l'α-actinine. L'activation des intégrines s'accompagne du recrutement de kinases, notamment FAK, contribuant à la signalisation intracellulaire. L'ensemble de ces interactions assure la transmission des forces mécaniques et l'intégration des signaux biochimiques, régulant la migration, la polarité et l'invasion cellulaire (d'après Millard et al., 2011).

De son côté, l'intégrine α3 module indirectement les signaux pro-migratoires et pro-invasifs en influençant la maturation de β1 et la survie cellulaire (Kuranaga Y et al., 2024). À cela s'ajoute une forte hétérogénéité d'expression, notamment pour α5 dans les CSG, dépendante du microenvironnement et de conditions comme l'hypoxie. Ainsi, les cellules de GBM ajustent leurs propriétés d'adhérence et leurs modes de migration en fonction des contraintes locales (Messe et al., 2024). Enfin, les intégrines coopèrent avec d'autres molécules d'adhésion, comme la N-cadhérine, et activent des voies pro-survie et pro-migratoires, notamment ERK (Bremmer et al., 2015). Dès lors, elles établissent un lien fonctionnel entre ancrage matriciel, maintien de l'état souche et invasion tumorale.

4.4.3.2.2 La répartition spatiale et fonctionnelle des intégrines

La contribution des intégrines à l'invasion ne dépend pas uniquement de leur niveau d'expression. En effet, leur trafic et leur distribution intratumorale modulent directement le phénotype infiltrant.

Certains hétérodimères jouent des rôles spécifiques. L'intégrine α3β1 agit comme un régulateur majeur de la migration, tandis que αvβ3 se concentre au front d'invasion et coopère avec MMP -2, soulignant un couplage entre adhésion et dégradation matricielle. À l'inverse, αvβ5 prédomine dans les régions centrales, suggérant une organisation spatiale adaptée aux contraintes locales (Echavidre et al., 2022). Par ailleurs, la migration impose un renouvellement continu des contacts : les intégrines sont internalisées puis recyclées vers les zones de protrusion. Ce trafic, dépendant du contexte, diffère selon les hétérodimères : αvβ3 est majoritairement recyclée en 2D, tandis que α5β1 l'est en 3D dans des matrices riches en fibronectine. Ainsi, ce remodelage dynamique du trafic intégrine-dépendant constitue un déterminant clé de la plasticité migratoire des cellules tumorales (Haake, 2024).

4.4.3.2.3 Modules intégrines/actine spécifiques de la migration des cellules souches de glioblastome

L'importance du couplage intégrines/actine/adhérences focales est mise en évidence par Volovetz et al., qui combinent criblages génétiques, analyses transcriptomiques et tests de migration en 2D/3D afin d'identifier des régulateurs spécifiques de la motilité des CSG (Volovetz et al., 2020). Cette approche révèle des modules conservés impliquant la nucléation de l'actine (Arp2/3), l'organisation corticale et des protéines d'échafaudage (Liprin-α1, LIMA1), essentielles à l'ancrage de l'actine aux complexes d'adhérence riches en intégrines et en FAK. Leur invalidation entraîne une perte de polarité, une instabilité des protrusions et un défaut de renouvellement des adhérences, réduisant fortement la migration, la persistance directionnelle et l'invasion en 3D, sans altérer la viabilité. Ces défauts traduisent une altération de la transmission des forces et du remodelage matriciel. Ainsi, la plasticité invasive des CSG repose sur l'intégration étroite entre signalisation intégrine-dépendante, dynamique de l'actine et organisation des adhérences focales. De plus, ces programmes, partiellement hérités des CSN, sont amplifiés dans le contexte tumoral, renforçant l'adaptation mécanique et l'infiltration diffuse (Volovetz et al., 2020).

4.4.3.3 Les récepteurs de l'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (AH) est un composant majeur de la MEC cérébrale. Ainsi, il contribue à l'architecture tridimensionnelle du tissu et à ses propriétés mécaniques. Les cellules de gliome exploitent cette composante *via* des récepteurs comme CD44 et RHAMM, facilitant leur adhérence

et leur progression (Safarians et al., 2023). Dans les gliomes de haut grade, l'axe AH-CD44 est associé à une invasion accrue. RHAMM est enrichi au front invasif, tandis que CD44 prédomine au centre tumoral. Sur le plan mécanistique, CD44 agit *via* le cytosquelette et des modules de signalisation, alors que RHAMM active FAK, MAPK et PI3K. Dans les deux cas, ces voies convergent vers une réorganisation de l'actine et des adhérences focales, soutenant la motilité. Ainsi, dans des modèles de sphéroïdes, l'interaction AH-CD44 contrôle directement l'invasion en contexte 3D (Safarians et al., 2023).

4.4.3.4 Rigidité de la MEC et adhérences focales

Les adhérences focales sont des structures mécanosensibles reliant la MEC au cytosquelette d'actine *via* les intégrines et des protéines adaptatrices (taline, vinculine, FAK). Elles assurent l'ancrage, la transmission des forces et l'intégration de signaux régulant les fonctions cellulaires. Leur dynamique dépend fortement de la rigidité de la MEC : des matrices rigides augmentent leur nombre, leur stabilité et les forces de traction, orientant les cellules vers des environnements plus contraints (Holland et al., 2024 ; Katoh, 2025). Lors de la migration, leur organisation devient asymétrique : formation à l'avant, désassemblage à l'arrière, avec un recyclage local alimentant les protrusions (Carney et al., 2025 ; Keijzer et al., 2025). Ce cycle est régulé par les contraintes mécaniques, qui contrôlent stabilisation ou désassemblage et ajustent l'organisation du cytosquelette (Park et al., 2025). Au niveau moléculaire, la rigidité active FAK, ERK1/2 et RhoA/ROCK, augmentant la contractilité. La maturation des adhérences dépend de l'engagement de l'axe actine/taline/intégrine, avec un seuil de rigidité nécessaire à leur stabilisation *via* la liaison taline/vinculine (Holland et al., 2024 ; Tapia Rojo et al., 2025 ; Katoh, 2025). Ainsi, les adhérences focales fonctionnent comme des capteurs mécaniques dynamiques, adaptant leur organisation aux contraintes du microenvironnement.

4.4.3.5 Rigidité matricielle et invasion des cellules de glioblastomes

La migration des cellules de GBM s'inscrit dans un microenvironnement rigidifié, lié à la compression tissulaire et au remodelage de la MEC. Ainsi, l'augmentation de rigidité favorise leur motilité et accélère leur migration. Ce phénomène repose sur une transmission efficace des forces *via* les intégrines, les adhérences focales, FAK, les GTPases Rho et la myosine II, renforçant la contractilité actomyosine (Mierke et al., 2017). En particulier, des matrices rigides enrichies en fibronectine

stabilisent les adhérences focales et soutiennent migration et prolifération (Doyle et al., 2015 ; Longstreth et al., 2024).

Par ailleurs, la rigidité module des récepteurs comme EGFR, en amplifiant sa phosphorylation et la signalisation PI3K/Akt, avec un regroupement aux adhérences, illustrant le couplage mécanosignalisation/migration (Shaikh et al., 2025 ; Zhang et al., 2024 ; Schwartz et al., 2018). Cependant, cette relation n'est pas linéaire. Une rigidification locale, notamment *via* le collagène VI, active des voies pro-migratoires dépendantes des intégrines et de β-caténine, préparant le microenvironnement à l'invasion (Cha et al., 2024 ; Wishart et al., 2020 ; Samuel et al., 2011). Ainsi, la rigidité de la MEC régule de manière fine migration, prolifération et signalisation, avec l'existence d'un optimum mécanique pour la migration des CSG (100 kPa pour U251) (Bangasser et al., 2017).

4.5 L'invasion des cellules de glioblastome

L'invasion est un déterminant majeur du mauvais pronostic du GBM, en raison d'une infiltration diffuse du parenchyme cérébral. Si un schéma classique (détachement/adhésion/remodelage/migration) est souvent décrit, il reste incomplet dans ce contexte, où l'infiltration se fait sans altération massive du tissu (Giese et al., 1996). Ainsi, la modulation des adhésions joue un rôle central. Des régulateurs comme la SERPINE1, en condition hypoxique, diminuent l'E-cadhérine et augmentent la N-cadhérine, favorisant l'invasion, tandis que leur inhibition limite ce processus *in vivo* (Tao et al., 2026). De même, l'inhibition de CHI3L1 réduit N-cadhérine et VCAM-1, confirmant le rôle actif des cadhérines en contexte 3D (Rusak et al., 2025). Par ailleurs, les métalloprotéases dégradent ces jonctions, facilitant le détachement cellulaire (Tao et al., 2026). Cependant, la N-cadhérine agit aussi comme un régulateur dynamique du mode migratoire : polarisée, elle favorise une migration collective ; modulée, elle s'associe à des trajectoires individuelles (Kim et al., 2024). Une fois engagée, la migration reste coordonnée et dépend d'interactions avec les cellules voisines et la MEC, principalement *via* cadhérines et intégrines (Ridley et al., 2003 ; Martinez-Rico et al., 2010). Ces dernières ajustent en continu l'adhérence et activent des voies intracellulaires, notamment *via* FAK. Ainsi, l'inhibition de FAK,

combinée à MEK, réduit l'invasion et la croissance des CSG, soulignant son rôle clé dans le phénotype invasif (Furqan et al., 2025).

4.5.1 Transition épithélio-mésenchymateuse et invasion du glioblastome

La migration tumorale s'accompagne d'une plasticité phénotypique souvent rapprochée d'une transition de type épithélio-mésenchymateuse (TEM), marquée par la perte d'E-cadhérine et l'augmentation de N-cadhérine/vimentine, sous le contrôle des voies Wnt/β-caténine, TGF-β et PI3K/Akt via SNAIL, ZEB et TWIST (Xia et al., 2026 ; Figure 10). Ces programmes reconfigurent directement le cytosquelette : les Rho-GTPases (RhoA, Rac1, Cdc42), modulées notamment par ARHGAP12/29, contrôlent protrusions, polarité et invasion (Cheng et al., 2025 ; Al-Koussa et al., 2020). Dans ce cadre, la vimentine joue un rôle actif en organisant actine, microtubules et adhérences (Pradeau-Phélut, 2024).

Dans le GBM, cette plasticité est amplifiée par le microenvironnement. L'hypoxie (HIF-1α) et des facteurs comme TGF-β, EGF ou PDGF activent PI3K/AKT, MAPK et NF-κB, stimulant les MMP (MMP-2/9) et l'invasion (Tan et al., 2025 ; Zheng et al., 2025 ; Bou-Gharios et al., 2024). Cependant, il s'agit moins d'une TEM classique que d'états intermédiaires plastiques, avec activation partielle des programmes SNAIL/ZEB/TWIST (Xia et al., 2026). Certaines CSG, notamment les cellules $CD44^+$ mésenchymateuses, concentrent cette plasticité, combinant migration, résistance et adaptation (Bhat et al., 2013 ; Mooney et al., 2016 ; Brown et al., 2015). De plus, l'irradiation agit comme un facteur de reprogrammation, caractérisé par une diminution de l'E-cadhérine et une augmentation de l'expression et de l'activité des MMP, ce qui favorise la migration des cellules survivantes après traitement (Franco et al., 2024 ; Wild-Bode et al., 2001).Enfin, des régulateurs comme STAT3, C/EBPβ et NF-κB structurent ces programmes invasifs, enrichis au front tumoral et associés à des signatures inflammatoires et pro-survie (Gray et al., 2014 ; Yang et al., 2024 ; Xu et al., 2024).

4.5.2 Voies moléculaires impliquées dans l'invasion du GBM

Dans le GBM, il n'existe pas de voie de signalisation dominante. Au contraire, les cellules tumorales mobilisent des réseaux multiples et interconnectés (PI3K/Akt, Wnt/β-caténine, Hedgehog, TGF-β, RTK), dont l'activation conjointe soutient à la fois croissance et invasion (Khabibov et al., 2022 ; Gera

et al., 2025 ; Xiao et al., 2025). Ainsi, ces voies ne se limitent pas à la prolifération mais engagent des programmes de plasticité, liés notamment à des états de type EMT et à l'adaptation au microenvironnement. Les principales voies impliquées, leurs mécanismes d'activation, leurs effecteurs et leur contribution à l'invasion du glioblastome ont été récapitulé dans le Tableau 6.

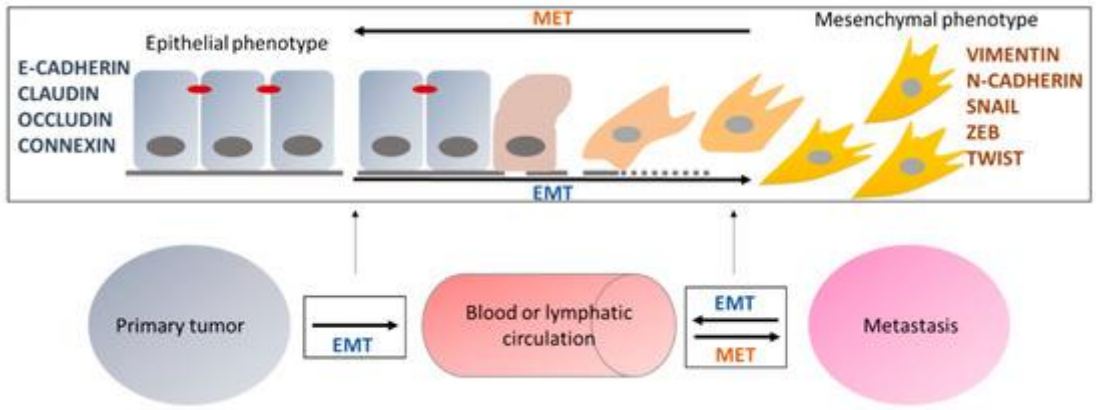


Figure 10 : ETM/MET, plasticité phénotypique au cours de la dissémination tumorale

Schéma de la transition épithélio-mésenchymateuse (ETM) et de son retour possible (MET). Les cellules épithéliales, marquées notamment par l'E-cadhérine, les claudines, les occludines et les connexines, relâchent peu à peu leurs jonctions. Elles gagnent alors des traits mésenchymateux et une motilité accrue (vimentine, N-cadhérine ; SNAIL, ZEB, TWIST), ce qui facilite la sortie de la tumeur primaire et le passage dans la circulation. À distance, une MET peut se réactiver, permettant l'implantation locale et la formation de métastases (d'après Peixoto, 2019).

Dès lors, au-delà de ces voies de signalisation, l'invasion du glioblastome s'appuie également sur des structures physiques permettant une coordination active entre cellules tumorales. Dans ce contexte, les microtubes tumoraux (MT) apparaissent comme des acteurs centraux de cette plasticité invasive, en assurant à la fois la connectivité cellulaire et l'adaptation dynamique au microenvironnement.

Voie	Déclenchement (en amont)	Mécanismes moléculaires détaillés	Effecteurs (en aval)	Fonctions biologiques	Spécificités GBM / CSG	Impact sur invasion	Référence
RTK (EGFR, PDGFR, c-Met, MerTK)	Facteurs de croissance mutation EGFRvIII, perte PTEN	Activation RTK → phosphorylation → recrutement PI3K et GRB2 → activation cascades PI3K/Akt et Ras/MAPK	Akt, ERK, mTOR	Prolifération, survie, angiogenèse	EGFRvIII constitutif ; co-activation EGFR/c-Met MerTK régule mécanique	Augmente migration et invasion via MMP et cytosquelette	Barcan 2025 Yun 2024
PI3K/Akt/ mTOR	RTK activation, perte PTEN	PI3K → PIP3 → Akt → mTOR activation	MMP-2, MMP-9, protéines métaboliques	Survie, croissance, métabolisme	Hyperactivation fréquente GBM	Dégradation MEC et invasion accrue	Zheng 2025
MAPK/ERK	RTK activation	Ras → Raf → MEK → ERK phosphorylation	Facteurs transcriptionnels	Prolifération, migration	Interaction avec NF-κB	Augmente motilité et adaptation	Barcan 2025
Wnt canonique	Ligands Wnt, perte inhibiteurs	Stabilisation β-caténine → noyau → transcription	Cyclin D1, Axin2	Prolifération, stemness	Maintien CSG	Favorise invasion et plasticité	Guo 2025 Yuan 2024
Wnt non canonique	Wnt5a	Activation Rac1, voies polarité	SNAI1, MMP	Migration, polarité	Plasticité cellulaire	Favorise invasion sans β-caténine	Xue 2025
Hedgehog/ GLI1	SHH ligand	PTCH inhibition → SMO activation → GLI1 transcription	MYC, CCND1, FOXM1	Prolifération, stemness	tGLI1 spécifique GBM	Augmente invasion et angiogenèse	Doheny 2020 Yu 2025
NF-κB	RTK, cytokines, inflammation	Activation IKK → libération NF-κB → noyau	IL-6, IL-8, MMP, ICAM-1	Survie, inflammation	Sous-type mésenchymateux	Renforce invasion et remodelage MEC	Ghosh 2024
Rho/Rac/PAK	RTK, intégrines	Activation GTPases → remodelage actine	Actine, myosine	Migration, contractilité	Couplage mécanique	Contrôle direct motilité	Kariya 2025

Tableau 6: Voies de signalisation impliquées dans l'invasion des cellules de GBM

Ce tableau synthétise les principales voies de signalisation impliquées dans l'invasion des cellules de glioblastome (GBM) et des cellules souches de glioblastome (CSG), en détaillant leurs mécanismes d'activation, leurs effecteurs en aval et leurs fonctions biologiques associées. Les voies RTK (EGFR, PDGFR, c-Met), PI3K/Akt/mTOR et MAPK/ERK sont principalement activées par des facteurs de croissance et contribuent à la prolifération, la survie et la migration tumorale. Les voies de développement, telles que Wnt (canonique et non canonique) et Hedgehog/GLI1, participent à la plasticité cellulaire et au maintien des CSG. La voie NF-κB est impliquée dans l'inflammation et le phénotype mésenchymateux, tandis que la voie Rho/Rac/PAK régule directement la dynamique du cytosquelette et la motilité cellulaire. L'ensemble de ces voies converge vers des programmes moléculaires favorisant l'invasion tumorale, notamment via la dégradation de la matrice extracellulaire, la migration dirigée et le remodelage du cytosquelette.

4.6 Microtubes tumoraux (MT)

4.6.1 Les protrusions intercellulaires

4.6.1.1 Les tunneling nanotubes (TNT)

Les tunneling nanotubes (TNT) constituent une première catégorie de protrusions intercellulaires fines, généralement inférieures à 100 µm de longueur pour un diamètre de 50 à 200 nm. Ils ont été décrits pour la première fois par Rustom et al. en 2004 dans des cultures cellulaires *in vitro*, dans des cellules de phéochromocytome de rat (PC12) ainsi que dans d'autres lignées, comme des prolongements membranaires riches en actine, formés de novo, suspendus au-dessus du substrat et établissant une continuité cytoplasmique entre cellules (Rustom et al., 2004). Ces structures ont rapidement été reconnues comme un mode original de communication intercellulaire permettant le transfert d'organites, de vésicules et de signaux. Dans le GBM, Pinto et al., ont montré que des cellules souches de glioblastome dérivées de patients sont capables de former des TNT fonctionnels aussi bien en culture bidimensionnelle qu'au sein d'organoïdes tumoraux 3D reproduisant plusieurs caractéristiques structurales et hétérogènes de la tumeur d'origine (Pinto et al., 2021). Dans ce modèle, les TNT permettent notamment le transfert de mitochondries entre cellules tumorales, révélant l'existence d'une communication métabolique active (Pinto et al., 2021 ; Zurzolo et al., 2021). Au-delà des mitochondries, ces structures peuvent également véhiculer d'autres composants cytoplasmiques, ce qui contribue à renforcer le phénotype malin des cellules et favorise leur invasivité ainsi que leur résistance dans des conditions de stress, notamment en contexte d'irradiation ou d'hypoxie (Pinto et al., 2021 ; Zurzolo et al., 2021). Les TNT ne relient pas uniquement les cellules tumorales entre elles, mais peuvent aussi connecter les cellules de glioblastome à des cellules non tumorales du microenvironnement, en particulier les astrocytes. Un transfert de mitochondries tumorales vers ces cellules environnantes a ainsi été mis en évidence, suggérant une participation des TNT au remodelage métabolique du microenvironnement tumoral (Valdebenito et al., 2021).

4.6.1.2 Les microtubes tumoraux

La deuxième catégorie de protrusions intercellulaires identifiées, dénommées microtubes tumoraux (MT) se distinguent des TNT par leur prolongements plus longs, plus stables et organisés en réseaux multicellulaires complexes participant à la connectivité tumorale à longue distance.

Les MT ont été décrits pour la première fois par Osswald et al. en 2015 dans des modèles de gliome générés après xénogreffe intracérébrale de cellules de glioblastome dérivées de patient. Ces auteurs ont pu suivre la dynamique des MT par imagerie multiphotonique intravitale (Osswald, 2015). et décrivent de longs prolongements membranaires reliant les cellules d'astrocytome, mettant en évidence l'existence d'un réseau tumoral interconnecté et fonctionnel contribuant à la résistance thérapeutique, et proposent le terme de « tumour microtubes » pour désigner ces structures (Osswald et al., 2015).

Dans la suite de ce travail, nous nous intéresserons plus spécifiquement à ces microtubes tumoraux, en raison de leur rôle structurant dans l'organisation du réseau tumoral et dans les mécanismes de résistance qui y sont associés.

Ces MT sont caractérisés par un diamètre de 1 à 2 µm, et de longueur pouvant atteindre plusieurs centaines de micromètres (Osswald et al. 2016). Leur architecture repose sur un cytosquelette enrichi en actine et en microtubules, leur conférant une stabilité permettant l'établissement de contacts intercellulaires persistants, pouvant être maintenus pendant plusieurs mois *in vivo* (Osswald et al., 2015).

Ces structures assurent la circulation de petites molécules, telles que des ions et des petites molécules, par l'intermédiaire de jonctions communicantes riches en connexine 43 (Cx43), sans toutefois permettre le transfert d'organites (Osswald et al., 2015). La densité de ces prolongements est étroitement associée au degré d'agressivité tumorale (Osswald et al., 2016). Des travaux plus récents ont proposé que ces MT correspondent à une réactivation aberrante de réseaux neuronaux, dotés de propriétés de type cellule souche favorisant la résistance thérapeutique et la récidive tumorale (Wang et al., 2022).

4.6.2 Sous-types de MT et états cellulaires associés

4.6.2.1 Microtubes tumoraux (MT) non connectés

Sur le plan morphologique, les MT non connectés correspondent à des protrusions cellulaires isolées, ne formant pas de jonctions stables avec d'autres cellules tumorales. Sur le plan fonctionnel, ces structures sont principalement associées à des comportements invasifs et migratoires. Elles permettent aux cellules tumorales d'explorer leur microenvironnement et de s'infiltrer dans le tissu cérébral (Weil et al., 2017). Dès lors, elles participent directement à la dissémination tumorale. Sur le plan moléculaire, les cellules portant ces MT non connectés présentent fréquemment des signatures transcriptionnelles proches des progéniteurs neuraux, de type OPC/NPC, ainsi que l'activation de programmes neurodéveloppementaux (Venkataramani et al., 2022). Ce profil est cohérent avec un état cellulaire plus plastique et invasif.

4.6.2.2 Microtubes tumoraux (MT) connectés (interconnectés)

À l'inverse, les MT connectés établissent des jonctions physiques entre cellules tumorales et permettent la formation d'un réseau multicellulaire structuré. Sur le plan morphologique, ces prolongements s'interconnectent pour relier plusieurs cellules entre elles, constituant un réseau à l'échelle tumorale. Sur le plan fonctionnel, ce réseau permet une communication intercellulaire coordonnée et une homéostasie collective. Les cellules intégrées à ce réseau partagent des signaux et des ressources, ce qui contribue notamment à leur résistance aux traitements (Osswald et al., 2015). Sur le plan moléculaire, ces connexions reposent sur des jonctions communicantes enrichies en connexine 43 (Cx43), permettant le passage direct de petites molécules et d'ions entre cellules tumorales, ou entre cellules tumorales et astrocytes non néoplasiques. Par ailleurs, des jonctions adhérentes impliquant la N-cadhérine, la β-caténine et la p120-caténine participent à la stabilisation de ces contacts intercellulaires (Gritsenko et al., 2020).

4.6.3 Rôle des MT dans les gliomes

Les MT remplissent des fonctions distinctes selon leur organisation. Les MT connectés entre les cellules tumorales, jouent un rôle central dans le maintien et la réparation du réseau. À l'inverse, les MT non connectés favorisent l'invasion du parenchyme cérébral en soutenant la migration des

cellules tumorales le long des structures cérébrales préexistantes (Venkataramani et al., 2022 ; Osswald et al., 2015)

4.6.3.1 Fonctions cellulaires

4.6.3.1.1 Communication inter cellulaire

Les MT interconnectées assurent une communication directe entre les cellules tumorales gliales et avec les cellules du microenvironnement, en particulier les astrocytes réactifs et les cellules microgliales (Osswald et al., 2016). Des analyses en microscopie électronique ont également montré que les MT peuvent contenir des mitochondries et des microvésicules, suggérant l'existence d'une production locale d'ATP et d'un transport vésiculaire (Osswald et al., 2015). En revanche, ces structures permettent le transfert de petites molécules, notamment le Ca^{2+}, les miARN, l'ATP et l'AMP (Venkataramani et al., 2022). Parmi les échanges mis en évidence dans les TM, le calcium occupe une place centrale dans la communication intercellulaire, notamment électrique qui repose sur la présence d'ondes calciques intercellulaires (ICWs) qui propagent des signaux entre cellules *via* les jonctions communicantes pour coordonner des processus tels que la croissance, la différenciation et l'apoptose (Osswald et al., 2015). Hausman et al, rapportent qu'un sous-ensemble restreint de cellules de gliome est capable de présenter des oscillations calciques périodiques très régulières qui organisent la dynamique calcique des réseaux (Hausmann et al., 2023). Ces derniers sont organisés autour de quelques cellules centrales très connectées, et leur suppression désorganise fortement l'ensemble, alors que la suppression au hasard de cellules a peu de conséquence sur le réseau (Hausmann et al., 2023 ; Albert et al., 2000). Cette synchronisation des ICWs entre cellules tumorales est dépendante de Cx43 puisque la réduction de son expression l'altère fortement, soulignant l'importance de son rôle structural dans ces échanges. Ces signaux se propagent de manière bidirectionnelle le long des MT, garantissant une transmission fiable entre cellules (Osswald et al., 2015). Il est a noter que certaines signatures calciques activent les voies MAPK et NF-κB, contribuant à la progression tumorale (Hausmann et al., 2023). Dans l'ensemble, les MT et les ICWs constituent des éléments centraux de la communication intercellulaire dans les gliomes et participent directement à leur physiopathologie (Osswald et al., 2015 ; Hausmann et al., 2023).

4.6.3.1.2 Migration et Invasion

Des expériences d'ablation nucléaire par laser ont montré que les MT guident la reconstruction du réseau tumoral en dirigeant l'extension de prolongements vers les zones lésées et en permettant la migration de noyaux pour recoloniser ces régions. Un mécanisme similaire est observé après la mitose, où les cellules filles restent connectées et peuvent migrer le long des MT, facilitant ainsi la dissémination tumorale et la dynamique d'expansion du réseau tumoral (Osswald et al., 2015 ; Weil et al., 2017). Cette capacité de réparation et de renforcement de l'intégrité du réseau est absente dans les MT non connectés, soulignant le caractère spécifique et adaptatif des réseaux connectés (Venkataramani et al., 2022). Les cellules tumorales peuvent aussi exploiter ces interactions en transférant le cGAMP *via* les jonctions communicantes, ce qui active la voie cGAS–STING et induit la production de cytokines, notamment l'interféron α et le TNF, favorisant la croissance tumorale, la dissémination et la résistance aux traitements (Chen et al., 2018).

4.6.4 Régulation moléculaire et génétique de la formation des MT

À ce jour, plusieurs régulateurs moléculaires, dont GAP43, TTYH1, CHI3L1 (YKL-40) et NOTCH1, ont été identifiés comme des acteurs clés de la formation et du maintien des MT, soulignant l'implication de programmes neurodéveloppementaux dans l'organisation des réseaux tumoraux.

GAP43, fortement exprimée durant le développement du système nerveux central et localisée aux cônes de croissance axonaux, est induite par les facteurs neurotrophiques et régule la migration neuronale, tout en jouant un rôle central dans la biogenèse des MT (Skene et al., 1986 ; Hartl et al., 2019 ; Osswald et al., 2016 ; Wang et al., 2022). Son inhibition perturbe l'architecture des MT, freine l'invasion tumorale et s'accompagne d'un bénéfice de survie (Osswald et al., 2016).

TTYH1 est également impliqué dans la croissance des MT et dans le développement du système nerveux central (Stefaniuk et al., 2010 ; Jung et al., 2017). Son expression élevée dans les cellules non connectées retrouvée en front de migration de la tumeur, est associée à une motilité accrue, tandis que son inhibition réduit l'invasion et la colonisation cérébrale. A l'inverse, dans les cellules connectées entre elles au sein de la tumeur, TTYH1 apparaît comme un régulateur essentiel de la formation des MT : sa déplétion altère significativement leur développement, leur connectivité et

leurs fonctions, sans pour autant constituer à elle seule un facteur suffisant à leur induction (Jung et al., 2017).

CHI3L1 (YKL-40), impliquée dans l'inflammation, la réparation tissulaire et la tumorigenèse, régule la formation et la stabilité des réseaux de MT (Chang et al., 2024 ; Hai et al., 2024). Sa surexpression est associée à des modifications de l'expression de gènes et de protéines et à la phosphorylation de GAP43, caractéristiques des réseaux de MT connectés, faisant de CHI3L1 un marqueur robuste de la connectivité tumorale et un indicateur pronostique (Watson et al., 2023 ; Hai et al., 2024).

NOTCH1 limite la croissance des neurites et la formation des MT, et sa diminution favorise des réseaux multicellulaires connectés et augmente la radio-résistance, en particulier dans la niche périvasculaire (Jung et al., 2021 ; Wang et al., 2010).

Enfin, le statut 1p/19q module fortement l'organisation des MT. La codélétion 1p/19q, typique des oligodendrogliomes, est associée à des défauts des réseaux connectés et à une meilleure sensibilité aux traitements (Cairncross et al., 2013). À l'inverse, les oligodendrogliomes et les gliomes sans cette co-deletion1p/19q présentent des MT plus abondantes et plus longues, associées à un pronostic défavorable, favorisé par l'activation de voies liées à la croissance des neurites et à la synaptogenèse et l'implication de TTYH1 et TGFB1 dans la formation de MT invasives (Osswald et al., 2015 ; Joseph et al., 2022 ; Caja et al., 2015).

4.6.5 Transduction du signal intracellulaire

Les MT sont des structures cytosquelettiques spécialisées composées principalement de microtubules et de filaments d'actine, dont l'adaptation mécanique est essentielle à la stabilité et au remodelage des réseaux tumoraux (Osswald et al., 2015 ; Pettee et al., 2019 ; Horne et al., 2021). Le remodelage coordonné de ces deux systèmes permet aux cellules de gliome, qu'elles soient connectées ou non, de générer des forces mécaniques favorisant l'invasion de la matrice extracellulaire et des tissus environnants (Osswald et al., 2015 ; Ulrich et al., 2009). Ce remodelage est également nécessaire à une migration directionnelle reposant sur la polarisation cellulaire et le renouvellement des adhérences (Armento et al., 2017). Cette dynamique est largement contrôlée par les GTPases de la famille Rho, notamment Cdc42 et Rac1, dont la surexpression est associée à une invasivité accrue des cellules de gliomes (Horne et al., 2021 ; Al-Koussa et al., 2020 ; Okura et

al., 2016). Leurs effets sont relayés par des effecteurs tels que ROCK1/2, qui renforcent la contractilité actomyosine, et les formines mDia, qui contrôlent la polymérisation de l'actine et contribuent à la stabilisation des microtubules (Totsukawa et al., 2004 ; Palazzo et al., 2001 ; Zaoui et al., 2008). Dans ce contexte, des régulateurs de l'actine comme JMY constituent une interface entre signalisation nucléaire et organisation du cytosquelette, et peuvent participer à la plasticité requise pour l'extension et le remodelage des MT.

4.7. Effets de l'irradiation sur l'invasion des cellules de GBM

Chez les patients atteints de GBM, l'IRM de suivi après radiochimiothérapie révèle une infiltration tumorale persistante au sein des zones traitées, s'étendant au-delà de la masse visible et impliquant également les régions périphériques. Une approche radiomique basée sur l'IRM postopératoire a permis de cartographier cette infiltration : le volume des zones à haut risque est corrélé à une diminution de la survie globale (Cepeda et al., 2025). Ces données indiquent que l'infiltration microscopique persiste malgré le traitement et concerne aussi la périphérie des champs irradiés. Dès lors, l'irradiation, bien qu'efficace pour le contrôle local, n'élimine pas les cellules infiltrantes et pourrait même favoriser leur dissémination.

En cohérence, des travaux précliniques montrent que les radiations ionisantes augmentent le potentiel invasif des cellules de GBM. Les études initiales de Wild-Bode démontrent une augmentation de l'invasion des lignées U87 et LN229 après exposition aux rayons X (Wild-Bode et al., 2001). Ces résultats ont été confirmés par plusieurs analyses indépendantes, montrant une augmentation de la migration et/ou de l'invasion dans la majorité des modèles (Moncharmont et al., 2014 ; Wank et al., 2018 ; Gauthier et al., 2020). Ces mécanismes pourraient contribuer directement aux processus de récidive post-radiothérapie.

4.7.1 Influence de l'irradiation sur la motilité des cellules de glioblastome

4.7.1.1 Modification du déplacement cellulaire après irradiation

Les effets de l'irradiation sur la motilité de lignées cellulaires dérivées de GBM ont été étudiés à l'aide d'essais de migration de type Transwell, qui quantifient le passage cellulaire à travers une membrane en réponse à un gradient. Plusieurs travaux montrent une augmentation de la migration après irradiation. Seki et al. (2024) ont ainsi exposé des cellules A172 à une γ-irradiation et observé une augmentation significative du nombre de cellules migrantes. Cet effet s'accompagne d'un remodelage de l'actine, caractéristique d'un phénotype migratoire. Il est atténué par inhibition ou knockdown de RAGE, un récepteur membranaire de la superfamille des immunoglobulines capable de lier HMGB1 et d'activer des voies pro-migratoires telles que STAT3, indiquant l'implication de la voie HMGB1–RAGE–STAT3 (Seki et al., 2024). L'effet de l'irradiation apparaît dépendant de la dose. Nguemgo Kouam et al. (2018) montrent, dans les lignées U-87 MG et U-373 MG, une augmentation de la vitesse et de la distance parcourue après 0,5 et 2 Gy, alors qu'une dose plus élevée (8 Gy) n'induit pas cette augmentation, voire la réduit. Ces données indiquent une stimulation de la motilité à doses modérées mais pas à forte dose (Nguemgo Kouam et al., 2018). Des résultats similaires, obtenus dans les CSG montrent qu'une irradiation entre 0,5 et 1,5 Gy augmente la vitesse de migration et l'invasion des lignées TG1N et TG16, *in vitro* et *in vivo*. Ce phénotype repose sur une accumulation nucléaire transitoire de HIF-1α induisant l'expression de JMY, impliqué dans la nucléation de l'actine et la migration cellulaire (Gauthier et al., 2020). Ainsi, l'irradiation ionisante est capable de stimuler la migration et l'invasion des cellules de GBM *via* des mécanismes dépendants de la dose et impliquant des voies moléculaires spécifiques.

4.7.1.2 Modifications phénotypiques radio-induites et transition épithélio-mésenchymateuse

La migration cellulaire étant liée au phénotype, plusieurs études ont examiné l'impact de l'irradiation sur les voies associées à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Dans les cancers solides, l'irradiation favorise un état mésenchymateux associé à une motilité accrue. Dans les gliomes, des analyses transcriptomiques montrent une modulation de gènes impliqués dans le cytosquelette et les adhésions cellulaires, notamment *via* les intégrines (Kahlert et al., 2017). Plus récemment, Pavlova et al. (2025) montrent que l'irradiation induit des changements phénotypiques

de type TEM, avec une augmentation de l'expression de gènes liés à la migration et à l'invasion. Ces données indiquent que l'irradiation active des programmes moléculaires de plasticité contribuant à l'agressivité tumorale post-traitement (Pavlova et al., 2025).

4.7.1.3 Altérations biomécaniques et réorganisation du cytosquelette

Les modifications de motilité observées après irradiation s'accompagnent d'altérations du cytosquelette et des propriétés mécaniques. L'irradiation peut remodeler le réseau d'actine et les adhésions focales, influençant directement la migration. Mottareale et al. (2024) montrent ainsi une augmentation des adhésions riches en paxilline et de la tension des filaments d'actine après irradiation, associée à des changements morphologiques et mécaniques favorisant la motilité. Cependant, ces effets sont dépendants du contexte cellulaire. Des études antérieures rapportent des réponses divergentes selon les lignées, allant d'une migration accrue sans remodelage majeur de l'actine à une réorganisation cytosquelettique marquée (Memmel et al., 2017 ; Hohmann et al., 2017). Cette hétérogénéité est confirmée par des analyses récentes montrant des différences d'organisation de l'actine et de rigidité cellulaire entre lignées comme U87 et T98G (Masud et al., 2025). Enfin, la réponse dépend également des caractéristiques du rayonnement. Wank et al. (2018) montrent qu'une irradiation X à faible dose augmente l'invasion de certaines lignées (U87, LN229), effet absent avec d'autres types de rayonnement. Ainsi, l'impact de l'irradiation sur le cytosquelette d'actine et la motilité des cellules de GBM est variable, dépendant à la fois de l'identité cellulaire et du contexte biophysique d'irradiation (Masud et al., 2025 ; Wank et al., 2018).

4.7.1.4 Renforcement des adhésions cellulaires et signalisation associée à la motilité

Au-delà du cytosquelette, l'irradiation modifie les interactions des cellules de GBM avec leur microenvironnement. Des études montrent qu'elle altère l'expression et l'activation de protéines d'adhésion liées aux intégrines et aux adhésions focales, incluant FAK et la paxilline, ce qui est associé à une augmentation de l'adhésion aux cellules endothéliales et de l'invasion (Nguemgo Kouam et al., 2019). Plus globalement, des travaux récents indiquent que l'irradiation agit à la fois sur la motilité intrinsèque et sur les interactions cellule–microenvironnement, favorisant un état pro-invasif après traitement (Franco et al., 2024).

4.7.2 Effets de l'irradiation sur les capacités invasives des cellules de glioblastome

Les capacités invasives des cellules de glioblastome (GBM) irradiées sont classiquement évaluées à l'aide d'essais Transwell recouverts de matrice extracellulaire. Wank et al. (2018) montrent qu'une irradiation par rayons X (4 Gy) augmente significativement le nombre de cellules invasives dans des lignées établies et dérivées de patients, indiquant un effet pro-invasif de l'irradiation photonique. En revanche, une irradiation par particules α à dose équivalente n'induit pas cette augmentation, suggérant que l'effet de l'irradiation sur l'invasion dépend à la fois du contexte cellulaire et des propriétés physiques du rayonnement comme déjà mis en évidence avec des tests de migration (Wank et al., 2018). Ces observations s'inscrivent dans un cadre plus large suggérant que les rayonnements ionisants peuvent moduler le comportement migratoire des cellules tumorales survivantes. Dès le XXe siècle Kaplan et Murphy ont montré qu'une irradiation locale pouvait augmenter la fréquence des métastases pulmonaires dans des modèles murins (Kaplan et Murphy, 1949). Ces données ont été consolidées et recensées dans la revue de Von Essen (1991), qui compile de nombreux travaux suggérant un effet pro-métastatique des irradiations, y compris via des modifications du tissu normal irradié (Von Essen et al., 1991).

Plus récemment, plusieurs études, dont celle de Gauthier et al. (2020), ont confirmé que l'irradiation peut augmenter les capacités de migration et d'invasion dans différents modèles tumoraux, y compris le glioblastome. Ces effets sont associés à l'activation de voies de signalisation impliquées dans la dynamique du cytosquelette, le remodelage de la matrice extracellulaire et la plasticité cellulaire. Ces observations ont été synthétisées dans plusieurs revues récentes (Moncharmont et al., 2014 ; Fujita et al., 2015 ; Sundahl et al., 2018), mettant en évidence une diversité de mécanismes moléculaires sous-jacents à la migration radio-induite.

Cependant, malgré l'accumulation de données expérimentales, principalement issues de modèles *in vitro*, la pertinence clinique de ces phénomènes reste débattue. En effet, les preuves directes d'une augmentation de l'invasion ou du potentiel métastatique induite par la radiothérapie chez les patients demeurent limitées (Vilalta et al., 2016). Dès lors, la compréhension des mécanismes impliqués dans la migration radio-induite apparaît comme un enjeu majeur, tant pour mieux appréhender la réponse tumorale que pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

4.7.3. Activité protéolytique et remodelage de la matrice extracellulaire post-irradiation

L'infiltration des cellules de GBM repose en grande partie sur leur capacité à remodeler la MEC. Des travaux précoces montrent que l'irradiation augmente l'expression de MMP2 sans réduire nécessairement le volume tumoral, suggérant un renforcement de l'activité protéolytique (Wild-Bode et al., 2001). *In vivo*, ces cellules génèrent des tumeurs plus infiltrantes. De même, une irradiation à 10 Gy induit un phénotype durablement plus invasif, associé à des remaniements des adhérences focales (phosphorylation de FAK, enrichissement en paxilline et vinculine) et une augmentation de l'intégrine β1 et des MMP-1, MMP-2 et MMP-9 (Tsutsumi et al., 2009). La persistance de ces effets suggère un processus de sélection de sous-populations hautement invasives. Sur le plan clinique, une surexpression de MMP-2 et MMP-9 est associée à une survie plus courte, une invasivité accrue et un risque de récidive élevé (Aitchison et al., 2025). L'irradiation modifie également la composition de la MEC. Des modèles récents montrent qu'une irradiation fractionnée induit une matrice altérée en glycoprotéines et collagènes, favorisant un environnement pro-invasif (Guerrero-Quiles et al., 2025). Par ailleurs, l'irradiation agit sur le compartiment vasculaire : les cellules endothéliales adoptent un phénotype modifié et produisent une matrice plus permissive à la migration tumorale (Leone et al., 2024). Enfin, cette réponse dépend du contexte moléculaire. La perte de PTEN favorise des programmes invasifs via NF-κB et BRD2/BRD4 (Vadla et al., 2023). De plus, la signalisation TGF-β, amplifiée notamment par MMP14, renforce l'invasion et la migration des cellules de GBM (Zhou et al., 2025). Ainsi, l'irradiation remodèle la MEC et active des voies protéolytiques et pro-invasives, contribuant à l'agressivité tumorale post-traitement.

4.8 La récidive du glioblastome

Le GBM est associé à un taux de récidive très élevé, survenant chez la quasi-totalité des patients malgré des traitements multimodaux agressifs (protocole de Stupp). Cette rechute résulte de la persistance de cellules tumorales infiltrantes ayant échappé aux traitements. Dès les années 90, il a

été montré que la récidive est majoritairement locale, survenant au niveau du site tumoral initial et de ses marges, soulignant le rôle central des cellules résistantes dans la dynamique de rechute (Sneed et al., 1994). Concernant le traitement du GBM récidivant, il n'existe à ce jour aucun protocole standard qui s'est imposé. Malgré de nombreuses options (chirurgie, ré-irradiation, chimiothérapies, thérapies ciblées), aucune n'a démontré de bénéfice clair en survie dans des essais randomisés de grande ampleur (Mut et al., 2025). La ré-intervention chirurgicale reste envisageable chez certains patients, selon des critères cliniques et anatomiques : âge, état général, volume tumoral et localisation, notamment la proximité de zones fonctionnelles à risque (Mut et al., 2025). En l'absence de consensus, la prise en charge est individualisée, basée sur une évaluation multidisciplinaire du rapport bénéfice/risque, la chirurgie de récidive étant plus complexe et plus risquée que lors du traitement initial (Mut et al., 2025).

4.8.1 Rôles des cellules souches de glioblastome

Le lien entre radiorésistance et cellules souches de glioblastome (CSG) a été établi lorsque Bao et al. montrent que les cellules $CD133^{+}$ présentent une réparation de l'ADN renforcée après irradiation (Bao et al., 2006). Bien que minoritaires, ces cellules assurent l'auto-renouvellement, la tumorigenèse et l'hétérogénéité du GBM (Sahoo et al., 2024). Les CSG se répartissent en sous-types proneural et mésenchymateux, ce dernier étant associé à des programmes d'invasion, de survie et de résistance plus important. Une transition proneural → mésenchymateux lors de la récidive contribue à l'agressivité tumorale (Guo et al., 2024). Elles reprogramment aussi le microenvironnement, en favorisant l'immunosuppression (polarisation M2) et l'angiogenèse *via* leur différenciation en péricytes dépendante de l'axe SDF-1/CXCR4 et de TGF-β (Cheng et al., 2013). Leur radiorésistance repose sur une activation accrue des voies de réparation de l'ADN (ATM, ATR, PARP1) et du stress réplicatif (ATR/Chk1), dont l'inhibition sensibilise aux traitements (Ahmed et al., 2015 ; Carruthers et al., 2018). Les CSG possèdent également un fort potentiel invasif, reposant sur les intégrines, les MMP et des voies comme ephrin-B2, ainsi que sur des réseaux transcriptionnels (TWIST1, SOX2, STAT3) contrôlant les programmes mésenchymateux (Krusche et al., 2016 ; Carro et al., 2010). Enfin, plusieurs voies (Wnt, Sonic Hedgehog) maintiennent leur état souche et leur résistance thérapeutique (Biserova et al., 2021). Ces propriétés expliquent la récidive quasi systématique, le plus souvent locale, liée à la persistance et à la dispersion des cellules tumorales

infiltrantes (Stupp et al., 2005 ; Stupp et al., 2009 ; Minniti et al., 2010 ; Mun et al., 2024). L'invasion repose sur des processus coordonnés (adhésion, dégradation de la MEC, remodelage de l'actine), auxquels s'ajoutent des mécanismes émergents comme les migrasomes, capables de stimuler la migration tumorale (Huang et al., 2025). Les CSG résident dans des niches spécialisées hypoxiques et périvasculaires, où l'activation des facteurs HIF favorise leur maintien et leur agressivité. L'hypoxie induit des programmes transcriptionnels associés à la migration et à la plasticité, contribuant à l'identité fonctionnelle des CSG (Marallano et al., 2024). Ces cellules présentent une forte radiorésistance, liée à l'activation de voies contrôlant l'auto-renouvellement, la quiescence et l'épigénétique (Phi et al., 2018). Elles montrent également une survie clonogénique accrue et une réparation plus efficace de l'ADN après irradiation (Bao et al., 2006). Par ailleurs, l'irradiation augmente leur motilité et leur invasion, associées à une surexpression de MMP2/MMP9 et à l'activation de FAK/Src. Cette migration pourrait permettre aux CSG de se redistribuer vers des zones moins irradiées, favorisant la récidive. Enfin, cette radiorésistance repose sur l'activation de réseaux de signalisation interconnectés (Wnt/β-caténine, PI3K/AKT/mTOR, NF-κB, Notch), rendant les approches ciblant une seule voie peu efficace et soulignant la nécessité de stratégies combinatoires (Esteban-Román et al., 2025).

4.8.2 Contribution des altérations génétiques à la récidive du glioblastome

Les altérations génomiques constituent un déterminant majeur de l'agressivité et de la résistance thérapeutique du glioblastome. Elles impliquent notamment l'activation de voies RTK (EGFR), l'expression de médiateurs pro-tumoraux (PGRN, AREG), ainsi que l'inactivation de suppresseurs clés (TP53, PTEN, CDKN2A), entraînant une dérégulation du cycle cellulaire, de la survie et de la stabilité génomique. Parallèlement, des facteurs de type souche tels que SOX2 maintiennent les propriétés d'auto-renouvellement et d'invasion. La Figure 11 et le tableau 7 synthétisent les principales voies, leurs mécanismes moléculaires et leurs implications fonctionnelles dans l'invasion, la plasticité des CSG et la résistance aux traitements.

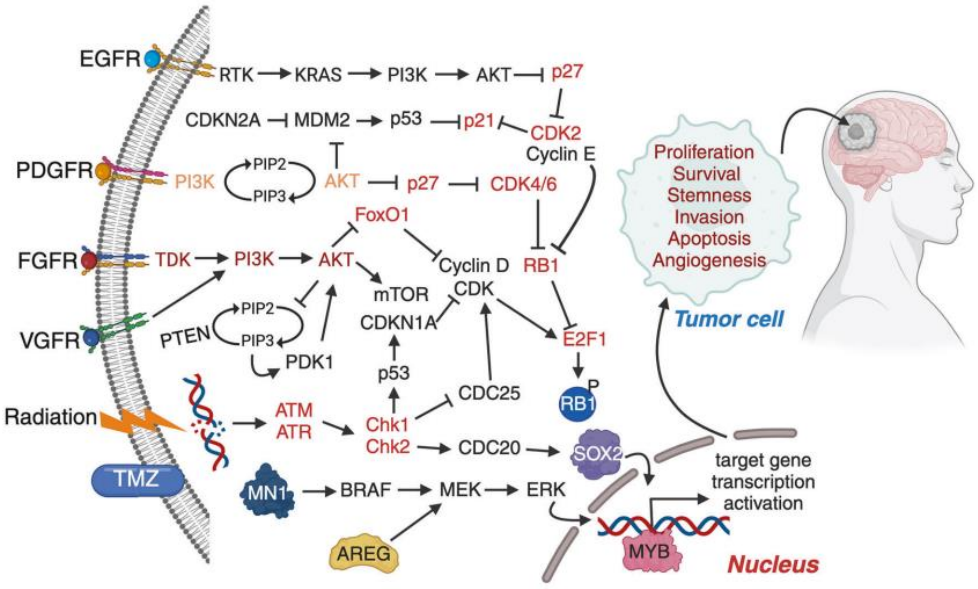


Figure 11 : Voies de signalisation et contrôle du cycle cellulaire dans le glioblastome

Schéma des principales voies oncogéniques activées dans le glioblastome. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (EGFR, PDGFR, FGFR, VEGFR) activent les cascades PI3K–AKT–TMOR et BRAF–MEK–ERK, qui régulent la prolifération, la survie, l'invasion et l'angiogenèse. Les suppresseurs de tumeur PTEN, p53 et RB1, ainsi que les inhibiteurs de CDK (p21, p27), modulent l'entrée en phase S via l'axe CDK4/6–Cycline D–RB–E2F1. Les dommages à l'ADN induits par la radiothérapie et le témozolomide (TMZ) activent les voies ATM/ATR–Chk1/Chk2 et influencent l'arrêt du cycle et la réparation de l'ADN. L'ensemble de ces signaux converge vers le noyau pour contrôler l'expression de gènes impliqués dans le comportement tumoral (d'après Singh et al., 2025).

Voie / axe	EGFR / EGFRvIII	PGRN et AREG	CDKN2A (p16INK4a / p14ARF)
Famille	RTK (récepteur à activité tyrosine kinase)	Ligands / médiateurs de microenvironnement liés à EGFR	Suppresseur tumoral / frein du cycle cellulaire
Altérations / contexte	Activation d'EGFR ; mutation constitutive EGFRvIII; altération de PTEN	PGRN surexprimée dans le GBM ; AREG exprimée au niveau transcriptomique + régulation épigénétique/protéique	Perte par délétion homozygote ; Ou par méthylation du promoteur
Déclencheurs (en amont)	Activation persistante du EGFRvIII	Surexpression tumorale de PGRN ; AREG ligand de l'EGFR ; induction d'AREG dans la microglie	Inactivation génétique/épigénétique de CDKN2A
Mécanismes moléculaires	Activation des RTK (RAS/PI3K), activation d'AKT, dérégulation du G1/S; altérations de PTEN et maintien de PI3K/AKT/mTOR	PGRN : survie réduite ↓AREG :↑ autophagie/apoptose CSF-1R–MAPK/ERK stimule AREG + invasion	Perte de p16INK4a active CDK4/6cycline D perte de p14ARF ↓ stabilisation de p53
Effecteurs (en aval)	RAS/PI3K; AKT; mTOR; FOXG1; SOX2	EGFR ; CSF-1R; MAPK/ERK; stress du RE; autophagie; apoptose	CDK4/6 ; cycline D p53 ; MDM2
Impact sur invasion / migration	Renforce invasion ; participe à l'agressivité tumorale	AREG favorise invasion des cellules de GBM, via interactions microglie/tumeur	Effet indirect en ↑ agressivité + expansion
Rôle dans CSG / plasticité	Soutient état de cellule souche + auto-renouvellement via FOXG1/SOX2	Rôle indirect via microenvironnement	Favorise états prolifératifs permissifs axe moins spécifique des CSG
Microenvironnement	sous-populations EGFRvIII+ et EGFRvIII-	dialogue avec la microglie; marqueurs de progression	Événement précoce et structurant de la tumorigenèse gliale
Impact thérapeutique / résistance	Réponse limitée de erlotinib, géfitinib; intérêt de combiner avec radiothérapie/chimiothérapie; inhibition EGFR + mTOR/rapamycine pour restaurer sensibilité au témozolomide	↓ AREG ↑ la mort cellulaire induite par la doxorubicine; inhibition d'ERK ↓ AREG et bloque l'invasion induite par la microglie	Cellules + dépendantes de CDK4/6 vulnérabilité avec palbociclib ou abemaciclib
Pistes thérapeutiques	sensibilisation radio/chimiothérapie ; ciblage de sous-populations EGFRvIII	inhibition CSF-1R ou ERK dans la microglie; exploitation de PGRN comme biomarqueur	Inhibiteurs de CDK4/6
Références	Padfield et al., 2015; Gan et al., 2013 ; Peng Li et al., 2023	Sisto et al., 2025 ; Wang et al., 2026 ; Zhou et al., 2021	Zhao et al., 2016 ; Ruas et al., 1998 ;

Voie / axe	SOX2	Axe ARF-MDM2/MDM4-p53	PTEN / PI3K-AKT-mTOR
Famille	Facteur de transcription / programme de développement neural	Suppression tumorale / contrôle du cycle + apoptose	Suppresseur tumoral / régulateur négatif de PI3K–AKT–mTOR
Altérations / contexte	Surexpression dans GBM + amplifications du locus SOX2	Mutations de TP53 délétion de CDKN2A/p14ARF amplification MDM2 + MDM4	Perte de PTEN dans le GBM ; activation de PI3K/AKT/mTOR
Déclencheurs (en amont)	Réactivation de programmes du développement neural interaction Par6/SOX2 dépend de EGFR/PI3K/AKT et mTOR	Perte de p14ARF liée à la délétion de CDKN2A activité persistante de MDM2/MDM4	Altération ou perte de PTEN
Mécanismes moléculaires	SOX2 favorise auto-renouvellement, prolifération et invasion Par6/SOX2 maintient état stem-like et résistance au témozolomide inhibition de mTOR ↓ SOX2/SOX9	MDM2/MDM4 inhibent p53 par rétrocontrôle perte de p14ARF maintient MDM2 actif → dégradation de p53 et ↓ de l'arrêt du cycle, de l'apoptose et de la réparation de l'ADN	Perte de PTEN active PI3K/AKT/mTOR ↑ prolifération + survie PD-L1↑ favorise échappement immunitaire activation YAP1–LOX → remodelage MEC inhibition de LOX : vulnérabilité en combinaison avec anti-PD-1
Effecteurs (en aval)	Programmes stem-like ; SOX9 EGFR/PI3K/AKT ; mTOR	P53 ; MDM2 ; MDM4 ; p14ARF ; réponses de réparation de l'ADN	PI3K ; AKT ; mTOR ; PD-L1 YAP1 LOX ; CLOCK–OLFML3 NF-κB ; ZBTB1
Impact sur invasion / migration	Expression ↑ associée à capacités migratoires + invasives	Facilite invasion via prolifération, survie augmentée + instabilité génomique	↑ agressivité via MEC remaniée, infiltration de macrophages
Rôle dans CSG / plasticité	Régulateur central du phénotype CSG et de la plasticité tumorale	Impact indirect via la permissivité à l'expansion tumorale	Soutient programmes de survie + résistance au traitement
Microenvironnement	Participe à états cellulaires + agressifs effet intrinsèque aux cellules tumorales	Contribue à l'évolution clonale par perte de surveillance génomique	microenvironnement immunosuppresseur avec macrophages/microglies
Impact thérapeutique / résistance	Associé à une résistance au témozolomide ↓ de SOX2 par inhibition mTOR restaure partiellement la sensibilité	↓ sensibilité aux signaux de mort cellulaire axe pertinent pour des thérapies ciblant p53/MDM2	Ciblage PI3K/AKT/mTOR, de LOX ou des checkpoints immunitaires ; LOX + anti-PD-1 prometteuse dans les modèles PTEN-déficients
Pistes thérapeutiques	Perturbation de SOX2 ou régulateurs stratégies combinées avec inhibition mTOR ou EGFR/PI3K/AKT	Réactivation de p53 inhibition MDM2/MDM4	Inhibiteurs PI3K/AKT/mTOR ; blocage LOX immunothérapie anti-PD-1 en combinaison ciblage YAP1-LOX
Références	Mamun et al., 2018 ; Novak et al., 2020	Huang et al., 2020 ; Pouyan et al., 2025	Peng et al., 2022 ; Huang et al., 2022

Tableau 7 : Principales voies de signalisation impliquées dans l'invasion, la plasticité et la résistance thérapeutique des cellules de glioblastome et des CSG

Ce tableau présente une synthèse intégrée des principales voies de signalisation impliquées dans la biologie du glioblastome, en mettant en relation les altérations moléculaires, les mécanismes en aval et leurs conséquences fonctionnelles. Les voies RTK, en particulier l'axe EGFR/EGFRvIII, activent de manière persistante les cascades RAS/PI3K/AKT/mTOR, favorisant la prolifération, l'invasion et le maintien de programmes transcriptionnels de type cellule souche. Les médiateurs du microenvironnement tels que PGRN et AREG participent au dialogue microglie–tumeur et renforcent les capacités invasives. Le facteur de transcription SOX2 constitue un régulateur central de la plasticité et de l'auto-renouvellement des CSG. Les axes suppresseurs de tumeur ARF–MDM2/MDM4–p53 et CDKN2A contrôlent le cycle cellulaire et l'apoptose, dont l'inactivation favorise l'instabilité génomique et la progression tumorale. Enfin, la perte de PTEN entraîne une activation soutenue de PI3K/AKT/mTOR et reprogramme le microenvironnement tumoral via des mécanismes immunosuppresseurs et de remodelage matriciel. L'ensemble de ces voies converge vers des phénotypes invasifs, une forte hétérogénéité intratumorale et une résistance accrue aux traitements, tout en mettant en évidence des vulnérabilités thérapeutiques potentielles ciblant ces axes.

4.8.3 Altérations des voies de signalisation et récidive du glioblastome

Les dérégulations des voies de signalisation stimulent la prolifération tumorale. Elles favorisent l'invasion et la survie cellulaire. Et elles participent aussi au maintien de cellules à phénotype souche. Ces altérations renforcent l'agressivité des tumeurs (Figure 12). Elles limitent l'efficacité des traitements en améliorant la réparation de l'ADN et en réduisant l'apoptose. Le ciblage de ces voies constitue donc un levier majeur pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

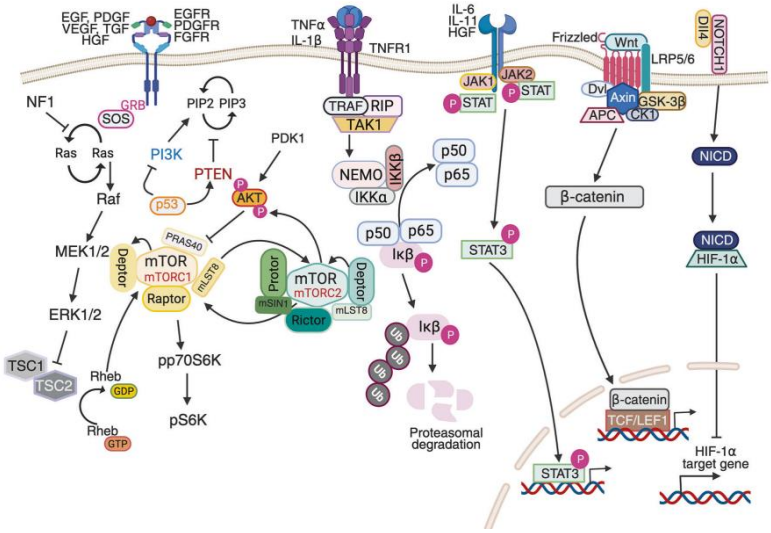


Figure 12 : Principales voies de signalisation oncogéniques et leurs interconnexions dans le glioblastome

Schéma illustrant les principales voies de signalisation impliquées dans la progression du glioblastome et leurs interconnexions fonctionnelles. Les récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR, PDGFR, FGFR) activent les cascades PI3K/AKT/TMOR et RAS/RAF/MEK/ERK, modulées par des régulateurs clés tels que PTEN, p53 et NF1. La voie NF-κB est activée en aval des récepteurs du TNF via les complexes TRAF/RIP/TAK1 et IKK, conduisant à la dégradation d'IκB et à la translocation nucléaire de p50/p65. Les cytokines (IL-6, IL-11, HGF) activent la signalisation JAK/STAT, en particulier STAT3. La voie Wnt/β-caténine est contrôlée par le complexe de dégradation (APC, Axin, GSK-3β, CK1) et conduit à

l'activation transcriptionnelle via TCF/LEF. La signalisation Notch, via la libération du domaine intracellulaire (NICD), interagit notamment avec HIF-1α en conditions hypoxiques. L'ensemble de ces voies converge vers des programmes transcriptionnels favorisant la prolifération, la survie, l'invasion et l'adaptation métabolique des cellules tumorales (Huang et al., 2020).

En complément le tableau 8 synthétise ces principales voies, leurs mécanismes moléculaires et leurs implications fonctionnelles dans l'invasion, la plasticité des CSG et la résistance aux traitements.

4.8.4 Rôle de l'invasion radio-induite dans la récidive du glioblastome

Comme déjà évoqué dans le chapitre 4.7 « Effets de l'irradiation sur l'invasion des cellules de GBM », l'idée que les rayonnements ionisants favorisent des comportements pro-invasifs est ancienne (Kaplan et Murphy, 1949 ; Von Essen, 1991) et a été confirmée expérimentalement dans de nombreuses études.

4.8.4.1 L'invasion radio-induite comme programme adaptatif

L'invasion radio-induite repose sur un programme distinct et non sur une simple amplification des voies basales. Après irradiation (2-5 Gy), l'augmentation de l'invasion dépend de l'activation d'EGFR/IGF-1R puis de PI3K et RhoA/ROCK ; leur inhibition abolit spécifiquement l'invasion radio-induite sans affecter l'invasion basale (Zhai et al., 2006).

Cette réponse implique aussi des régulations post-transcriptionnelles : miR-494 est induit par l'irradiation et suffit à reproduire le phénotype invasif via le ciblage de p190B RhoGAP, la prolongation de RhoA et l'activation d'EGFR/Akt/ERK (Park et al., 2006). Par ailleurs, l'irradiation favorise un programme mésenchymateux (vimentine, FAK phosphorylée) associé à une diminution de Slit2/Robo1, dont la restauration supprime la migration induite (Kouam et al., 2018). Ces données indiquent l'activation de circuits spécifiques et la levée de freins de guidage cellulaire.

	PI3K/AKT/mTOR	NF-κB	STAT3	Wnt/β-caténine
Famille	Voie de survie, prolifération, adaptation métabolique	Voie inflammatoire et transcriptionnelle	Facteur de transcription et nœud central de la voie JAK/STAT.	Voie de développement canonique ou non régulant prolifération, destin cellulaire + migration
Altérations / contexte	Voie activée dans GBM, liée à la perte de PTEN, pronostic défavorable	Voie activée dans GBM, activation chronique secondaire à des dérégulations en amont de **NF-κB**	Activation fréquente dans GBM; associée à transformation mésenchymateuse, au maintien des CSG + résistance thérapeutique	Voie suractivée dans GBM associée à phénotypes agressifs, prolifération, l'invasion des CSG
Déclencheurs (en amont)	Activation en aval des RTK, de Ras et des intégrines, avec activation d'AKT	Signaux issus d'EGFR, PDGFR, PTEN, NF1, CDKN2A, MEC, acide hyaluronique, axe RANKL, TGF-β	Activation en aval d'EGFR, PDGFR, c-MET et JAK2	Stabilisation de la β-caténine ; hyperméthylation d'inhibiteurs de la voie activation par Sema3C/PlexinD1/Rac1
Mécanismes moléculaires	PI3K/AKT/mTOR soutient survie, prolifération et adaptation métabolique du GBM. AKT favorise croissance, invasion + résistance mTORC1/2 intègrent signaux de croissance ; mTORC2 (via RICTOR) renforce invasion et propriétés des CSG	NF-κB induit translocation nucléaire de p65/RelA ou RelB, activant des programmes pro-survie, pro-invasifs et pro-inflammatoires Coopère avec MAPK, STAT3, C/EBPβ et TAZ, régule cytokines, adhésion et MMP, + angiogenèse + résistance thérapeutique	STAT3 phosphorylé transloque au noyau et active programmes pro-oncogéniques, ↑ croissance, survie et résistance, favorise l'invasion via EGFRvIII/JAK2 et contribue à la radio- et chimiorésistance	Accumulation nucléaire de β-caténine active Cyclin D1, Axin2 Sema3C/PlexinD1/Rac1 renforcent cette activation Wnt5a induit SNAI1 + programmes de plasticité (ZEB1, TWIST1, SLUG)
Effecteurs (en aval)	AKT, mTOR, mTORC1, mTORC2, RICTOR, NRBP1, PKCα	p65/RelA, RelB, STAT3, C/EBPβ, TAZ, IL-6, IL-8, ICAM-1, FN14, CTGF, MMP-9, VEGF, PKM2, MGMT	c-Myc, cycline D1, Bcl-xL, SOX2, OLIG2, OCT4, NANOG, TGFBI, MGMT, FOXM1, bFGF	β-caténine, Cyclin D1, Axin2, Sema3C, PlexinD1, Rac1, Wnt5a, SNAI1, ZEB1, TWIST1, SLUG
Impact sur invasion / migration	Augmente la motilité, l'invasion et l'adaptation au microenvironnement tumoral mTORC2 contribue au phénotype invasif	Favorise migration + invasion via IL-8, ICAM-1, FN14, CTGF et MMP-9	Renforce invasion, notamment en aval d'EGFRvIII stabilise adhérence focale + états cellulaires migratoires	↑ migration + invasion favorise expression de métalloprotéinases et facteurs de transition phénotypique
Rôle dans CSG / plasticité	Essentielle au maintien des CSG soutient prolifération, survie, invasion + adaptation cellulaire	Contribue au maintien d'un état stem-like, (sous-populations mésenchymateuses)	Régulateur du maintien des CSG + auto-renouvellement, invasivité + persistance tumorale	Soutient auto-renouvellement + stemness des CSG
Microenvironnement	Participe à l'adaptation métabolique des cellules tumorales aux contraintes locales sa redondance avec d'autres voies contribue à l'hétérogénéité des réponses	Soutient état inflammatoire persistant ; relaie les signaux de la matrice et des cellules stromales participe au dialogue tumeur-astrocytes	Participe à l'angiogenèse via IFITM3 + bFGF relaie des signaux de croissance + d'inflammation	Régulations épigénétiques et non canoniques forte contribution à l'hétérogénéité cellulaire
Impact thérapeutique / résistance	Inhibiteurs de mTOR (évérolimus, temsirolimus) montrent effets précliniques mais un bénéfice clinique limité	Contribue à résistance au témozolomide via induction de MGMT participe à angiogenèse + adaptation métabolique → renforce la persistance tumorale	Contribue à résistance au témozolomide par MGMT + TGFBI coopère avec FOXM1 dans radio-résistance	L'inhibition de la voie ↓ migration, invasion + auto-renouvellement Wnt favorise progression + adaptation tumorale
Pistes thérapeutiques	Approches ciblant PI3K, AKT ciblage de mTORC2/RICTOR dans contextes à forte stemness	Ciblage de NF-κB avec inhibiteurs de RTK, STAT3, ou TGF-β intérêt d'approches dirigées contre effecteurs du compartiment initiateur	Inhibiteurs de STAT3 ou de JAK/STAT3 stratégies combinées avec anti-angiogéniques, anti-MET intérêt d'un ciblage du compartiment CSG	Inhibiteurs de Porcupine comme LGK974 stratégies avec suppression de Sema3C
Références	Huang et al., 2022 ; Peng et al., 2022	Lawrence et al., 2009	Wang et al., 2022 ; Yu et al., 2014	Rim et al., 2022 ; Liu et al., 2022

	NOTCH	Hedgehog	PKC	IGF1R
Famille	Voie de développement régulant quiescence, différenciation, prolifération et communication de niche	Voie de développement embryonnaire de l'axe SHH–SMO–GLI	Famille de sérine/thréonine kinases impliquées dans survie, migration et signalisation pro-tumorale	Récepteur à activité tyrosine kinase de l'axe IGF
Altérations / contexte	Surexpression Notch1 : mauvais pronostic dans GBM forte hétérogénéité	Réactivation dans GBM associée au maintien des CSG	Signalisation PKC altérée dans GBM associée à croissance tumorale + invasion + agressivité	Expression d'IGF1R dans les GBM associée à des signatures défavorables, à une survie + courte
Déclencheurs (en amont)	Hypoxie ; signaux de la niche périvasculaire Notch exprimés par cellules endothéliales activation avec libération du NICD	Activation de SHH-PTCH-SMO modulation transcriptionnelle et épigénétique de GLI1 influence de coactivateurs (BRD4) et de signaux (mGluR4)	Activation par divers signaux membranaires et réseaux comme EGFR implication de plusieurs isoformes (PKCα, PKCε et PKCη)	Liaison des ligands de l'axe IGF à IGF1R recrutement de protéines adaptatrices IRS et Grb2
Mécanismes moléculaires	Notch repose sur libération du NICD, qui transloque au noyau et active des programmes transcriptionnels. Renforcée par l'hypoxie (TRPC6, Ca^{2+}, NFAT) et favorise prolifération, survie et stemness Dans CSG, participe à la niche périvasculaire + coopère avec les signaux endothéliaux, avec des effecteurs (LMO2)	Active GLI1 → gènes de prolifération, survie + stemness (MYC, CCND1, FOXM1) + auto-renouvellement tGLI1 favorise invasion + angiogenèse (VEGFR1, VEGF-C, HPSE, CD44) ↑ MGMT et dépend de régulateurs épigénétiques (BRD4)	Active voies mitogènes + pro-survie et favorise migration via ERK + NF-κB Isoformes PKCε, PKCη soutiennent adhésion, motilité + survie Le ciblage de PKC réduit l'invasion dans des modèles expérimentaux	IGF1R recrute IRS et Grb2, activant PI3K/AKT et RAS/RAF/MAPK → prolifération + survie tumorale Inhibition (IGF-Trap) ↓ phosphorylation du récepteur, améliore survie dans modèles précliniques
Effecteurs (en aval)	NICD, TRPC6, NFAT, Notch1, Notch2, Notch4, LMO2, NF-κB	GLI1, tGLI1, MYC, CCND1, FOXM1, VEGFR1, VEGF-C, TEM7, HPSE, CD24, CD44, MGMT, BRD4	PKCα, PKCε, PKCη, ERK, NF-κB, FGF	IRS, Grb2, PI3K/AKT, RAS/RAF/MAPK
Impact sur invasion / migration	Participe à l'adaptation des cellules tumorales dans les zones infiltrées	Renforce motilité, invasion et angiogenèse	Renforce adhésion, motilité et invasion contribue aux réseaux tumoraux	Contribue à progression + survie favorise phénotype tumoral + agressif
Rôle dans CSG / plasticité	Régulateur majeur du maintien stemness, quiescence + prolifération des CSG	Voie majeure du maintien des CSG + auto-renouvellement Nouveaux phénotypes agressifs + mésenchymateux	Survie sous stress peut contribuer à la persistance et à l'adaptation tumorale	Peut soutenir états de persistance + survie, surtout sur croissance tumorale globale
Microenvironnement	Voie dépendante de l'hypoxie et de la niche vasculaire variation spatiale marquée entre cœur tumoral	Contribue à l'angiogenèse + émergence de sous-populations CD44+	Différentes isoformes exercent des fonctions complémentaires	IGF/IGF1R participe à des signatures défavorables
Impact thérapeutique / résistance	Contribue à la résistance thérapeutique et au maintien de sous-populations persistantes	↑ MGMT et résistance au témozolomide son inhibition↓prolifération + stemness	Diversité des isoformes suggère des réponses variables selon contexte tumoral	Survie + courte et résistance aux traitements IGF1R pourrait limiter progression + échappement
Pistes thérapeutiques	Approches combinées avec anti-angiogéniques, anti-CSG ou traitements standards	Inhibiteurs de SMO comme LDE225, cyclopamine ; ciblage de CK2 par CX-4945 ; modulation de BRD4 ; stratégies visant spécifiquement GLI1/tGLI1	Développement d'inhibiteurs ou modulateurs de PKC	Inhibiteurs d'IGF1R (IGF-Trap) intérêt de formulations nanoparticulaires et de combinaisons avec les traitements standards
Références	Harwood et al., 2024; Wang et al., 2024	Meleiro et al., 2025; Koda et al., 2023; Hung et al., 2020	Azorin et al., 2026.	Werner et al., 2023; Rieger et al., 2021

Tableau 8 : Principales voies de signalisation impliquées dans la progression du glioblastome et le maintien des CSG

Ce tableau présente une analyse comparative des principales voies de signalisation impliquées dans le glioblastome. Pour chaque voie sont détaillés : la famille moléculaire, les altérations génétiques ou contextuelles, les mécanismes d'activation en amont, les mécanismes moléculaires, ainsi que les effecteurs en aval. Le tableau intègre également leur impact sur les processus d'invasion et de migration, leur rôle dans le maintien des propriétés des cellules souches de glioblastome (CSG) et de la plasticité tumorale, ainsi que leur contribution au microenvironnement tumoral et à l'hétérogénéité intratumorale. Enfin, les implications thérapeutiques, notamment en termes de résistance aux traitements, ainsi que les principales stratégies de ciblage pharmacologique sont indiquées. L'ensemble met en évidence le caractère interconnecté et redondant de ces voies, soulignant la nécessité d'approches thérapeutiques combinées pour limiter l'échappement tumoral.

4.8.4.2 Nœuds moléculaires centraux de l'invasion radio-induite

L'invasion radio-induite repose sur des médiateurs centraux plutôt que sur des effets diffus. MDA-9/Syntenin apparaît comme un nœud clé : après irradiation, son interaction avec EGFRvIII augmente et active les voies Src, FAK et NF-κB, conduisant à une augmentation de MMP-2/-9 et de l'invasion ; son inhibition supprime ces signaux, réduit l'invasion et diminue l'infiltration tumorale in vivo (Kegelman et al., 2017).

De manière cohérente, l'irradiation active rapidement l'axe EGFR–ERK–Akt–p38–NF-κB, associé à une augmentation de la migration et à l'induction de marqueurs mésenchymateux (vimentine, N-cadhérine, MMP) (Chowdhury et al., 2020). Le blocage de la réparation de l'ADN par olaparib empêche cette activation et abolit la migration radio-induite. Ces données indiquent que l'invasion radio-induite correspond à une réponse intégrée au stress génotoxique.

4.8.4.3 Reprogrammation des cellules souches et rôle du microenvironnement irradié

Dans le contexte des cellules souches de glioblastome, l'irradiation sublétale induit une reprogrammation fonctionnelle orientée vers l'invasion. Gauthier et al. montrent que, dans des cellules souches de glioblastome cultivées en conditions normoxiques, l'irradiation entraîne une stabilisation rapide de HIF-1α (Gauthier et al., 2020). Mécaniquement, cette stabilisation repose sur une augmentation des ROS, et sur une inhibition des prolyl-hydroxylases, empêchant la dégradation protéosomale de HIF-1α. Cette activation de HIF-1α n'est pas neutre sur le plan fonctionnel : elle conduit à l'induction de JMY, un régulateur clé de la nucléation de l'actine via le complexe Arp2/3 (Gauthier et al., 2020). Son augmentation se traduit par des changements morphologiques car les cellules forment davantage de lamellipodes, se polarisent, migrent. Ces données suggèrent que

l'irradiation peut sélectionner des sous-populations spécialisées dans l'infiltration tumorale. Plusieurs autres études montrent que l'irradiation sublétale augmente la motilité cellulaire en modifiant à la fois les propriétés mécaniques et le métabolisme des cellules exposées (Moncharmont et al., 2014). Pavlova et al. rapportent des résultats similaires , en s'appuyant sur des approches de flux métabolique et d'imagerie dynamique, reliant directement irradiation, plasticité métabolique et motilité accrue (Pavlova et al., 2025). À l'échelle tissulaire, l'irradiation remodèle la matrice extracellulaire. Vilalta et al. et Sundahl et al. montrent, dans des modèles *in vivo* et *ex vivo*, une augmentation de l'expression de facteurs pro-invasifs tels que MMP-2, uPA et CXCL12, (Vilalta et al., 2016 ; Sundahl et al., 2018). En parallèle, un recrutement accru de cellules myéloïdes est observé contribuant à la formation de niches permissives à la migration tumorale. Guerrero Quiles et al. vont plus loin en analysant directement l'architecture de la matrice après radiothérapie. Ils montrent une réorganisation marquée des réseaux de collagène et de fibronectine (Guerrero Quiles et al., 2025). La matrice irradiée devient plus alignée, plus permissive à la migration directionnelle. Un point clé est que ces effets dépendent fortement du contexte matriciel et des paramètres d'irradiation, comme l'avaient déjà suggéré Eke et al. à partir de modèles 3D contrôlés (Eke et al., 2011). Des réponses pro-migratoires sont observées même à très faibles doses. Ghosh et al. montrent que des doses de 10 - 20 Gy suffisent à induire une migration accrue (Gupta et al., 2020).

Pris ensemble, ces travaux montrent que l'irradiation peut remodeler le microenvironnement irradié de manière durable, à plusieurs niveaux. Dans une perspective intégrative, Oweida et al. soulignent le caractère ambivalent de la radiothérapie, capable d'activer simultanément des réponses immunitaires antitumorales et, chez les cellules survivantes, des programmes de migration et d'invasion (Oweida et al., 2023). La radiothérapie n'est donc pas qu'un stress cytotoxique. C'est aussi un signal qui reprogramme et parfois, qui favorise la dissémination.

4.8.4.4 Implications cliniques et limites des stratégies thérapeutiques

Sur le plan clinique, l'irradiation encéphalique totale a été abandonnée au profit de volumes cibles restreints, car la majorité des récidives surviennent localement, à proximité du site initial (Mun et al., 2024). Avec des marges réduites, environ 80 % des rechutes restent in-field, sans amélioration du contrôle de la composante diffuse. L'élargissement des volumes d'irradiation, notamment via les

anomalies T2/FLAIR, n'apporte pas de bénéfice en survie et augmente la toxicité (Mun et al., 2024 ; Yilmaz et al., 2024).

Des approches récentes visent à mieux intégrer la dynamique d'invasion, notamment *via* l'imagerie DTI et des modèles de croissance tumorale, permettant une délimitation plus précise des marges et une adaptation des volumes irradiés (Tian et al., 2025 ; Zhang et al., 2024). L'imagerie TEP au 18F-FET permet d'identifier des régions tumorales plus agressives que l'IRM seule et améliore la prédiction des sites de rechute (Everard et al., 2025).

Sur le plan thérapeutique, le TMZ a une efficacité anti-invasive limitée et peut favoriser l'expression de MMP9, tandis que le bévacizumab peut sélectionner des phénotypes plus infiltrants (Thanh et al., 2024). Les stratégies ciblant migration et invasion restent jusqu'à maintenant peu efficaces cliniquement (Sagerer et al., 2025), bien que des approches combinatoires soient en développement. L'irradiation peut ainsi favoriser des phénotypes plus migratoires et invasifs, contribuant à la rechute.

Dans ce contexte, l'émergence de structures spécialisées telles que les microtubes tumoraux (MT) suggère l'existence de mécanismes d'adaptation coordonnée permettant aux cellules tumorales de maintenir leur connectivité, d'optimiser leur capacité invasive et de résister aux traitements. Dès lors, la compréhension des déterminants moléculaires régulant leur formation et leur dynamique apparaît comme un enjeu central pour mieux appréhender la plasticité invasive du glioblastome.

4.8.5 Contribution des MT à la récidive du GBM

4.8.5.1 Résistance thérapeutique

Les réseaux de MT confèrent une résistance importante aux cellules tumorales. Ils renforcent leur capacité d'adaptation face aux stress thérapeutiques. Après irradiation, l'augmentation du calcium intracellulaire constitue un signal clé déclenchant l'apoptose (Moon, 2023). Dans les MT interconnectées il y a une redistribution rapide des ions Ca2+ entre cellules. Ce mécanisme permet de maintenir des niveaux calciques plus homogènes et non létaux dans ces cellules en limitant ainsi l'activation de la mort cellulaire programmée (Osswald et al., 2015). Cette redistribution du calcium

contribue à la stabilité fonctionnelle des réseaux et donc à leur résistance accrue à l'irradiation (Osswald et al., 2015). Ces réseaux réduisent également l'efficacité des chimiothérapies conventionnelles, en particulier du TMZ en facilitant la communication intercellulaire et en soutenant l'homéostasie cellulaire en conditions de stress thérapeutique (Weil et al., 2017 ; Schneider et al., 2021). Sur le plan structural, les jonctions communicantes riches en Cx43 jouent un rôle central dans cette résistance (Gui et al., 2025). En effet, l'expression élevée de Cx43 est associée à une moindre sensibilité au TMZ dans les cellules de gliome (Murphy et al., 2016).

4.8.5.2 Récidive tumorale

Après résection chirurgicale, les MT jouent un rôle clé dans la récidive locale en favorisant des mécanismes de réparation tumorale reposant sur la prolifération rapide des cellules gliales résiduelles à la périphérie de la cavité opératoire, facilitant ainsi la repousse tumorale (Weil et al., 2017). Les MT interconnectées émergent notamment lors de la division cellulaire et permettent le maintien de contacts à distance entre cellules filles, contribuant à l'organisation de réseaux multicellulaires fonctionnels. Dans ces réseaux, les cellules tumorales portent fréquemment plusieurs MT, dont une partie présente une forte stabilité et persistance dans le temps (Osswald et al., 2015).

4.8.5.3 Stratégies thérapeutiques ciblant les MT

4.8.5.3.1 Interventions médicamenteuses

Les agents ciblant les microtubules qui pourraient avoir un effet délétère sur les MT, comme le paclitaxel ou la vincristine, sont utilisés dans les gliomes mais restent limités de par leur toxicité. Des alternatives existent comme le ST-401, un agent ciblant les microtubules et capable de franchir la barrière hémato-encéphalique. Il présente un intérêt particulier car il agit comme un inhibiteur modéré de l'assemblage des microtubules, induisant préférentiellement la mort des cellules tumorales en interphase plutôt qu'en mitose, évitant ainsi la formation de cellules polyploïdes géantes associées à la résistance thérapeutique (Vicente et al., 2024). Dès lors, cette propriété confère à ST-401 un avantage potentiel dans le contexte du glioblastome, caractérisé par un faible index mitotique et une forte plasticité cellulaire, en permettant de cibler efficacement une fraction plus large de cellules tumorales tout en limitant l'émergence de mécanismes adaptatifs et résistants.

Dans le prolongement de ces stratégies ciblant la dynamique des microtubules, et bien que des composés comme le ST-401 permettent d'agir directement sur l'architecture cytosquelettique des MT, une approche complémentaire consiste à s'intéresser non plus seulement à leur formation mais à leur fonctionnalité au sein du réseau tumoral.

Le ciblage des réseaux tumoraux peut notamment reposer sur l'inhibition des communications intercellulaires (ICWs), *via* des inhibiteurs des jonctions communicantes comme la carbénoxolone ou la méclofénamate (MFA) ou le tonabersat, qui réduisent la connectivité tumorale et potentialisent l'efficacité du TMZ ainsi que la réponse à la radiothérapie (Schneider et al., 2021 ; Winkler et al., 2021 ; Murphy et al., 2016). Bien que ces approches ne ciblent pas directement les microtubules constituant les MT, elles altèrent la fonctionnalité du réseau tumoral en perturbant les échanges intercellulaires qui s'y propagent. Dans ce contexte, la Cx43, constitue une cible centrale, dont l'inhibition, notamment par des peptides mimétiques comme l'αCT1, bloque la transmission de signaux de survie et de stress au sein du réseau tumoral et contribue ainsi à limiter la résistance thérapeutique. Dès lors, au-delà du ciblage direct des MT, l'interférence avec la communication intercellulaire apparaît comme une stratégie efficace pour désorganiser le réseau tumoral, soit en en réduisant la connectivité, soit en exploitant ses propriétés de diffusion à des fins thérapeutiques.

L'inhibition des MT permet d'isoler les cellules tumorales et de limiter la propagation des signaux de survie, tandis que leur perméabilité aux petites molécules pourrait, à l'inverse, être exploitée pour diffuser des charges thérapeutiques telles que des petits ARN au sein du réseau tumoral. Le pérampanel, antagoniste non compétitif des récepteurs AMPA, réduit la transmission glutamatergique excitatrice et l'activité neuronale synaptique (Potschka et al., 2019). Dans le contexte du GBM, où la signalisation glutamatergique contribue à l'excitabilité et à la progression tumorale, son inhibition pourrait limiter l'activité fonctionnelle des cellules tumorales et de leur microenvironnement. Toutefois, son effet sur les MT ou la communication intercellulaire tumorale reste indirect et n'est pas démontré à ce jour.

Enfin l'inhibition de ROCK empêche le mouvement invasif des cellules de gliome mais induit des MT extrêmement longs et aberrants tandis que le ciblage de mDia par un agoniste (imm02) perturbe l'invasion tumorale dans les modèles de sphéroïdes dérivés de patients atteints de GBM, en

induisant une perte d'expression de mDia et l'effondrement du réseau de MT. Ces résultats suggèrent qu'une modulation coordonnée de l'actine, des microtubules et de leurs régulateurs par le ciblage spécifique de mDia à l'aide de petites molécules pourrait constituer une approche pertinente pour interférer avec la dynamique des MT (Becker et al., 2022).

4.8.5.3.2 Thérapie génique

L'utilisation de technologies d'édition du génome telles que CRISPR-Cas9 permet une régulation précise des gènes liés aux MT, en intervenant spécifiquement sur la dynamique des microtubules afin d'inhiber efficacement l'invasion et la dissémination tumorales. GAP43 et TTYH1 qui jouent des rôles cruciaux dans la formation et la fonction des MT pourrait en être la cible (Wang et al., 2022 ; Jung et al., 2017). L'exploration de technologies de silençage génique ou d'interventions ciblées sur les voies de signalisation associées pourrait également ouvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques. En outre, des facteurs neurotrophiques liés à l'expression de GAP43, tels que le NGF et le NT-4, pourraient devenir des molécules candidates importantes pour explorer ces nouvelles pistes thérapeutiques (Osswald et al., 2015). Enfin, des recherches complémentaires sur des gènes tels que CHI3L1 et NOTCH1, ainsi que sur leurs voies de signalisation nécessaire à la transmission synaptique et la croissance des MT, pourraient avoir un impact significatif sur la progression tumorale et offrir de nouvelles perspectives pour le traitement des tumeurs (Jung et al., 2021).

5. MODELISATION EXPERIMENTALE DU GBM

5.1 Modèles d'études des gliomes

5.1.1 Modèles d'étude in vitro du glioblastome

5.1.1.1 Lignées cellulaires de glioblastome

Les premières approches expérimentales visant à étudier la biologie des gliomes se sont appuyées sur l'utilisation de lignées cellulaires, dérivées aussi bien de tumeurs animales que de glioblastomes humains (Sundarraj, Schachner and Pfeiffer, 1975 ; de Ridder et al., 1987 ; Gómez-Oliva et al., 2021). Ces lignées, telles que U87MG, U251, T98G ou LN-229, se sont imposées comme des outils largement utilisés en recherche fondamentale et préclinique. Leur principal avantage réside dans leur facilité de manipulation, leur forte capacité de prolifération et leur reproductibilité expérimentale, ce qui les rend particulièrement adaptées à l'étude de mécanismes cellulaires et à l'évaluation de la sensibilité aux traitements anticancéreux. Cependant, l'utilisation de ces lignées présente des limites importantes. En effet, les passages successifs en culture induisent une sélection cellulaire progressive, conduisant à une perte de la diversité génétique et phénotypique initiale de la tumeur d'origine. De plus, ces modèles ne reproduisent ni la complexité du microenvironnement tumoral ni l'hétérogénéité intratumorale caractéristique des gliomes humains (Torsvik et al., 2014 ; Allen et al., 2016). Ces biais limitent leur pertinence pour l'étude de la progression tumorale et des mécanismes de résistance thérapeutique observés chez les patients.

5.1.1.2 Cellules souches de glioblastomes et cultures en gliosphère

Afin de mieux refléter la biologie des glioblastomes, des approches reposant sur l'isolement et la culture de CSG ont été développées (Singh et al. 2004). Ces cellules, caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation, peuvent être maintenues *in vitro* dans des conditions favorisant leur phénotype souche, notamment sous forme de cultures sphéroïdales appelées gliosphères, en présence de facteurs de croissance spécifiques (Galli et al., 2004 ; Lee et al., 2006). Ces cultures en gliosphères permettent de préserver une partie de l'hétérogénéité cellulaire observée au sein du glioblastome, en maintenant différents états phénotypiques coexistant au sein de la population tumorale (Sottoriva, 2013). Ces modèles sont particulièrement utiles pour étudier

les mécanismes d'initiation tumorale, de plasticité cellulaire et de résistance aux traitements, souvent attribués aux CSG.

5.1.1.3 Cultures adhérentes sur matrice extracellulaire

En parallèle de culture sous forme de gliosphères, les CSG peuvent également être cultivées en conditions adhérentes sur des matrices mimant la matrice extracellulaire cérébrale, telles que la laminine (Rahman et al., 2015). Ce mode de culture présente l'avantage de conserver les propriétés biologiques essentielles des CSG. Plusieurs études ont ainsi montré que les cultures adhérentes de CSG présentent des profils transcriptomiques et fonctionnels comparables à ceux observés dans les gliosphères, suggérant une pertinence équivalente de ces deux approches *in vitro* (Rahman et al., 2015).

5.1.2 Modèles *in vivo* du glioblastome

Jusqu'à peu, l'analyse des gliomes de l'adulte reposait sur le développement de modèles animaux *in vivo*, indispensables pour étudier la progression tumorale, les interactions avec le microenvironnement cérébral et la réponse aux traitements dans un contexte physiologique (Jacobs et al., 2011 ; Hetze et al., 2021). Plusieurs types de modèles ont ainsi été développés, chacun répondant à des objectifs expérimentaux spécifiques et ayant des atouts et des inconvénients.

5.1.2.1 Modèles de xénogreffe (xénotransplantation)

Les modèles de xénotransplantation reposent sur l'implantation de cellules tumorales humaines dans des souris associées à un niveau d'immunodéficience du plus faible au plus élevé (nude, SCID, NOD/SCID, NSG respectivement) afin d'éviter le rejet. Les cellules peuvent provenir de tumeurs de patients (PDX), de cultures primaires enrichies en cellules souches tumorales ou de lignées établies (Joo et al., 2013 ; da Hora et al., 2019). Dans les gliomes, les greffes sont généralement orthotopiques, c'est-à-dire réalisées dans le cerveau, reflétant à la fois le site anatomique et l'origine interspécifique des cellules. Ces modèles conservent des caractéristiques clés des gliomes, notamment la méthylation du promoteur de MGMT et des altérations fréquentes (EGFR, IDH1/2, TP53, CDKN2A/B) (Verhaak et al., 2010 ; Vaubel et al., 2020). Leur principale limite réside dans l'absence de système immunitaire fonctionnel complet, restreignant l'étude des interactions avec le microenvironnement tumoral (Hidalgo et al., 2014 ; Jacob et al., 2020).

5.1.2.2 Modèles syngéniques

Les modèles syngéniques reposent sur l'implantation de cellules de gliomes murins chez des souris immunocompétentes génétiquement identiques, permettant d'étudier les interactions entre tumeur, microenvironnement et système immunitaire dans un contexte physiologique (Huszthy et al., 2012). Ils sont particulièrement adaptés à l'étude de l'immunosurveillance et des stratégies d'immunothérapie. Cependant, ces modèles présentent des limites, les gliomes murins étant moins invasifs et ne reproduisant pas pleinement les caractéristiques clés des gliomes humains, comme la cooptation vasculaire et l'hétérogénéité cellulaire (Yadav et al., 2024).

5.1.2.3 Modèles murins génétiquement modifiés

Les modèles murins génétiquement modifiés permettent l'induction spontanée de gliomes par l'introduction ciblée d'altérations génétiques impliquées dans la tumorigenèse, telles que l'inactivation de TP53, PTEN ou NF1, ou l'activation de voies oncogéniques comme EGFR ou PDGF (Holland et al., 2001). Ces modèles reproduisent plus fidèlement les étapes précoces de l'initiation tumorale et permettent d'étudier la progression de la maladie dans un environnement cérébral intact et immunocompétent. Bien que ces modèles offrent une forte pertinence biologique, leur mise en œuvre est complexe, coûteuse et associée à une variabilité interindividuelle des phénotypes tumoraux, ce qui peut compliquer l'interprétation des résultats (Kersten et al., 2017).

5.1.2.4 Modèles de souris humanisées

Enfin des modèles murins « humanisés » ont été développés. Ils reposent sur la greffe de progéniteurs hématopoïétiques humains chez des souris immunodéficientes, permettant la reconstitution partielle d'un système immunitaire humain, incluant des composantes innées et adaptatives (Morton et al., 2016). Ils offrent ainsi la possibilité d'étudier les interactions immunitaires dans un contexte plus proche de la physiologie humaine. Encore peu utilisés dans les gliomes de l'adulte, ces modèles apparaissent néanmoins pertinents pour l'étude du microenvironnement tumoral, en permettant d'analyser les interactions entre cellules tumorales, cellules immunitaires humaines et stroma (Rongvaux et al., 2017 ; Morton et al., 2016). Ils constituent ainsi une approche prometteuse pour l'étude des mécanismes immunitaires et l'évaluation préclinique de nouvelles stratégies thérapeutiques.

5.1.2.5 Limites et complémentarité des modèles *in vivo*

Malgré la mise à disposition de nombreux modèles *in vivo* différents, aucun modèle *in vivo* ne permet à lui seul de reproduire l'ensemble de la complexité biologique des gliomes de l'adulte. L'utilisation combinée de modèles xénogreffés, syngéniques et génétiquement modifiés est donc souvent nécessaire afin de s'approcher d'un modèle permettant une compréhension plus globale des mécanismes tumoraux et d'améliorer la transposabilité des résultats vers la clinique (Huszthy et al. 2012)

5.2 Généralités sur les organoïdes et leurs applications

De manière générale, Les organoïdes sont des modèles tridimensionnels innovants capables de reproduire partiellement l'organisation et la diversité cellulaire des tissus humains (Fujii et al., 2018). Ils offrent un environnement plus proche des conditions physiologiques que les cultures 2D, permettant d'étudier développement, différenciation, interactions cellule–cellule et réponses aux stimuli (Fiorenzano, 2021 ; Kim et al., 2025). Ils constituent ainsi des outils majeurs pour la modélisation des pathologies humaines, notamment les maladies neurodégénératives et les cancers, en facilitant l'analyse des dynamiques cellulaires et des altérations moléculaires associées (Heo et al., 2022 ; Zhang et al. 2025).

5.2.1. Génération des organoïdes

La génération d'organoïdes repose sur l'exploitation de cellules souches capables de s'auto-organiser et de reproduire, *in vitro*, certaines propriétés structurales et fonctionnelles des tissus d'origine. Ces approches s'inscrivent dans le développement de modèles tridimensionnels plus représentatifs des conditions physiologiques que les cultures bidimensionnelles, notamment pour l'étude du développement, de la différenciation et des pathologies humaines (Clevers et al., 2016 ; Drost & Clevers, 2017). Dans ce contexte, différentes sources cellulaires peuvent être mobilisées, parmi lesquelles les cellules souches adultes, les cellules souches embryonnaires et les cellules pluripotentes induites (iPSC). Ces dernières occupent une place centrale en raison de leur plasticité

et de leur accessibilité, constituant ainsi un outil privilégié pour la génération d'organoïdes adaptés à des approches de modélisation et de médecine personnalisée.

5.2.1.1 Cellules Souches Pluripotentes Induites (iPSC)

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) sont des outils majeurs pour la modélisation des maladies et la médecine de précision, grâce à leur capacité à générer divers types cellulaires à partir de cellules somatiques humaines (Clevers et al., 2016 ; Drost & Clevers, 2017). Elles permettent également de contourner les contraintes éthiques liées aux cellules souches embryonnaires (Bredenoord et al., 2017). Leur génération repose sur la reprogrammation par les facteurs Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc (Takahashi & Yamanaka, 2006). Cependant, leur production et leur différenciation restent longues et techniquement exigeantes, avec des risques de dérives phénotypiques et de contamination (Turinetto et al., 2017). La stabilité génomique constitue un autre enjeu majeur, nécessitant des contrôles qualité rigoureux (Tapia & Schöler, 2016 ; Assou et al., 2018). Malgré ces limites, les iPSC représentent des modèles fiables et prometteurs pour des applications en médecine personnalisée (Dutta et al., 2017).

5.2.1.2 Matrice extracellulaire naturelle : le Matrigel

Le Matrigel est l'une des matrices les plus utilisées pour la culture d'organoïdes. Dérivé du sarcome murin Engelbreth–Holm–Swarm, il est principalement composé de protéines de la lame basale, telles que la laminine, le collagène IV, l'entactine et des protéoglycanes (Orkin et al., 1977 ; Benton et al., 2014 ; Kibbey, 1994). Cette composition favorise l'adhésion, la polarisation et l'organisation tridimensionnelle des cellules, expliquant son usage répandu dans de nombreux protocoles (Hughes et al., 2010). Toutefois, son origine animale et tumorale, sa composition partiellement définie et sa variabilité inter-lots constituent des limites majeures, notamment en vue d'applications cliniques (Aisenbrey et al., 2020).

5.2.1.3 Réactifs et Milieux de Culture

La génération d'organoïdes repose sur un environnement combinant une matrice tridimensionnelle et des signaux biochimiques. Le milieu de culture apporte les facteurs régulant les états cellulaires (Clevers et al., 2016 ; Sullivan et al., 2022) en contrôlant les voies de signalisation impliquées dans le maintien, l'expansion ou la différenciation, selon le type cellulaire et l'objectif expérimental.

5.2.2 Applications en médecine personnalisée

Les organoïdes dérivés de patients permettent de conserver les caractéristiques propres à chaque tumeur et offrent un modèle plus pertinent pour une approche individualisée de la maladie (Clevers et al., 2016). Ils rapprochent ainsi les modèles expérimentaux de la réalité clinique et ouvrent des perspectives en médecine personnalisée. Ils sont utilisés pour tester ex vivo différentes stratégies thérapeutiques, notamment pour le criblage de composés, l'analyse de la toxicité et l'évaluation de la sensibilité aux traitements (Vlachogiannis et al., 2018 ; Ooft, 2019 ; Skardal et al., 2017 ; Sachs et al., 2018). Cette approche est particulièrement développée en oncologie, où les organoïdes tumoraux permettent d'identifier des traitements adaptés à chaque patient (Sachs et al., 2018 ; Vlachogiannis et al., 2018).

5.2.3. Réduction de l'expérimentation animale

Cette meilleure représentativité renforce la valeur prédictive des organoïdes et leur utilisation comme alternatives ou compléments aux modèles animaux. Ils s'inscrivent dans les principes des 3R (remplacement, réduction, raffinement ; Russell & Burch, 1959). Leur association avec des technologies comme les organ-on-a-chip permet de reproduire des microenvironnements complexes et des interactions multi-tissulaires (Bhatia & Ingber, 2014). Ces approches pourraient ainsi réduire l'expérimentation animale tout en améliorant la pertinence translationnelle des modèles précliniques.

5.3 Les organoïdes cérébraux

Les organoïdes cérébraux sont des modèles tridimensionnels dérivés de cellules souches pluripotentes humaines, reproduisant partiellement des étapes du développement cérébral (Lancaster et al., 2013 ; Lancaster & Knoblich, 2014). Ils intègrent une diversité de populations neuronales et gliales organisées spatialement, offrant un modèle plus proche du tissu cérébral que les cultures 2D. Ils peuvent être générés à partir de cellules souches embryonnaires ou de iPSC, élargissant leur applicabilité (Takahashi et al., 2007 ; Yu et al., 2007). Leur formation repose sur l'auto-assemblage en agrégats tridimensionnels, où s'initient des processus de différenciation dépendants des conditions de culture et des signaux extrinsèques (Wobus et al., 2005). L'intérêt des

organoïdes cérébraux pour la recherche translationnelle et les études sur la neurodégénérescence a été récemment souligné par une revue de 2026, qui met en avant l'utilisation de ces modèles pour décoder les mécanismes moléculaires de maladies comme Alzheimer, grâce à l'intégration de techniques multi-omiques et de bioingénierie avancée. Cette référence illustre l'évolution rapide du champ et l'importance des organoïdes comme plateformes pour la modélisation, le criblage pharmacologique et l'étude des interactions neuronales et gliales en conditions proches du cerveau humain. La section suivante propose une classification des principaux types d'organoïdes neuraux, des modèles non dirigés aux systèmes corticaux dirigés et aux organoïdes plus complexes, afin d'en préciser les caractéristiques, les modalités de génération et les applications.

5.3.1 Organoïdes cérébraux non dirigés

Les protocoles non dirigés reposent sur une auto-organisation spontanée, produisant plusieurs territoires cérébraux (prosencéphale, mésencéphale, rhombencéphale) (Lancaster et al., 2013 ; Renner et al., 2017). Ces organoïdes contiennent des progéniteurs neuraux organisés en rosettes (PAX6, TBR2), des neurones excitateurs et inhibiteurs, ainsi que des cellules gliales qui apparaissant progressivement, avec des astrocytes tardifs et des oligodendrocytes dans les stades très avancés (Renner et al., 2017).

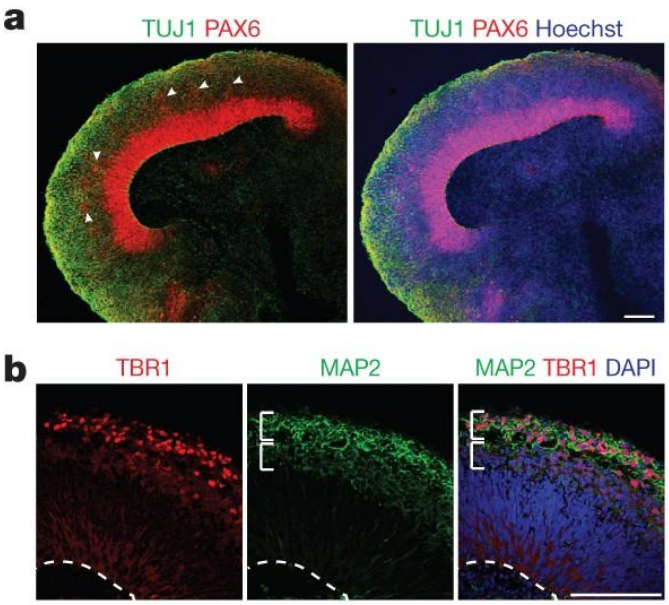


Figure 13: Organisation cellulaire dans un organoïde cérébral

(a) Immunomarquage des progéniteurs neuraux PAX6⁺ et des neurones TUJ1⁺ dans une région corticale dorsale de l'organoïde. Des cellules PAX6⁺ sont également observées en position plus externe, suggérant la présence de cellules gliales radiaires basales (bRGC ou oRGC). Noyaux contre-colorés au Hoechst. (b) Marquage des neurones corticaux précoces TBR1⁺ et des neurones différenciés MAP2⁺, révélant une organisation en couches avec une zone superficielle de type préplaque au-dessus d'une zone neuronale sous-jacente (crochet inférieur). Noyaux contre-colorés au DAPI (d'après Lancaster et al., 2013).

5.3.2 Organoïdes corticaux dirigés

À l'inverse du protocole de Lancaster, les protocoles dirigés contrôlent la régionalisation cérébrale *via* des voies de signalisation spécifiques. Les organoïdes corticaux reposent notamment sur l'inhibition de la voie SMAD suivie de phases d'expansion et de différenciation, permettant d'obtenir des structures plus homogènes et reproductibles (Paşca et al., 2015). Ils présentent une organisation proche du cortex en développement, avec progéniteurs neuraux, glie radiaire, neurones laminaires et activité synaptique fonctionnelle. Les astrocytes apparaissent progressivement, accompagnant la maturation des réseaux neuronaux (Paşca et al., 2015).

5.3.3. Autres type d'organoïdes neuraux

De nombreux protocoles d'organoïdes cérébraux dirigés ont été depuis développés afin de reproduire des identités régionales spécifiques du système nerveux central. Ces approches reposent sur l'utilisation combinée de morphogènes clés du développement permettant de générer des structures mimant le cortex, le télencéphale ventral, le mésencéphale, le cervelet, l'hippocampe, l'hypothalamus ou encore la moelle épinière (voir tableau 9).

Région modélisée	Type	Organoïde dirigé ou non	Facteurs clés	Cellules	Référence
Hypothalamus (identité hypothalamique ventrale)	Agrégats 3D hypothalamiques	Mixte: auto-organisé + dirigé	Approche 1 auto-patterning: gfCDM + insuline + inhibiteur d'Akt. Approche 2 dirigée (monocouche): SB431542 + LDN-193189 + XAV939, puis activation SHH par purmorphamine + SAG; maturation ensuite sur astrocytes corticaux.	Progéniteurs NKX2.1+/RAX+/OTP+/SIM1+; neurones neuropeptidergiques POMC, AGRP, HCRT/orexine, MCH, OXT, AVP, CRH, TRH.	Merkle et al., 2015
Prosencéphale/cortex spécifique; mésencéphale et hypothalamus décrites dans l'étude	Brain region-specific organoids en mini-bioréacteurs	Dirigé / région-spécifique	Patterning forebrain/midbrain/hypothalamus, mini-bioreacteur	NPC SOX2+/NESTIN+, IPC TBR2+, neurones corticaux CTIP2+/SATB2+/CUX1+/BRN2+, couche oSVZ-like riche en oRGC; astrocytes; l'étude exploite ces organoïdes pour modéliser l'infection ZIKV des progéniteurs.	Qian et al., 2016
Télencéphale dorsomédian / pallium médial -> hippocampe	Tissu télencéphalique dorsomédian auto-organisé (type hippocampique)	Semi-dirigé / auto-organisé avec dorsalisation exogène	BMP, WNT (CHIR) dorsalisation hippocampique	Tissus Foxg1+ de pallium médial, domaines Lmx1a+/Otx2+/TTR+ de structures dorsomédianes; neurones granuleux Zbtb20+/Prox1+ et neurones pyramidaux-like Zbtb20+/KA1+, électriquement fonctionnels.	Sakaguchi et al., 2015
Cortex cérébral dorsal – maturation astrocytaire en 3D dans des hCS	Human cortical spheroids (hCS) utilisés comme modèle d'astrocytogenèse/maturation	Dirigé (même hCS que Paşca 2015)	Même base que hCS: dorsomorphin + SB-431542 puis FGF2 + EGF; retrait des facteurs et culture très longue durée (jusqu'à 20 mois) pour maturation; immunopanning HepaCAM pour isoler la lignée astrocytaire.	Lignée astrocytaire à différents stades (radial glia/oRG/APC -> astrocytes matures), neurones corticaux associés; analyse de maturation transcriptionnelle et fonctionnelle (phagocytose, effet sur signaux calciques neuronaux).	Sloan et al., 2017

Région modélisée	Type	Organoïde dirigé ou non	Facteurs clés	Cellules	Référence
Prosencéphale/cerveau multi-régional hétérogène (cortex cérébral ; hippocampe, prosencéphale ventral, plexus choroïde, rétine immature, méninges)	Cerebral organoid	Non dirigé / auto-organisé	Auto-organisation, Matrigel, bioreacteur (sans patterning exogène)	Radial glia (oRG), progéniteurs corticaux, neurones corticaux/pyramidaux, interneurones du prosencéphale ventral, cellules de plexus choroïde, cellules rétiniennes immatures; architecture multi-régionale discrète.	Lancaster et al., 2013
Cortex cérébral dorsal / télencéphale dorsal (structure néocorticale)	Human cortical spheroids (hCS)	Dirigé (patterning minimal, 3D)	Inhibition duale BMP/TGF-β par dorsomorphin + SB-431542; expansion des progéniteurs avec FGF2 + EGF; différenciation neuronale avec BDNF + NT3; culture flottante sans scaffold extracellulaire.	Progéniteurs PAX6+/FOXG1+; neurones corticaux glutamatergiques excitateurs des couches profondes et superficielles; astrocytes non réactifs; synapses fonctionnelles et activité en réseau.	Paşca et al., 2015
Prosencéphale dorsal + ventral assemblés (pallium/subpallium) pour modéliser migration d'interneurones et microcircuits	Assembloïde (fusion hCS + hSS)	Dirigé / région-spécifique puis assemblé	Base hCS/hSS: dorsomorphin + SB-431542 + Y-27632 puis EGF + FGF2; hSS ventralisés par modulation WNT/SHH; maturation avec BDNF + NT3; pour hSS, AlloP ± acide rétinoïque augmente l'activité; fusion physique hSS-hCS.	hCS: neurones corticaux glutamatergiques de couches profondes/superficielles + astrocytes; hSS: progéniteurs NKX2.1+, neurones GABAergiques/interneurones (SST, CR, CB; PV plus tard), quelques OPC; interneurones	Birey et al., 2017
Cortex cérébral vascularisé / cerveau prénatal précoce avec composante vasculaire	Vascularized human cortical organoids (vhCOs)	Dirigé	ETV2 overexpression (vascularisation), différenciation corticale	Progéniteurs SOX2+ (VZ-like), neurones corticaux TBR1+/CTIP2+/SATB2+, réseaux endothéliaux CD31+/CDH5+, caractéristiques BBB (jonctions serrées, transporteurs, résistance transendothéliale).	Cakir et al., 2019
Cortex cérébral avec lignée oligodendrocytaire et myélinisation	Oligocortical spheroids	Dirigé	PDGF-AA, IGF-1, T3 (oligodendrogenèse)	Neurones corticaux, astrocytes, OPC OLIG2+/SOX10+, oligodendrocytes MYRF+/PLP1+/MBP+, myéline initiale puis compacte autour des axones.	Madhavan et al., 2018

Tableau 9: Modèles d'organoïdes cérébraux humains : stratégies de patterning et diversité cellulaire

Vue d'ensemble de modèles représentatifs d'organoïdes cérébraux humains dérivés de cellules souches pluripotentes, illustrant les différences de régionalisation, de stratégies de patterning et de composition cellulaire. Ces modèles s'étendent de systèmes auto-organisés avec un contrôle minimal du patterning (par exemple, les cortical spheroids) à des approches dirigées reposant sur l'utilisation de morphogènes définis (notamment les voies BMP, WNT et SHH) ou sur des manipulations génétiques (comme l'induction de la vascularisation par ETV2). Ils permettent de générer des populations neurales spécifiques de région, incluant des neurones corticaux excitateurs, des neurones hypothalamiques neuropeptidergiques et des neurones hippocampiques, ainsi que, selon les modèles, des cellules gliales et endothéliales. Bien que ces systèmes reproduisent des aspects clés du neurodéveloppement humain (tels que l'organisation des zones progénitrices, la différenciation neuronale et l'activité en réseau) ils présentent des limitations communes, notamment une vascularisation incomplète, un microenvironnement simplifié et une variabilité inter-organoïde. Les références correspondent aux études originales décrivant chaque modèle.

5.3.4 Organoïdes complexes

Ces stratégies permettent d'augmenter la diversité cellulaire et de mieux modéliser les interactions neuronales, gliales et vasculaires, ainsi que les réponses aux conditions pathologiques ou aux traitements. Les organoïdes cérébraux en monoculture ne reproduisent pas la complexité des interactions cellulaires du cerveau, c'est pourquoi des stratégies de co-culture ont été développées pour augmenter leur complexité et mieux refléter la microarchitecture et la connectivité du SNC

(Paşca et al., 2015). Ces modèles enrichis constituent des outils prometteurs pour étudier le développement, les pathologies et la médecine personnalisée. Pour améliorer leur pertinence biologique, les organoïdes cérébraux intègrent désormais des approches plus complexes, incluant la co-culture d'organoïdes, les plateformes microfluidiques organoids-on-a-chip et l'ajout de cellules microgliales ou endothéliales (Andersen et al., 2020).

5.4 Modèle d'organoïde pour l'étude du GBM

L'étude du GBM requiert des modèles expérimentaux capables de restituer, au moins en partie, la complexité architecturale et fonctionnelle de la tumeur, ainsi que ses interactions dynamiques avec le microenvironnement cérébral. Les approches bidimensionnelles restent limitées pour appréhender l'hétérogénéité cellulaire, la plasticité des CSG et les phénomènes d'invasion. Dès lors, le développement de modèles tridimensionnels a permis de renouveler les stratégies d'étude du GBM, en permettant de mieux mimer l'organisation tumorale et ses contraintes physiologiques.

5.4.1 Tumoroïde de GBM

Les organoïdes tumoraux ont renouvelé l'étude *in vitro* du glioblastome en offrant des modèles 3D capables de reproduire, au moins en partie, l'architecture et l'hétérogénéité des tumeurs humaines. Contrairement aux cultures bidimensionnelles, ils permettent de mieux modéliser les interactions cellule/cellule, les gradients d'oxygène ainsi que certains aspects du microenvironnement tumoral (Lancaster and Knoblich, 2014 ; Hubert et al., 2016 ; Jacob et al., 2020). Parmi ces approches, les organoïdes de glioblastome (GBO) se sont imposés comme un modèle de référence pour reproduire l'organisation cellulaire et architecturale du GBM. La stratégie la plus couramment utilisée repose sur la culture directe de fragments tumoraux dérivés de patients. Jacob et al. ont formalisé cette méthode en cultivant des fragments tumoraux sans dissociation, sans matrice ni facteurs de croissance, conduisant à la formation spontanée de structures sphériques en 1 à 2 semaines. Ces GBO conservent l'hétérogénéité génétique, l'architecture tumorale ainsi que des altérations moléculaires clés, et maintiennent un phénotype agressif après xénogreffe (Jacob et al., 2020).

En parallèle, d'autres approches, notamment celle développée par Hubert et al., reposent sur l'utilisation de cellules tumorales intégrées dans du Matrigel, générant des structures organisées caractérisées par une périphérie prolifératives et un cœur hypoxique enrichi en CSG, reproduisant plus fidèlement la hiérarchie tumorale que les sphéroïdes classiques (Hubert et al., 2016). Par ailleurs, les GBO peuvent conserver certaines composantes du microenvironnement tumoral, incluant des cellules immunitaires, stromales et endothéliales, permettant ainsi d'étudier les interactions impliquées dans l'invasion tumorale et la résistance thérapeutique (Huang et al., 2020). Dans ce contexte, ces modèles sont aujourd'hui largement utilisés pour analyser la progression tumorale, les mécanismes de résistance et les réponses aux traitements (Jacob et al., 2020 ; Bhaduri et al., 2020 ; Goranci-Buzhala et al., 2020).

5.4.2 Organoïde cérébral néoplasique (NeoCOR)

Les organoïdes cérébraux dérivés d'iPSC sont utilisés pour modéliser le développement cérébral et ont été adaptés au glioblastome par introduction d'altérations génétiques. Bian et al. ont développé les « neoCORs », combinant tissu cérébral sain et régions transformées au sein d'un même organoïde, permettant d'étudier invasion et interactions avec le microenvironnement (Bian et al., 2018). Dans la continuité, Ogawa et al. ont montré qu'une inactivation de TP53 associée à HRasG12V induit un phénotype tumoral invasif et prolifératif dans ces modèles (Ogawa et al., 2018). Cette observation s'inscrit dans les classifications moléculaires du glioblastome définies par Verhaak et al., qui ont identifié plusieurs sous-types transcriptionnels majeurs (proneural, classical et mesenchymal) associés à des altérations génétiques spécifiques, telles que les mutations de TP53, l'amplification d'EGFR ou encore les anomalies de NF1, reflétant l'hétérogénéité biologique du GBM (Verhaak et al., 2010). Cependant, ces systèmes restent limités par des temps de culture longs et par l'introduction d'altérations génétiques définies, restreignant la diversité moléculaire observée dans les tumeurs humaines.

5.4.3 Modèle de coculture GLICO (*glioma on cerebral organoid*)

De nouveaux systèmes hybrides ont été développés afin de mieux reproduire les interactions entre cellules tumorales et tissu cérébral. Parmi eux, les modèles dits GLICO (« glioma on cerebral organoid ») reposent sur la co-culture de cellules de gliome avec des organoïdes cérébraux

différenciés. Une première démonstration de ce principe a été réalisée par da Silva et al., qui ont associé des sphéroïdes de GBM humains dérivés de cellules souches tumorales à des cellules souches embryonnaires murines (da Silva et al., 2018). Cette approche a ensuite été perfectionnée par Linkous et al., qui ont développé un modèle reposant sur l'intégration de cellules souches de glioblastome issues de patients, exprimant la GFP, dans des organoïdes cérébraux humains générés selon le protocole de Lancaster. Ce système permet d'observer directement l'infiltration tumorale au sein d'un tissu cérébral tridimensionnel (Linkous et al., 2019). Les cellules tumorales utilisées dans ces dispositifs expérimentaux peuvent être isolées à partir de prélèvements chirurgicaux récents ou provenir de lignées cellulaires établies, ce qui confère à ces modèles une grande flexibilité expérimentale (Linkous et al., 2019 ; Pine et al., 2020 ; Krieger et al., 2020 ; Fedorova et al., 2023).

Un intérêt majeur de ces approches réside dans leur capacité à restituer la variabilité interindividuelle caractéristique du glioblastome. Les travaux de Linkous et al. ont ainsi montré que des GLICO générés à partir de tumeurs de patients différents présentent des réponses distinctes à la chimiothérapie et à l'irradiation. Ces modèles reproduisent également les profils d'invasion et de prolifération observés dans les tumeurs d'origine, ce qui en fait des outils particulièrement pertinents pour l'étude des interactions entre cellules tumorales et tissu cérébral (Linkous et al., 2019). Dans une étude plus récente, Fedorova et al. 2023 ont utilisé un modèle GLICO combinant des organoïdes cérébraux matures avec des cellules de glioblastome marquées par des fluorophores afin d'analyser finement les dynamiques d'invasion tumorale. Les auteurs montrent notamment que la présence de composants de la matrice extracellulaire, tels que le Matrigel ou le Geltrex, favorise fortement la migration des cellules tumorales. L'utilisation conjointe de la microscopie confocale et de techniques de transparisation tissulaire permet par ailleurs une analyse tridimensionnelle quantitative précise de l'invasion. Ainsi, alors que Linkous et al. 2019 établissait principalement la preuve de concept du modèle GLICO, cette étude en propose une caractérisation plus fine et mécanistique, en mettant en évidence le rôle du microenvironnement extracellulaire. Dans ce prolongement, Krieger et al. apportent une dimension fonctionnelle supplémentaire en montrant que les cellules de glioblastome ne se limitent pas à infiltrer le tissu cérébral, mais établissent des interactions actives avec celui-ci, notamment via la formation de réseaux tumoraux

interconnectés et des interactions avec les neurones, suggérant une intégration fonctionnelle au sein du microenvironnement cérébral (Krieger et al. 2020).

Malgré ces avancées, plusieurs limites demeurent. Les organoïdes cérébraux utilisés dans ces systèmes restent en particulier dépourvus de vascularisation fonctionnelle et de véritables compartiments immunitaires, deux éléments pourtant essentiels dans la progression et l'agressivité du GBM in vivo (da Silva et al., 2018 ; Linkous et al., 2019 ; Xu et al., 2024).

Afin d'explorer plus finement les interactions entre cellules de glioblastome et microenvironnement neural humain, de nombreux travaux ont, dans le prolongement du modèle GLICO, développé des approches de co-culture basées sur des organoïdes cérébraux. Ces systèmes ont permis d'élargir les applications initiales, en intégrant des analyses quantitatives de l'invasion, des approches transcriptomiques à l'échelle unicellulaire, ainsi que l'évaluation de stratégies thérapeutiques. Plus récemment, des variantes du modèle ont également été proposées afin de mieux reproduire la complexité du microenvironnement tumoral. Dans ce contexte, le tableau 10 présente une synthèse des principales études utilisant des modèles de type GLICO ou apparentés.

Depuis le travail fondateur de Linkous et al. (2019), ces systèmes ont permis de reproduire de manière robuste l'invasion diffuse du glioblastome dans un microenvironnement neural humain, la formation de réseaux de microtubes tumoraux et la plasticité transcriptionnelle des cellules tumorales au contact du tissu cérébral. L'ensemble de ces travaux souligne l'importance centrale du microenvironnement neural humain dans la biologie du glioblastome et positionne les systèmes GLICO comme des outils de référence pour l'étude de l'invasion tumorale et le développement de stratégies thérapeutiques. Le travail présenté dans cette thèse s'inscrit dans cette dynamique et vise à développer plusieurs modèles expérimentaux d'invasion afin d'explorer plus finement les interactions entre cellules tumorales et microenvironnement cérébral.

Référence	Objectif principal	Résultats principaux	Résultats secondaires	Apport à la littérature
Linkous et al., 2019	Créer un modèle humain d'invasion GBM dans un tissu cérébral 3D	Les CSG migrent vers l'organoïde, envahissent profondément, prolifèrent et forment des tumeurs qui phénotypent les GBM des patients	Microtubes tumoraux et propagation calcique observés; pas de différence d'invasion selon l'âge de l'organoïde ni hESC vs hiPSC; une lignée conserve une amplification EGFR perdue en 2D	Papier fondateur qui établit le terme et le concept GLICO
Goranci-Buzhala et al., 2020	Standardiser un test rapide et quantifiable d'invasion/intégration	Le système distingue des comportements d'invasion selon les échantillons tumoraux et permet une quantification rapide de l'intégration des CSG	Les CSG primaires et récurrentes se comportent différemment; l'inhibiteur d'ADAM10 GI254023X réduit l'intégration; l'invasion diminue avec l'âge de l'organoïde; interactions avec neurones matures	Transforme GLICO en plateforme d'essai plus rapide et plus standardisable
Krieger et al., 2020	Coupler invasion en organoïde et transcriptomique unicellulaire	Les cellules tumorales envahissent l'organoïde, forment des réseaux de longs microtubes et modifient leur programme transcriptionnel au contact du tissu neural	Tissue clearing + microscopie confocale + scRNA-seq; 45 gènes significativement régulés de façon cohérente sur 3 lignées après co-culture; paires ligand-récepteur thérapeutiquement pertinentes	Premier papier à relier invasion GLICO et reprogrammation transcriptomique single-cell
Pine et al., 2020	Comparer l'effet du microenvironnement sur les états cellulaires GBM	GLICO et PDX recapitulent bien mieux les états cellulaires des tumeurs primaires que les sphères 2D ou certains tumoroïdes	GLICO enrichit notamment la fraction NPC-like et préserve une diversité d'états plus large; replating en 2D entraîne une perte des états NPC-like/AC-like; dialogue ligand-récepteur de type neurodéveloppemental	Montre que le microenvironnement neural humain n'est pas accessoire mais central pour la plasticité GBM
Mangena et al., 2025	Modéliser la diversité d'états cellulaires GBM et les transferts intercellulaires	Les glioblastoma cortical organoids (GCO) reproduisent mieux que les gliospheres la diversité et les programmes d'états cellulaires	Le modèle révèle un transfert massif de GFP/protéines/ARNm des cellules malignes vers les cellules non malignes, dans un contexte neuroglial humain	Fait passer le champ de l'invasion seule vers l'étude des transferts intercellulaires, **(GLICO-like)**
Kim et al., 2025	Construire un assembloïde tumoroïde/organoïde pour suivre l'invasion	Le modèle GCOA capture l'invasion en temps réel, à la fois single-cell et collective, avec microtubes tumoraux et interactions tumeur/tissu hôte.	surface envahie sur 30 jours; 103 gènes différentiels séparent cellules invasives vs résidentes (VIM, PLAU, SNAI1, TNC, FN1, ITGA1, CDH1...).	Donne une plateforme pour imagerie 3D et dissociation invasion/résidence **(GLICO-like)**
Ge et al., 2026	Identifier des interactions fonctionnelles tumeur/microenvironnement dans un système organoïde	HOTT recapitule les grands états cellulaires tumoraux et met en avant PTPRZ1 comme médiateur fonctionnel de communication tumeur/hôte	Le knockdown de PTPRZ1 augmente la fraction mésenchymateuse, les programmes EMT et la longueur des microtubes tumoraux	Analyse de signaux de communication tumeur/organoïde (**GLICO-like)**
Baisiwala et al., 2026	Ajouter une composante immunitaire au paradigme organoïde GBM	iHOTT préserve les compartiments tumoral et immunitaire et reproduit des réponses immunes patient-spécifiques, y compris sous pembrolizumab	Le système conserve populations et interactions cellule/cellule; pembrolizumab reproduit des shifts observés chez les patients, expansion de clonotypes CD4	Très important car il ouvre la voie à l'étude de l'immunothérapie dans des modèles dérivés de GLICO **(GLICO-like)**

Référence	Objectif principal	Résultats principaux	Résultats secondaires	Apport à la littérature
Pedrosa et al., 2023	Tester l'efficacité de la 5-ALA-PDT sur cellules GBM infiltrantes	La 5-ALA-PDT augmente l'apoptose spécifiquement dans les régions tumorales envahissantes, peu d'effet sur zones organoïdes non envahies	Apoptose dans les zones d'invasion	Pas explicitement un GLICO mais très proche du GLICO (**GLICO-like)**
Nicholson et al., 2024	Étudier l'évolution tardive de GLICO sur des durées longues	Les ltGLICOs montrent une longue latence avant expansion des CSG, puis une progression favorisée par hypoxie chronique et stress oxydant	Le développement initial des organoïdes reste peu perturbé; avec le vieillissement le microenvironnement favorise l'expansion tumorale	Important car il déplace GLICO d'un readout d'invasion vers un modèle d'évolution tumorale dans le temps
Ramani et al., 2024	Rendre l'usage des organoïdes plus reproductible et compatible avec du screening	Les Hi-Q organoids produisent des patrons d'invasion reproductibles et permettent un criblage à débit intermédiaire d'inhibiteurs d'invasion	Les cellules adhèrent en 24 h puis infiltrent l'organoïde en 24–72 h avec protrusions de type microtube; Selumetinib et Fulvestrant ressortent du screen	Étape importante vers la standardisation des modèles type GLICO ; Pas explicitement un GLICO mais très proche **(GLICO-like)**
Fedorova et al., 2023	Développer un pipeline de migration/analyse dans organoïdes matures	La matrice extracellulaire augmente la croissance et la migration des cellules GBM dans les organoïdes et raccourcit le délai d'initiation de migration	Distances médianes de migration selon matrice (Geltrex/Matrigel) ; la co-culture rapproche le transcriptome d'états proneural	Très utile pour quantification, visualisation et optimisation technique du readout de migration
Yang et al., 2023	Tester le safranal contre le GBM dans un modèle organoïde	Safranal inhibe la prolifération et l'invasion GBM dans la co-culture avec organoïdes et agit en synergie avec TMZ	Le papier rapporte une réduction de l'aire d'invasion à 100 µM et une inhibition de l'axe PI3K/AKT/mTOR avec apoptose et arrêt G2/M	Exemple supplémentaire de la littérature thérapeutique pas modèle GLICO mais modèle très proche du GLICO (**GLICO-like)**
Fan et al., 2024	Tester si l'identité régionale du cerveau hôte influence l'invasion GBM	Le GBM envahit les organoïdes dorsaux/excitateurs et migre le long de leurs axones, mais beaucoup moins les organoïdes ventraux/inhibiteurs	La co-culture augmente la fréquence de décharge et les bursts dans les organoïdes dorsaux; le marqueur VGAT diminue dans ce contexte	Introduit une dimension région-spécifique et circuit-level absente des GLICO de première génération, co-culture GBM–organoïde (**GLICO-like)**

Tableau 10 : Modèles de co-culture glioblastome–organoïdes cérébraux (GLICO et dérivés) : avancées expérimentales, applications et limites

*Ce tableau présente une synthèse des principales études utilisant des modèles de co-culture entre cellules de glioblastome humain, en particulier des cellules souches tumorales (CSG), et des organoïdes cérébraux humains, communément désignés sous le terme GLICO (glioblastoma organoid co-culture) ou variantes. En effet, le terme « GLICO » n'est pas systématiquement employé dans la littérature. Néanmoins, de nombreux modèles reposent sur une co-culture entre un organoïde cérébral humain et des cellules de glioblastome ou des tumoroïdes dérivés de patients. Dès lors, bien que ces systèmes ne soient pas explicitement désignés comme tels dans les publications originales, leur conception correspond aux caractéristiques des modèles GLICO. Pour cette raison, ils sont regroupés dans ce travail sous l'appellation « **GLICO-like** », comme indiqué dans la dernière colonne du tableau.*

6 : JUNCTION-MEDIATING AND REGULATORY (JMY)

6.1 Généralités

Le gène humain JMY (Junction-Mediating and regulatorY protein), également connu sous les noms WHAMM2 ou WHDC1L3, est localisé sur le chromosome 5 (5q14.1 ; positions 79 236 131–79 327 211 pb, GRCh38). L'existence de plusieurs variants d'épissage de l'ARN de JMY a été rapportée dans la publication princeps décrivant ce gène, mais n'a pas, jusqu'à ce jour, fait l'objet d'analyses plus approfondies. Néanmoins, les auteurs ont décrit la présence d'une isoforme sans sa région riche en proline qui perd sa capacité à induire une apoptose dépendante de p53 (Shikama 1999).

En effet, JMY a été initialement identifiée par la méthode du double hybride comme une protéine interagissant avec le complexe de coactivateurs transcriptionnels p300/CBP et impliquée dans la régulation de la transcription de p53 (Shikama et al., 1999). La protéine STRAP a par la suite été identifiée comme interagissant avec ces coactivateurs (Demonacos et al., 2001) renforcant leur activité coactivatrice sur le promoteur de p53 et contribuant ainsi à l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle et l'apoptose (Shikama et al., 1999 ; Coutts & La Thangue, 2005 ; Adighibe & Pezzella, 2018 ; Demonacos et al., 2001). Cette fonction transcriptionnelle est par ailleurs régulée par différents mécanismes qui seront détaillés ultérieurement dans ce manuscrit.

En 1999, shikama et al. avaient établi que JMY ne présentait aucune similarité avec des protéines connues (Shikama et al., 1999). Cependant quelques années plus tard, JMY a été identifiée comme un membre de la famille WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein), qui regroupe plusieurs facteurs de nucléation de l'actine tels que WASP, N-WASP, WAVE, WASH et WHAMM (Verboon et al., 2015). JMY possède différents domaines fonctionnels dont un domaine C-terminal de type WCA contenant plusieurs motifs WH2 (Zuchero et al., 2009), lui conférant une double activité de nucléation. Cette propriété peu commune par rapport aux nucléateurs classiques, suggère que JMY possède une forte plasticité fonctionnelle (Zuchero et al., 2009 ; Rottner et al., 2010 ; Campellone & Welch, 2010).

Au niveau cellulaire, JMY est exprimée de manière relativement ubiquitaire dans les cellules humaines, bien que son niveau d'expression puisse varier selon le type cellulaire et les conditions de stress (Adighibe & Pezzella, 2018). Elle présente une localisation dynamique, alternant entre

cytoplasme et noyau en réponse à des signaux de stress (Zuchero et al., 2009 ; Coutts et al., 2009). Cette localisation cytoplasmique ou nucléaire lui confère une coordination entre le remodelage du cytosquelette, la motilité cellulaire et l'activation de programmes transcriptionnels dépendants de p53 (Wrighton et al., 2009 ; Rottner et al., 2010 ; King et al., 2021). JMY apparaît ainsi comme une protéine multifonctionnelle à l'interface entre dynamique de l'actine, signalisation et contrôle transcriptionnel, constituant un nœud d'intégration majeur permettant l'adaptation cellulaire face aux contraintes environnementales.

6.2 Structure et domaines fonctionnels

Le gène JMY, localisé sur le chromosome 5 en 5q14.1, comprend 11 exons et code une protéine de 988 acides aminés, d'environ 110 kDa (Figure 14). Sa structure protéique est organisée en plusieurs domaines fonctionnels. Le domaine N-terminal (NT) est impliqué dans la régulation transcriptionnelle, notamment *via* l'interaction avec p53 et ses cofacteurs. La région centrale inclut un domaine en hélice enroulée (coiled-coil) et une région riche en proline (Pro), participant à la dynamique intracellulaire et aux interactions protéiques, ainsi que des signaux de localisation nucléaire (NLS ; Figure 14). Le domaine C-terminal contient trois motifs WH2 (Wa, Wb, Wc) suivis des régions C et A, constituant le module WCA responsable de la nucléation de l'actine et de l'activation du complexe Arp2/3 (Figure 14). Cette organisation modulaire confère à JMY une double fonction à l'interface entre régulation transcriptionnelle et remodelage du cytosquelette.

6.2.1 Domaine N-terminal (transcription – interaction avec p53)

Le domaine N-terminal de JMY possède un rôle central dans ses fonctions transcriptionnelles, en assurant des interactions avec des complexes protéiques comme les coactivateurs transcriptionnels p300/CBP et STRAP. Bien que la nature exacte de son interaction directe avec p53 reste à démontrer (Adighibe et al., 2018), c'est l'association de JMY à ces complexes protéiques qui permet à cet ensemble de soutenir l'activité de p53.

En condition de stress génotoxique, JMY s'accumule dans le noyau où elle est recrutée, *via* son interaction avec p300, au niveau des promoteurs des gènes cibles de p53, sans liaison directe avec l'ADN.

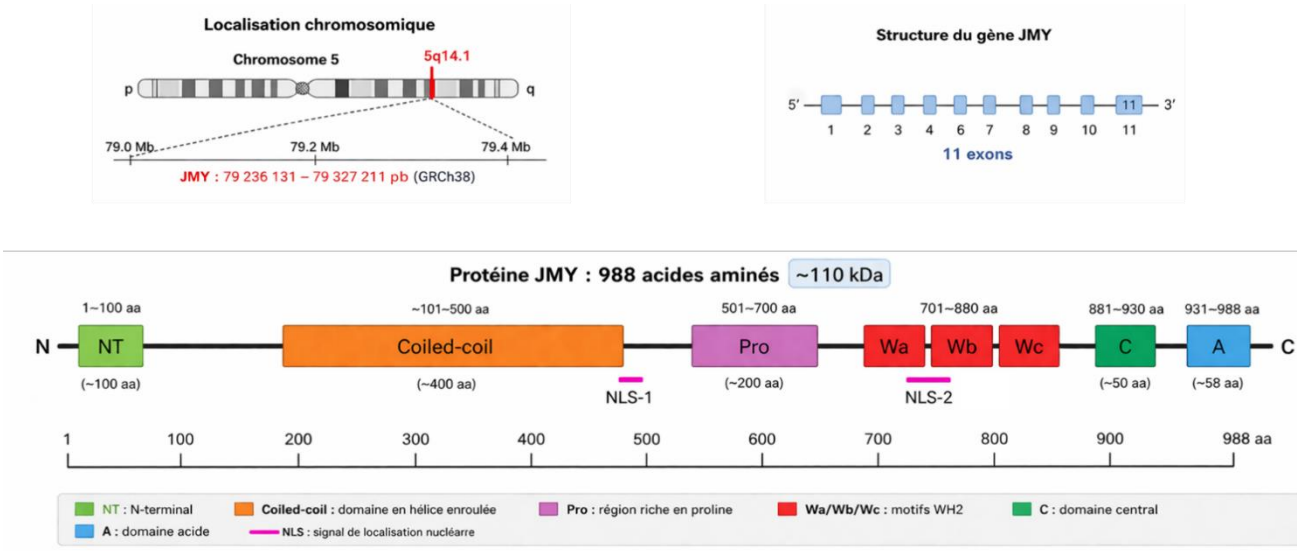


Figure 14: Localisation chromosomique et structure génique et protéique de JMY

La protéine JMY présente une organisation modulaire en trois domaines fonctionnels distincts. Son domaine N-terminal est impliqué dans la régulation transcriptionnelle, notamment via son interaction avec p53 et les coactivateurs p300/CBP. La région centrale participe au contrôle de sa localisation et de sa dynamique intracellulaire. Enfin, le domaine C-terminal, contenant le motif WCA, confère à JMY sa capacité à nucléer et à organiser les filaments d'actine, soit de manière indépendante, soit via l'activation du complexe Arp2/3.

Elle participe ainsi à l'activation de programmes transcriptionnels impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Coutts et al., 2007 ; Coutts et al., 2009 ; Adighibe & Pezzella, 2018 ; Demonacos et al., 2001 ; Hershko et al., 2005 ; Adams et al., 2012).

L'interaction entre JMY et STRAP, médiée par les répétitions TPR, contribue également à la formation d'un complexe transcriptionnel fonctionnel avec p300. La stabilisation de ce complexe repose sur la phosphorylation de STRAP par la kinase ATM favorisant son accumulation nucléaire, pour conduire à une augmentation de l'activité acétyltransférase de p300 vis-à-vis de p53 et par conséquent, à une amplification de la transcription des gènes pro-apoptotiques (Demonacos et al., 2001 ; Coutts et al., 2005).

6.2.2 Domaine central (régulation et trafic intracellulaire)

Le domaine central de JMY quant à lui joue un rôle clé dans la régulation de sa localisation subcellulaire et dans la coordination de ses fonctions nucléaires et cytoplasmiques. Sur le plan structural, ce domaine présente une organisation majoritairement α-hélicoïdale compatible avec une architecture de type coiled-coil, contribuant à la stabilité de la protéine et aux interactions protéine/protéine (Kramer et al., 2022). Ce type de structure agit comme une plateforme

d'assemblage favorisant la formation de complexes multiprotéiques et pourrait moduler la conformation de JMY, influençant l'accessibilité des domaines fonctionnels situés dans la région C-terminale de JMY qui sont impliqués dans la nucléation de l'actine (Kramer et al., 2022).

6.2.3 Domaine C-terminal WCA (régulation de l'actine)

Entre le domaine central et le domaine C-terminal se trouve une région riche en prolines qui assure le recrutement de partenaires *via* des motifs PxxP reconnus par des domaines SH3 (Bieling et al., 2018). Dans le cas de JMY, ce domaine polyProline favorise le recrutement de la profiline ainsi que l'approvisionnement en G-actine vers les domaines WH2 (WASP homology 2) qui permettront de nucléer les monomères d'actine (Campellone & Welch, 2010 ; Veltman et al., 2010 ; Kramer et al., 2022).

Le domaine C-terminal de JMY contient le domaine responsable de la régulation de l'actine autour d'un module WCA (WH2–Central–Acidic), caractéristique des nucleation-promoting factors (NPFs), et qui confère à JMY à la fois une capacité directe de nucléation de l'actine et une capacité d'activation du complexe Arp2/3 (Zuchero et al., 2009 ; Rottner et al., 2010 ; Campellone & Welch, 2010). Les motifs WH2, modules d'environ 18–20 acides aminés et au nombre de trois chez JMY, assurent la liaison à la G-actine au niveau d'une interface impliquée dans l'incorporation des monomères aux filaments (Veltman & Insall, 2010). En stabilisant ces monomères dans une conformation favorable, ils abaissent la barrière énergétique de nucléation et participent ainsi au contrôle de la polymérisation. Cette activité est renforcée par la région riche en prolines, qui recrute la profiline ainsi que des partenaires à domaines SH3, facilitant l'approvisionnement en G-actine et son transfert vers les domaines WH2 (Campellone & Welch, 2010 ; Kramer et al., 2022).

Dès lors, l'efficacité de ces domaines dépend directement de la disponibilité cytoplasmique de JMY. Cette disponibilité est elle-même régulée par un mécanisme étroitement couplé à la dynamique de l'actine. En effet, la liaison des domaines WH2 à la G-actine favorise la rétention cytoplasmique de JMY. À l'inverse, une diminution du pool de G-actine permet son interaction avec les importines et son import nucléaire grâce au dévoilage d'un site NLS2 situé entre le premier et le deuxième WH2 notamment après une irradiation UV (Figure 14 ; Zuchero et al., 2012). Ce mécanisme confère à JMY une sensibilité directe à l'état de polymérisation de l'actine et participe au contrôle de son trafic

nucléocytoplasmique (Zuchero et al., 2012). Dès lors, JMY apparaît comme un intégrateur dynamique reliant organisation du cytosquelette et régulation de sa propre localisation. Enfin à l'extrémité C-terminale sont retrouvés une région centrale (C ou connecting region) et une région acide (A) qui complètent ce dispositif en activant le complexe Arp2/3, conduisant à la formation de réseaux d'actine branchés à partir de filaments préexistants (Zuchero et al., 2009 ; Rottner et al., 2010). JMY combine ainsi, dans une même protéine, une activité de nucléation primaire indépendante et une capacité d'amplification *via* Arp2/3 (Zuchero et al., 2009 ; Kramer et al., 2022). Cette organisation s'inscrit dans la logique des protéines de la famille WASP, où la coopération entre motifs WH2 et régions riches en proline permet de coordonner le recrutement des complexes profiline/actine et l'élongation des filaments (Veltman & Insall, 2010 ; Campellone & Welch, 2010 ; Kramer et al., 2022). Sur le plan évolutif, JMY appartient à cette famille, bien que, contrairement aux membres classiques (WASP/N-WASP, WAVE, WASH), il soit apparu plus tardivement, principalement chez les bilatériens et les vertébrés (Veltman & Insall, 2010). Le tableau 11 résume les similitudes et les différences entre les principaux membres de la famille WASP.

Caractéristiques	WASP / N-WASP	WAVE	WHAMM	JMY
Organisation structurale	Domaine régulateur N-ter + module WCA	WHD/SHD + région proline + WCA	2 domaines WH2 + WCA	3 WH2 en tandem (WWWCA) + WCA
Module WCA	Présent	Présent	Présent	Présent
Mécanisme d'activation	Auto-inhibition levée par Cdc42 / phospholipides	Activation via complexe WRC	Interactions membranes + microtubules	Dépend localisation et partenaires
Contrôle Arp2/3	Strict	Coordonné via WRC	Couplé aux membranes	Flexible et contextuel
Localisation	Membrane plasmique	Front migratoire	RE / Golgi / microtubules	Cytoplasmique + nucléaire
Fonctions principales	Protrusions, invasion	Lamellipodes, migration	Trafic vésiculaire	Actine + transcription p53
Rôle invasion	Formation protrusions invasives	Migration dirigée	Indirect	Migration et plasticité
Particularité	Auto-inhibition stricte	Activation collective	Lien membranes-actine	Double fonction (actine + noyau)
Références	Rottner 2010; Campellone 2010	Rottner 2010; Campellone 2010	Rottner 2010	Zuchero 2009; Kramer 2022

Tableau 11 : Comparaison structurale et fonctionnelle des principaux membres de la famille WASP impliqués dans la régulation de l'actine

Ce tableau synthétise les caractéristiques structurales, les mécanismes d'activation et les fonctions biologiques des principales sous-familles de protéines WASP (WASP/N-WASP, WAVE, WHAMM et JMY). Bien que ces protéines partagent un module C-terminal conservé (WCA) responsable de l'activation du complexe Arp2/3, elles se distinguent par leurs domaines régulateurs, leurs modes d'activation et leurs localisations subcellulaires. Ces différences conditionnent leurs rôles respectifs dans la dynamique du cytosquelette, la migration cellulaire et les processus invasifs. JMY se singularise par une régulation dépendante du contexte cellulaire et par sa double fonction, associant contrôle de la polymérisation de l'actine dans le cytoplasme et modulation transcriptionnelle dépendante de p53 dans le noyau (Rottner et al., 2010 ; Campellone & Welch, 2010 ; Zuchero et al., 2009 ; Kramer et al., 2022).

Ainsi, le domaine C-terminal de JMY constitue un domaine intégré capable d'orchestrer différentes modalités d'assemblage de l'actine tout en s'articulant avec des fonctions transcriptionnelles. Cette dualité positionne JMY comme un régulateur atypique à l'interface entre dynamique du cytosquelette, motilité cellulaire et réponse au stress (Wrighton et al., 2009 ; King et al., 2021 ; Kramer et al., 2022).

6.3 Régulation de JMY

6.3.1 Régulation transcriptionnelle de JMY

6.3.1.1 E2F1

L'expression de JMY est modulée en contexte de stress génotoxique. Elle peut être induite *via* le facteur E2F1, contribuant à renforcer les programmes transcriptionnels dépendants de p53 (Hershko et al., 2005 ; Adighibe & Pezzella, 2018). Cette induction s'accompagne d'une augmentation d'autres cofacteurs de p53, tels que ASPP1, ASPP2 et TP53INP1 (Hershko et al., 2005 ; Coutts et al., 2007).

Plus récemment, JMY a également été décrite comme une cible transcriptionnelle d'E2F1 dans un contexte de dérégulation de la voie pRB (protéine du rétinoblastome), un régulateur clé du cycle cellulaire contrôlant l'activité des facteurs E2F. Cette induction, absente lors d'une activation physiologique d'E2F, s'inscrit dans un programme transcriptionnel associé à la suppression tumorale plutôt qu'à la prolifération, JMY étant co-régulée avec des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle et l'apoptose (Kitamura et al., 2015).

6.3.1.2 HIF-1α

JMY interagit avec p300/CBP, des coactivateurs transcriptionnels omniprésents qui interagissent eux-mêmes avec divers facteurs de transcription spécifiques à certaines séquences, notamment le facteur inductible par l'hypoxie (HIF-1α). Ainsi, Coutts et al ont démontré à l'aide d'expérience de chromatine IP que HIF-1α était recruté au niveau du promoteur de JMY en condition hypoxique ou après un traitement au DFO (déféroxamine) supportant l'existence d'éléments sensibles à HIF-1α

dans sa région promotrice. Cette induction est strictement dépendante de HIF-1α, dont l'inhibition abolit l'augmentation d'expression de JMY (Coutts et al., 2011)

L'examen de la région promotrice en amont de JMY a permis d'identifier plusieurs HRE putatifs ressemblant étroitement à la séquence canonique A/G CGTG ainsi qu'une séquence plus large, bien que moins bien définie, BACGTSSK (Rankin et Giaccia, 2008 ; Semenza, 2010). Il est intéressant de noter que six HRE putatifs ont été identifiés dans le promoteur de JMY humain. Parmi ceux-ci, le groupe de cinq est hautement conservé chez différentes espèces, tandis qu'un HRE plus distal n'est présent que dans le promoteur JMY humain.

Fonctionnellement, JMY agit comme un effecteur en aval de HIF-1α en favorisant la migration et l'invasion *via* le remodelage du cytosquelette d'actine : sa déplétion réduit ces processus, tandis que sa surexpression les augmente (Coutts et al., 2011). Dans le contexte tumoral, caractérisé par une hypoxie chronique, cette régulation positionne JMY comme un acteur de la plasticité cellulaire et des capacités invasives. Ainsi, la combinaison d'une stabilisation protéique en réponse au stress, d'une régulation transcriptionnelle dépendante de HIF-1α et de l'assemblage de complexes coactivateurs permet une accumulation nucléaire de JMY et l'amplification de la réponse transcriptionnelle dépendante de p53, positionnant cette protéine comme un relais central entre signaux de stress et programmes transcriptionnels adaptatifs

6.3.2 Régulation post-traductionnelles

JMY est intégrée dans des réseaux de régulation post-transcriptionnelle.

6.3.2.1 Régulation par les ARN non codants

Lors de stress ischémique, Ke et al. ont pu démontrer que les microARN miR-218-5p et miR-363-3p régulent l'expression de p53 et de JMY en se liant à la région promotrice de p53 et à la région non traduite 3' de JMY. De plus, le traitement des fibroblastes cardiaques par miR-218-5p ou miR-363-3p entraîne une régulation à la hausse de l'expression de p53 et une régulation à la baisse de celle de JMY, favorisant la transition mésenchymateuse-endothéliale et inhibant la fibrose myocardique (Ke et al., 2021). Dans le même domaine, il a également été montré que le circARN circ_0001148 favorise la formation de plaques en induisant la transition endothéliale-mésenchymateuse (EndMT)

dans un modèle d'athérosclérose. Ce mécanisme repose sur la régulation de JMY, dont l'expression est augmentée *via* le piégeage du miR-218-5p. L'inhibition de JMY ou la restauration du miR-218-5p atténue cette progression, soulignant le rôle central de JMY dans ce processus pathologique (Yu et al., 2025). Enfin, JMY pourrait également être impliquée dans la réponse cellulaire à des infections virales. Par exemple, lors de l'infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV), JMY apparaît comme une cible de plusieurs microARN viraux dans les plaquettes, indiquant une régulation potentielle de son expression. Ces observations laissent envisager un rôle de JMY dans la modulation des réponses cellulaires et immunitaires en contexte viral (Wu et al., 2022).

6.3.2.2 Régulation de JMY par phosphorylation

Les modifications post-traductionnelles correspondent à des modifications chimiques des protéines après sa traduction (Adighibe & Pezzella, 2018). Parmi celles-ci nous pouvons citer l'ubiquitination, l'acétylation, la méthylation, la SUMOylation et la phosphorylation. Cette dernière constitue l'une des modifications post-traductionnelles les plus répandues et joue, de manière générale, un rôle majeur dans la régulation de l'activité, de la localisation et des interaction protéiques (Zhong et al., 2023).

L'analyse de la séquence protéique de JMY a permis d'identifier la présence de nombreux sites potentiels de phosphorylation pour des kinases spécifiques de motifs de type S/T-P incluant trois sites consensus pour les kinases dépendantes des cyclines dans la région N-terminale (Shikama 1999). Ceci suggère que JMY pourrait être régulée par phosphorylation en fonction du cycle cellulaire ou en réponse à des signaux de stress, avec des conséquences sur sa localisation subcellulaire et ses fonctions liées à la dynamique de l'actine et au soutien à la réponse de p53. (Zuchero et al., 2012). Cependant à ce jour, aucune étude n'a pu analyser l'impact de ces phosphorylations sur la régulation de JMY et sur ces effets biologiques et aucune kinase spécifique n'a été formellement identifiée. Néanmoins, plusieurs éléments suggèrent une régulation indirecte par des voies dépendantes de kinases. Les cascades MAPK (ERK1/2, JNK, p38) et la protéine kinase C (PKC), activées en réponse au stress oxydant, aux dommages à l'ADN ou aux signaux mitogènes, contrôlent la phosphorylation de nombreuses protéines impliquées dans la transcription et la dynamique du cytosquelette (Pearson et al., 2001 ; Cargnello and Roux, 2011). Dans ce contexte, la localisation nucléaire de JMY et son interaction avec le complexe p53/p300 apparaissent modulées

par des partenaires eux-mêmes régulés par phosphorylation (Shikama et al., 1999 ; Adighibe et al., 2018). Dès lors, bien qu'aucune preuve directe ne démontre une phosphorylation de JMY par ces kinases, ces voies pourraient moduler indirectement sa stabilité, sa localisation et ses interactions protéiques. Cette régulation reste toutefois à préciser et constitue un champ d'investigation encore ouvert.

6.3.2.3 Régulation de JMY par la voie ubiquitine Mdm2/protéasome

Les données actuelles concernant la stabilité/dégradation de JMY reposent sur des données provenant de l'équipe de La Thangue, première équipe à s'être intéressée à JMY (Shikama 1999). Ces collaborateurs ont pu établir que la stabilité de JMY est principalement régulée par la voie ubiquitine/protéasome, sous le contrôle de l'E3 ubiquitine ligase MDM2 (murine double minute 2 ; Coutts et al., 2005 ; Coutts et al., 2007). En conditions basales, MDM2 interagit directement avec JMY, induit sa polyubiquitination et sa dégradation par le protéasome 26S, selon un mécanisme dépendant de l'activité E3 ligase et indépendant de p53. Ce contrôle strict permet de maintenir de faibles niveaux de JMY, comme en témoigne son accumulation rapide lors de l'inhibition de MDM2 ou du protéasome (Coutts et al., 2007).

En réponse à un stress génotoxique, notamment lors de dommages à l'ADN, cette régulation est levée. La dissociation du complexe MDM2/JMY s'accompagne d'une diminution de sa dégradation et d'une augmentation de sa transcription, conduisant à sa stabilisation et à son accumulation (Coutts et al., 2009 ; Adighibe et al., 2018). JMY s'enrichit alors dans le noyau, où elle agit comme cofacteur transcriptionnel de p53. Ainsi, la régulation de JMY repose sur un équilibre dynamique entre dégradation basale et stabilisation en condition de stress. Dès lors, sa disponibilité fonctionnelle est directement couplée à l'état cellulaire, permettant une réponse rapide et coordonnée aux signaux de stress.

6.3.3. Régulation de la localisation subcellulaire de JMY

La localisation intracellulaire de JMY est dynamique et dépendante du contexte cellulaire, conditionnant directement l'équilibre entre ses fonctions cytoplasmiques et nucléaires. En conditions basales, JMY est majoritairement cytoplasmique, avec une fraction nucléaire limitée (Zuchero et al., 2009). Cette distribution repose sur plusieurs mécanismes : d'une part, son

interaction avec l'actine (G-actine, ou monomère d'actine) favorise sa rétention cytoplasmique ; d'autre part, des régulations post-traductionnelles impliquant MDM2 contrôlent son ubiquitination et sa dégradation, restreignant ainsi son accumulation nucléaire (Coutts et al., 2007 ; Holzinger et al., 2009 ; Zuchero et al., 2012).

Dans des conditions favorisant la motilité cellulaire, JMY est enrichie dans le cytoplasme, où elle s'accumule dans des régions d'actine dynamique telles que le front migratoire ou les replis membranaires et participe au remodelage du cytosquelette et à la migration cellulaire (Zuchero et al., 2009 ; Roadcap & Bear, 2009). Cette localisation cytoplasmique est fonctionnellement associée à ses propriétés de nucléation et d'organisation de l'actine.

À l'inverse, en réponse à un stress génotoxique ou à l'inhibition de MDM2, ce contrôle est levé et JMY s'accumule dans le noyau et s'accompagne d'une diminution de ses fonctions de nucléation de l'actine dans le cytoplasme au profit d'un renforcement de sa réponse transcriptionnelle dépendante de p53 (Coutts et al., 2009 ; Coutts et al., 2010 ; Zuchero et al., 2009 ; Campellone & Welch, 2010 ; Kramer et al., 2022), notamment *via* des mécanismes dépendants de l'actine impliquant ses domaines WH2 associés à des signaux de localisation nucléaire (Coutts et al., 2009 ; Zuchero et al., 2012 ; Coutts et al., 2009 ; Wang et al., 2010 ; Coutts et al., 2010).

Ce basculement nucléocytoplasmique repose sur un mécanisme de navette finement régulé. L'absence de liaison de la G-actine aux domaines riches en proline et aux motifs WH2 favorise l'accumulation nucléaire de JMY s'expliquant par l'exposition du signal de localisation nucléaire 2 (NLS2) situé entre les deux premiers domaines WH2. A l'inverse, lorsque JMY interagit avec les monomères d'actine et participe à sa polymérisation, le NLS2 devient inaccessible aux importines favorisant ainsi sa localisation cytoplasmique. Ce mécanisme décrit par Zuchero et al en 2012 établit un lien direct entre l'état du cytosquelette et la régulation transcriptionnelle (Figure 15 ; Holzinger et al., 2009 ; Zuchero et al., 2012).

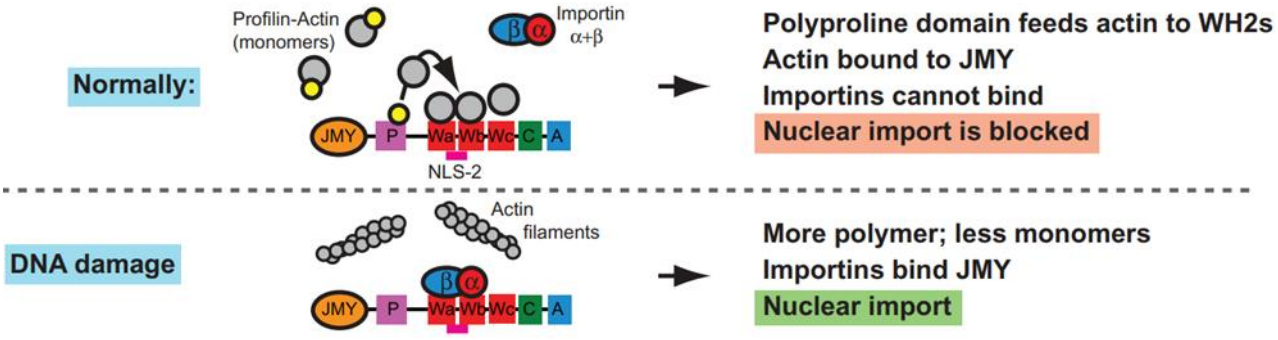


Figure 15 : Régulation du transport nucléaire de JMY par l'actine et les importines

Schéma illustrant le contrôle du trafic nucléocytoplasmique de JMY (Junction-mediating and regulatory protein) en fonction de son interaction avec l'actine. En conditions cytoplasmiques, JMY se lie aux monomères d'actine (complexes profiline-actine) via ses domaines WH2 (Wa–Wb–Wc), ce qui masque partiellement son signal de localisation nucléaire (NLS-2). La diminution des niveaux d'actine monomérique ou la libération de ces interactions permet l'exposition du NLS-2, favorisant la reconnaissance par les importines α/β et l'import nucléaire de JMY. Ce mécanisme couple ainsi la dynamique du cytosquelette d'actine à la régulation des fonctions nucléaires de JMY (d'après Zuchero et al., 2012).

Une étude plus récente a par ailleurs démontré que des signaux intracellulaires tels que les variations du calcium pouvaient contribuer à moduler ce système, en favorisant notamment la dimérisation de p53 et les interactions p53/JMY et l'actine (Hencz et al., 2022).

Ainsi, JMY agit comme une protéine navette intégrant des signaux multiples (état de polymérisation de l'actine, stress génotoxique, régulation par MDM2 ou variations calciques) pour coordonner ses fonctions cytosquelettiques et transcriptionnelles. Cette plasticité est cohérente avec des observations montrant que JMY peut transiter entre noyau et cytoplasme en réponse à différents types de stress ou de signaux intracellulaires, confirmant son rôle de module intégrateur entre dynamique de l'actine et réponse transcriptionnelle (Coutts et al., 2015 ; King et al., 2021 ; Campellone et al., 2023).

6.4 Rôles biologiques de JMY

6.4.1 Fonctions cellulaires de JMY

6.4.1.1 Régulation de la dynamique de l'actine

Dans les cellules migrantes, JMY s'accumule au niveau du front de migration et colocalise avec l'actine polymérisée, lui conférant un rôle direct dans l'organisation du cytosquelette et la formation

de protrusions membranaires (Zuchero et al., 2009). Cette localisation est cohérente avec sa fonction de nucléateur d'actine. JMY possède un domaine WCA caractéristique des protéines de type WASP, lui permettant d'activer le complexe Arp2/3, ainsi que des domaines WH2 responsables de la liaison à l'actine et d'une nucléation modulable favorisant la formation de réseaux branchés ou linéaires selon le contexte (Jiang et al., 2008 ; Zuchero et al., 2009 ; Roadcap & Bear, 2009 ; Campellone & Welch, 2010 ; Rottner et al., 2010). Dès lors, JMY participe plus largement au remodelage du cortex cellulaire, à la dynamique membranaire et au trafic intracellulaire dépendants de l'actine (Rottner et al., 2010 ; Campellone & Welch, 2010).

Sur le plan fonctionnel, JMY régule la motilité cellulaire en coordonnant la dynamique de l'actine et les interactions d'adhésion dans des cellules adhérentes de mammifères, ce qui a notamment été démontré dans des lignées épithéliales tumorales U2OS. Son inhibition entraîne une diminution marquée de la migration, tandis que sa surexpression l'augmente de manière dépendante des domaines WH2 (Coutts et al., 2009). Cet effet s'accompagne d'une régulation des cadhérines, notamment une diminution de l'E-cadhérine dans des contextes où les cellules migrent fortement (Coutts et al., 2009). Dans les cellules épithéliales MCF-7, l'extinction de JMY conduit à des colonies plus compactes, associées à un renforcement des contacts cellule/cellule et à une accumulation membranaire d'E-cadhérine, corrélée à une forte réduction de la migration. La co-déplétion de JMY et de l'E-cadhérine restaure la motilité, indiquant que l'effet de JMY dépend en grande partie du contrôle des jonctions d'adhérence. Des observations similaires ont été rapportées dans les cellules U2OS, où JMY régule le turnover de la N-cadhérine sans affecter la prolifération (Coutts et al., 2009). Ces observations sont cependant à nuancer car la déplétion de JMY dans d'autres types cellulaires n'a pas d'impact sur l'adhésion ou la migration basale. Par exemple, aucun défaut de migration n'est observé dans les fibroblastes dérivés d'embryons de souris et dans la lignée NIH3T3 déplété en JMY, bien que, dans ces cellules, JMY se localise également au niveau des plis membranaires (Firat-Karalar et al., 2011). Nous avons-nous même montré que la déplétion de JMY dans des progéniteurs neuraux humains ou dans des cellules souches de glioblastome n'avait pas d'impact sur leur migration basale (voir respectivement article Bergiers et al., en révision ; Gauthier et al., 2020 et résultats sur les CSG).

Au-delà de ses effets directs sur le cytosquelette, JMY relie dynamique de l'actine et régulation transcriptionnelle. Il module la disponibilité du G-actine et peut interférer avec la protéine MRTF-A (Myocardin-Related Transcription Factor A), un cofacteur du facteur SRF dont l'activité dépend de son association au G-actine. En condition basale, MRTF-A est retenu dans le cytoplasme ; sa libération permet sa translocation nucléaire et l'activation de gènes impliqués dans la migration. Les domaines WH2 de JMY entrent en compétition avec MRTF-A pour la liaison au G-actine, favorisant l'activation transcriptionnelle dépendante de SRF (Kluge et al., 2018). Ce mécanisme est indépendant de la polymérisation globale de l'actine, puisque l'inhibition d'Arp2/3 ou la dépolymérisation de l'actine n'altèrent pas l'effet de JMY (Kluge et al., 2018).

6.4.1.2 Réponse au stress, réparation de l'ADN et apoptose

En réponse à un stress génotoxique, JMY s'accumule dans le noyau et agit comme cofacteur transcriptionnel de p53. Cette relocalisation est essentielle à une activation efficace de p53, puisque sa déplétion réduit significativement l'expression de ses gènes cibles (Lin et al., 2014). En conditions basales, l'activité de p53 et de JMY est maintenue à un faible niveau par l'action de MDM2, qui favorise leur ubiquitination et limite ainsi la transcription dépendante de p53 (Coutts et al., 2007 ; Vousden & Lu, 2002 ; voir le chapitre 6.3.2.3).

Sur le plan mécanistique, JMY et STRAP stabilise le complexe p300/CBP et oriente la réponse vers des gènes pro-apoptotiques tels que BAX, au détriment de gènes comme p21 (Demonacos et al., 2001 ; Adighibe & Pezzella, 2018). En amont, E2F1 participe à cette dynamique en induisant l'expression de JMY et en favorisant la phosphorylation de p53 sur la sérine 46, une modification associée à l'activation de la réponse apoptotique (Hershko et al., 2005 ; voir chapitre 3.1.1.). Dans ce contexte, JMY apparaît comme un cofacteur capable d'orienter la sélection des gènes cibles de p53 en faveur d'un programme pro-apoptotique. Il convient néanmoins de noter que le lien direct entre JMY et BAX repose principalement sur des données intégratives plutôt que sur une démonstration expérimentale isolée centrée sur cet axe (Coutts et al., 2009).

Au-delà de ce rôle transcriptionnel, JMY intervient directement dans la réponse aux dommages de l'ADN. Après irradiation ou traitement génotoxique, elle est nécessaire pour activer efficacement la transcription dépendante de p53 et pour la réparation de l'ADN. L'absence de JMY entraîne une

diminution de l'expression de gènes impliqués dans la réparation, tels que XPC, XRCC5 ou TP53I3, s'accompagnant de ce fait d'une persistance des dommages mise en évidence par une accumulation prolongée de γH2AX (Rodriguez-Pastrana et al., 2023). Ce rôle repose sur sa capacité à réguler la dynamique de l'actine *via* Arp2/3 : des formes mutantes incapables de nucléer l'actine ne restaurent pas la réparation, suggérant que des réseaux d'actine nucléaires participent à l'organisation des complexes de réparation.

Lorsque les dommages sont trop importants pour être réparés, JMY est capable d'orienter la réponse cellulaire vers l'apoptose en organisant des structures d'actine F facilitant l'assemblage de l'apoptosome et l'activation des caspases, augmentant l'efficacité de la cascade apoptotique (King et al., 2021 ; King et al., 2023). Au contraire, l'absence de JMY entraîne une désorganisation de ces structures et une diminution de la réponse apoptotique. Ces observations s'inscrivent dans un cadre plus large où les protéines de la famille WASP, incluant JMY, apparaissent comme des régulateurs centraux de la réponse au stress *via* leur capacité à activer Arp2/3 et à organiser des réseaux d'actine impliqués dans l'autophagie, la réparation de l'ADN et l'apoptose (Campellone et al., 2023).

JMY agit comme un intégrateur fonctionnel reliant signalisation p53, dynamique de l'actine et organisation subcellulaire. Elle module l'équilibre entre réparation et apoptose en fonction de la sévérité des lésions génomiques, déterminant *in fine* l'issue de la réponse cellulaire (Adighibe & Pezzella, 2018 ; Rodriguez-Pastrana et al., 2023).

Dans le contexte d'autres stress cellulaires, notamment induits par les glucocorticoïdes, JMY est également augmentée et relocalisée dans le noyau, où elle prend son rôle de cofacteur de p53 en favorisant l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que BAX. Cette induction s'accompagne d'une augmentation de l'apoptose et d'une diminution de la prolifération et de la motilité cellulaires (Zuo et al., 2020).

Au total, ces données convergent vers un modèle dans lequel JMY ne se limite pas à amplifier la réponse de p53, mais en détermine l'issue fonctionnelle. Lorsque les lésions sont réparables, elle soutient une réponse transcriptionnelle favorisant la réparation. À l'inverse, en cas de dommages irréversibles, elle participe à un réseau de cofacteurs orientant la cellule vers l'apoptose. JMY constitue ainsi un régulateur central de la décision survie/mort cellulaire sous stress.

6.4.1.3 Rôle dans le trafic membranaire et vésiculaire

Toujours en lien avec la dynamique de l'actine, JMY participe également à l'organisation du trafic intracellulaire, dans des processus impliquant le remodelage membranaire. JMY appartient à la famille de protéines de type WASP, aux côtés de WHAMM, qui est impliquées dans l'organisation du système endomembranaire. WHAMM a été caractérisée comme un régulateur du transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, en coordonnant l'assemblage de l'actine *via* Arp2/3 et en facilitant la formation de structures membranaires tubulaires (Kast et al., 2015). De manière complémentaire, JMY est associée à des structures vésiculo-tubulaires dynamiques localisées à l'interface entre le réticulum endoplasmique et le réseau trans-Golgi. Dans ce compartiment, elle interagit notamment avec VAP-A, une protéine membranaire du réticulum endoplasmique impliquée dans les sites de contact entre organites et le transfert de lipides, et contribue aux processus de transport vésiculaire intracellulaire. Ceci suggère un rôle de JMY dans l'organisation des flux membranaires et la coordination du trafic entre compartiments sécrétoires. (Schlüter et al., 2014). Son expression influence par ailleurs l'intégrité de l'appareil de Golgi et le trafic des protéines sécrétées, ce qui souligne d'autant plus son rôle fonctionnel dans l'organisation du système endomembranaire (King et al., 2021). Ainsi, à travers ses fonctions dans le trafic vésiculaire, JMY apparaît comme un régulateur du remodelage membranaire dépendant de l'actine. En fournissant les forces mécaniques nécessaires à la formation de vésicules et à leur transport, elle contribue à l'intégration fonctionnelle entre cytosquelette et compartiments intracellulaires (Coutts et La Thangue, 2016).

6.4.1.4 Rôle dans l'autophagie

JMY joue également un rôle important dans l'autophagie, un processus également fortement dépendant de la dynamique de l'actine. Elle est recrutée au niveau des membranes du phagophore et des autophagosomes *via* une interaction avec LC3 dépendante d'un motif LIR, où elle induit localement la polymérisation de réseaux d'actine. Cette activité contribue à la formation, à l'expansion et à la motilité des autophagosomes, en contrôlant leur taille et leur morphologie (Coutts et La Thangue, 2015 ; Coutts et La Thangue, 2016 ; Zientara-Rytter et Subramani, 2016 ; Hu & Mullins, 2019). Dès lors, JMY ne se limite pas à une activité globale de nucléation, mais agit de manière localisée au niveau de membranes spécifiques pour organiser spatialement les structures

autophagiques. La régulation de cette fonction repose sur des interactions protéiques fines. En effet, LC3 favorise le recrutement et l'activation de JMY au niveau des membranes autophagiques, tandis que STRAP (TTC5) agit comme un régulateur négatif en inhibant sa capacité de nucléation de l'actine, notamment par compétition avec LC3 (Liu & Klionsky, 2019 ; Hu & Mullins, 2019). Cet équilibre conditionne la redistribution de JMY en contexte de stress métabolique et module son activité au sein de la voie autophagique.

6.4.2 Fonctions physiologiques de JMY

Si les fonctions cellulaires de JMY mettent en évidence son rôle dans la régulation de processus fondamentaux tels que la dynamique de l'actine et la réponse au stress, il est également essentiel d'envisager ses fonctions dans un contexte physiologique plus global.

6.4.2.1 Rôle au cours de l'embryogenèse

L'équipe de Kim a montré dans un modèle porcin, dans deux publications successives, que la protéine JMY, exprimée dès les premières étapes du développement embryonnaire est capable de se relocaliser progressivement du cytoplasme vers le noyau au cours des derniers stades du développement. Ils ont également mis en évidence que sa déplétion compromet la formation du blastocyste, en lien avec une altération de l'expression de l'actine et d'Arp2 (Wang et al., 2013 ; Lin et al., 2015), en rapport avec son rôle dans la division asymétrique (Lin et al. 2014). Une fonction identique de JMY est rapportée dans des ovocytes murins : la diminution de son expression par RNAi entraîne une désorganisation du réseau d'actine cortical, caractérisée par la perte du cap d'actine et de la polarité cellulaire, associée à une diminution coordonnée d'Arp2/3 et de WAVE2 ainsi qu'à une altération du fuseau méiotique (Sun et al., 2011). Les auteurs de cette étude en accord avec l'étude de Lin de 2014 montrent que JMY est nécessaire à l'établissement de la polarité des ovocytes. Par ailleurs, JMY serait également indispensable au développement embryonnaire précoce chez la souris, en particulier au stade préimplantatoire où elle agirait comme un facteur de transcription (Lin et al., 2019). Ces derniers résultats sont en accord avec les observations montrant qu'une absence de JMY est associée à altération du développement des blastocystes porcins (Lin 2015). Enfin, une étude publiée en 2020 s'appuyant sur un modèle transgénique murin où JMY est spécifiquement inactivé dans les cellules germinales ou les cellules de Sertoli, montre que JMY est

nécessaire à la fonction de la barrière hémato-testiculaire. Son absence provoque une altération de l'intégrité des jonctions des cellules de Sertoli et une perturbation du trafic des vésicules endocytiques. Ces fonctions étant essentielles au maintien de la fertilité des spermatozoïdes, la perte de JMY induit une faible fertilité masculine chez les souris. Ces données établissent que JMY participe au contrôle de la spermatogenèse en régulant l'organisation des filaments d'actine et le trafic vésiculaire endocytaire dans les cellules de Sertoli (Liu et al., 2020).

L'ensemble de ces résultats démontrent donc que JMY apparaît comme un nœud de régulation reliant dynamique de l'actine, polarité cellulaire et programmes de différenciation. Ces fonctions, essentielles à la coordination des mouvements cellulaires et à l'organisation spatiale des tissus, suggèrent son implication dans des processus morphogénétiques complexes, notamment lors des étapes précoces du développement.

6.4.2.2 Rôle dans le système nerveux en développement

Comme évoqué dans le chapitre 1, le développement du cortex cérébral repose sur une coordination fine entre la prolifération des progéniteurs neuraux, la migration cellulaire et la différenciation en neurones, oligodendrocytes et astrocytes. En raison de ses rôles dans l'organisation du cytosquelette d'actine et de la morphogenèse (voir chapitres précédents), des équipes ont cherché à savoir si JMY ne pouvait pas être impliquée dans différents processus mis en place au sein de divers types cellulaires du système nerveux central.

JMY est exprimée dans le cerveau humain en développement (Allen Brain Atlas *Developing Human Tissues Expression*) ainsi que chez la souris notamment dans des zones de neurogenèse comme les zones ventriculaires et sous-ventriculaire (Chen et al., 2026). A moindre niveau, JMY est également détectée dans le cerveau adulte (Shikama, 1999 ; *Human Protein Atlas*). Au niveau subcellulaire, JMY est majoritairement localisée dans le cytoplasme (Firat-Karalar et al., 2011). Plusieurs études menées sur des lignées cellulaires ou des cultures primaires de neurones et d'oligodendrocytes (souris ou rat) suggèrent que JMY jouerait de multiples rôles au cours du développement cérébral. Ainsi, la déplétion de JMY dans des cellules Neuro2a entraîne une augmentation du nombre de neurites, suggérant un rôle inhibiteur de JMY dans les phases précoces d'initiation des prolongements, en relation avec son activité de nucléation de l'actine (Firat-Karalar et al., 2011).

Azevedo et al. en 2018 ont par ailleurs montré que JMY favorisait la différenciation oligodendrocytaire et la myélinisation toujours en modulant la dynamique du cytosquelette d'actine (Azevedo 2018). Enfin, de la même manière, JMY stimule la formation de l'arborisation dendritique, un processus dépendant de l'interaction avec le complexe Arp2/3 et des domaines WH2 de JMY (Kühne, 2025). Les auteurs montrent également que le complexe Ca^{2+}/calmoduline régule le chargement en G-actine sur le premier domaine WH2 de JMY (Kühne, 2025).

Plus récemment, des expériences d'électroporation *in utero* dans des cerveaux embryonnaires murins ont montré que l'inhibition de JMY entraine un retard de la migration radiale des neurones corticaux, une perturbation de la sortie du cycle cellulaire, une altération de la différenciation neuronale, une réduction de la complexité dendritique et une désorganisation laminaire (Chen 2026). De plus, la génération de souris déficientes pour JMY spécifiquement dans les progéniteurs neuraux exprimant la nestine révèle, *via* des tests comportementaux, des déficits d'apprentissage spatial et de mémoire chez ces souris déficientes pour JMY. Une analyse protéomique suggère enfin que l'inactivation de JMY dans le cerveau de souris affecte des voies liées au cycle cellulaire (Chen 2026).

Enfin, une étude s'intéressant aux anomalies du tube neural (ATN), des malformations congénitales fréquentes et graves du système nerveux central, a montré que la perte de la protéine PCSK9 (un marqueur moléculaire pour le diagnostic prénatal de cette pathologie) entraîne des défauts de fermeture du tube neural dans des modèles d'organoïdes neuraux, associés à une perturbation du réseau de microfilaments. Une analyse transcriptomique indique que cet effet implique JMY, dont l'expression est régulée par l'axe LIN28A/HES5. Ainsi, la perte de PCSK9 perturbe le réseau de microfilaments cellulaires via /JMY, entraînant des ATN (Li, 2025).

6.4.2.3 Potentiel biomarqueur diagnostique et thérapeutique

Halász et al. montrent que la surexpression *ex vivo* de JMY dans des cellules squameuses ectocervicales induit des remaniements morphologiques marqués, qui sont associés à une réorganisation du cytosquelette et à la formation de protrusions membranaires, en particulier dans les cellules les moins différenciées. Ils suggèrent que JMY pourrait être considéré comme un potentiel biomarqueur diagnostique et thérapeutique pour le cancer et l'inflammation chronique

(Halász et al., 2023). Des études complémentaires seront cependant nécessaires pour confirmer leur hypothèse qui ne s'appuie que sur des données expérimentales.

6.5 Implication de JMY en physiopathologie

Compte tenu de ses multiples fonctions cellulaires et physiologique, JMY est susceptible d'être impliquée dans ou contribuer à divers processus physiopathologiques. Très peu de données sont disponibles à ce jour établissant des liens directs entre JMY et des pathologies identifiées mais sa dérégulation a pu être associée à certaines maladies génétiques ainsi qu'au développement et à la progression tumorale

6.5.1 Maladies génétiques associées à JMY

6.5.1.1 Maladies génétiques

A ce jour, peu de maladies génétiques ont été associées à des mutations du gène de JMY. Chez le porcelet, JMY a été identifié comme gène candidat associé au syndrome de « splay leg », l'une des anomalies congénitales la plus fréquemment observées chez cette espèce. Cette pathologie se caractérise par à une hypoplasie myofibrillaire entrainant un affaissement du porcelet nouveau-né, touchant principalement les pattes arrières (Hao et al., 2017).

Une autre étude portant sur une malformation congénitale chez le chat, appelée hémimélie radiale, a permis d'identifier, à partir d'analyses cliniques et génétiques, plusieurs variants dont cinq localisés dans le gène de JMY (incluant une mutation faux-sens et une délétion in frame). Ces variants suggèrent que JMY pourrait être impliqué dans cette pathologie congénitale chez le chat. Etant donné que cette maladie est également décrite chez l'homme, ces résultats pourraient indiquer un rôle conservé de JMY dans ce type d'anomalies du développement (Bilgen et al., 2023).

Enfin chez des patients d'origine d'Europe occidentale, des données génétiques suggèrent une association entre JMY et une prédisposition à la spondylarthrite ankylosante, une maladie auto-immune (WTCCC and TAST, 2007). Des études portant sur les polymorphismes de JMY ont ainsi mis

en évidence une association entre ces polymorphismes et la sévérité de la maladie chez les patients chinois de l'ethnie Han (Chai et al., 2013a ; Chai et al., 2013b).

6.5.1.2 Autres pathologies

L'ostéonécrose non traumatique de la tête fémorale (ONTF) est une affection courante en orthopédie humaine qui implique des dommages du réseau vasculaire endothélial, induite par les glucocorticoïdes. Zuo et al. ont établi que ces glucocorticoïdes induisent l'apoptose des cellules endothéliales en provoquant des dommages à l'ADN conduisant à une augmentation nucléaire de JMY qui favorise alors la transcription de Bax déclenchant alors l'apoptose des cellules. D'autre part, dans le modèle cellulaire utilisée dans cette étude (cellules endothéliales HUVEC), JMY est également capable de réguler la motilité de ces cellules par le biais de la régulation des niveaux de VE-cadhérine (Zuo et al., 2020).

6.5.2 Cancer

6.5.2.1 Altérations génomiques associées

Plusieurs altérations impliquant JMY ont été décrites dans des contextes tumoraux. Par exemple, lors de la transformation d'un lymphome folliculaire en leucémie/lymphome lymphoblastique B, une mutation faux-sens a été identifiée dans le gène de JMY suggérant qu'une altération fonctionnelle pourrait exister notamment dans la réponse aux dommages à l'ADN (Belman et al., 2020). Une amplification chromosomique en 5q14.1, localisée à proximité du gène JMY, a également été rapportée dans des tumeurs glioneuronales pédiatriques (Giunti et al., 2016). Une association entre certains haplotypes de JMY et la délétion du bras long du chromosome 16 (16q), fréquente dans les cancers du sein, a également été décrite (Nordgard et al., 2008). Enfin, JMY a été identifiée comme un facteur transcriptionnel potentiellement impliqué dans la régulation de NETO2, dans le carcinome rénal à cellules claires (Snezhkina et al., 2018).

6.5.2.2 Implication dans différents cancers

Des variations d'expression ont été rapportées dans plusieurs types de cancers, incluant les cancers du sein, colorectaux ainsi que les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Adighibe et al., 2014) suggérant une implication large mais dépendante du contexte cellulaire de cette protéine dans les processus tumoraux.

Cette diversité fonctionnelle apparaît particulièrement marquée dans le cancer du sein triple négatif, où l'augmentation de JMY en réponse à un stress électromagnétique s'accompagne d'un arrêt de la prolifération, d'anomalies mitotiques, d'une apoptose et d'un remodelage du cytosquelette, en faveur d'un rôle pro-apoptotique (Purnell, 2019). Dès lors, JMY ne peut être considérée uniquement comme un facteur suppresseur, puisque d'autres approches, notamment transcriptomiques, l'associent à des phénotypes plus agressifs. Elle s'intègre ainsi à une signature prédictive de rechute dans la leucémie myéloïde aiguë à caryotype normal (CN-AML) (Walker, 2021), et participe dans le contexte de l'infection par HTLV-1, à des réseaux transcriptionnels impliqués dans la progression vers la leucémie/lymphome T de l'adulte (ATLL) (Zarei Ghobadi et al., 2022).

Dans les gliomes, cette ambivalence fonctionnelle s'inscrit dans un registre encore différent, davantage lié à la plasticité invasive. En particulier dans les CSG, JMY est mobilisée en réponse à des contraintes du microenvironnement tumoral, telles que l'hypoxie ou l'irradiation, où elle s'intègre à l'axe HIF-1α/JMY favorisant la motilité cellulaire et contribuant ainsi à l'invasion tumorale (Gauthier et al., 2020).

6.5.3 Perspectives thérapeutiques

Ces propriétés positionnent JMY comme une cible pharmacologique modulable. Son intérêt réside dans ses interactions protéine/protéine et dans le contrôle de sa localisation subcellulaire (Adighibe & Pezzella, 2018 ; Wrighton, 2009 ; Kramer et al., 2022). Dans le noyau, la stabilisation de ses interactions avec p53 peut amplifier l'apoptose, tandis que dans le cytoplasme, ses fonctions de nucléation de l'actine constituent des cibles pour limiter migration et invasion. Sa capacité à nucléer l'actine indépendamment ou non d'Arp2/3 suggère que des approches ciblant ses domaines WH2 ou son trafic nucléocytoplasmique sont plus pertinentes que des inhibiteurs classiques (Wrighton, 2009 ; Kramer et al., 2022), ces derniers reposant principalement sur l'inhibition globale de la polymérisation de l'actine (latrunculine, cytochalasine) ou du complexe Arp2/3 (CK-666), sans permettre de bloquer spécifiquement les fonctions propres de JMY. Dès lors, la modulation de son trafic pourrait être un levier pour réorienter ses fonctions vers des programmes apoptotiques.

6.6 Conclusion

JMY apparaît ainsi comme une protéine multifonctionnelle centrale, située à l'interface entre la réponse aux dommages de l'ADN, la transcription dépendante de p53 et la dynamique du cytosquelette d'actine. Par sa capacité à agir à la fois comme nucléateur d'actine dans le cytoplasme et comme cofacteur transcriptionnel de p53 dans le noyau, elle assure une coordination directe entre motilité cellulaire et réponse au stress. Dès lors, JMY se définit comme un intégrateur de signaux permettant d'ajuster finement des processus fondamentaux tels que l'apoptose, la migration ou l'adaptation cellulaire. Cette position à l'interface entre transcription et dynamique de l'actine en fait une protéine clé dont la fonction dépend étroitement du contexte cellulaire, du statut de p53 et des contraintes environnementales.

OBJECTIFS DE THESE

L'irradiation cérébrale ne se limite pas à une action cytotoxique, mais induit également des réponses adaptatives capables de reprogrammer le comportement cellulaire. Parmi celles-ci, la modulation de la migration et de l'invasion constitue un enjeu central, impliqué à la fois dans les altérations du cerveau en développement et dans la progression infiltrante des cellules de glioblastome. Dans ce contexte, cette thèse visait à identifier les mécanismes par lesquels une irradiation serait capable de modifier la dynamique de migration cellulaire, aussi bien dans les progéniteurs neuraux que dans les cellules souches de glioblastome.

Le premier objectif de ce travail a été de déterminer si une irradiation modérée pouvait modifier les propriétés migratoires et invasives des progéniteurs neuraux, et d'en identifier les mécanismes moléculaires. Cette approche visait à comprendre comment l'exposition aux rayonnements ionisants pouvait perturber la dynamique de ces cellules, avec des implications pour le développement cérébral, l'émergence de troubles neurodéveloppementaux et plus largement pour une compréhension des mécanismes cellulaires susceptibles d'être détournés en contexte d'irradiation. Dans ce cadre, nous avons analysé les effets d'une irradiation sublétale de 0.5 Gy sur la migration et l'invasion de progéniteurs neuraux humains et murins, en nous focalisant sur l'axe ROS/HIF1α/JMY, voie moléculaire qui avait, en partie été étudié au laboratoire dans des cellules souches de glioblastome.

Le second objectif de cette thèse a été d'étendre cette problématique au glioblastome, en analysant l'effet de l'irradiation sur la plasticité invasive des cellules souches tumorale dans des modèles d'organoïdes cérébraux. L'enjeu était de déterminer si les cellules survivantes mettaient en place un programme adaptatif favorisant leur dissémination dans le tissu cérébral après irradiation. Pour cela, j'ai développé plusieurs modèles tridimensionnels de coculture associant cellules souches de glioblastome et organoïdes cérébraux humains dérivés d'iPSC, afin d'évaluer l'impact de l'irradiation sur l'invasion et sa dynamique, le remodelage de l'actine et la formation des microtubes tumoraux.

Cette thèse repose ainsi sur une double approche complémentaire visant à analyser les effets de l'irradiation dans des contextes physiologique et tumoral. Elle cherche, d'une part, à comprendre comment l'irradiation modifie la dynamique de migration des progéniteurs neuraux, et d'autre part, comment ce stress radiatif favorise la plasticité invasive des cellules souches de glioblastome dans un environnement cérébral humain tridimensionnel. L'objectif étant d'identifier des mécanismes communs et spécifiques de réponse à l'irradiation, avec un intérêt particulier pour la protéine JMY, régulateur à l'interface entre réponse au stress génotoxique et dynamique du cytosquelette d'actine.

RESULTATS ET DISCUSSION

ARTICLE

A ROS/HIF-1A/JMY SIGNALING AXIS DRIVES RADIATION-INDUCED MIGRATION AND INVASION OF NEURAL PROGENITOR CELLS

Article en révision dans *Cell Communication and Signaling*

I. INTRODUCTION

Au cours du développement cérébral, la prolifération, la différenciation et la migration des progéniteurs neuraux (NPC, neural progenitor cells) sont des processus finement régulés, indispensables à l'établissement de l'architecture du cortex et à la formation de réseaux neuronaux fonctionnels (Lois et Alvarez-Buylla, 1994 ; Kriegstein et Alvarez-Buylla, 2009 ; Ming et Song, 2011 ; Rakic, 1974 ; Noctor et al., 2001 ; Ayala et al., 2007 ; Tan et Shi, 2013). Cette dynamique persiste à l'âge adulte au sein de niches neurogéniques telles que la zone sous-ventriculaire (SVZ) et la zone sous-granulaire (SGZ), où les NPC contribuent à la plasticité cérébrale (Ming et Song, 2011 ; Rakic, 1974 ; Noctor et al., 2001 ; Ayala et al., 2007 ; Tan et Shi, 2013 ; Cameron et McKay, 2001). La précision spatio-temporelle de ces processus est essentielle, puisque des altérations de la migration neuronale sont à l'origine de nombreuses pathologies neurodéveloppementales, de malformations corticales associées à des déficits cognitifs et à l'épilepsie (Ayala et al., 2007 ; Barkovich, 2012).

L'impact des rayonnements ionisants sur les NPC a principalement été étudié sous l'angle de leurs effets cytotoxiques, notamment l'induction d'apoptose, la réduction de la prolifération et l'altération des processus de différenciation (Verreet et al., 2016 ; Barazzuol et al., 2019 ; Licursi et al., 2020 ; Nowak et al., 2006 ; Etienne et al., 2012 ; Acharya et al., 2010 ; Kanzawa et al., 2006 ; Bery et al., 2023 ; Wei et al., 2012 ; Chen et al., 2015). En revanche, l'impact de l'irradiation sur la migration des NPC reste peu étudié, alors même que leur positionnement est déterminant pour le développement cérébral. Cette question est d'autant plus pertinente que l'irradiation est capable d'induire des réponses pro-migratoires et invasives dans de nombreux types cellulaires (Cheng et al., 2006 ; Gu et al., 2015), notamment dans les CSG *via* l'activation de l'axe HIF1α/JMY (Gauthier et al., 2020).

Les CSG partagent plusieurs propriétés communes et fondamentales avec les NPC, incluant notamment l'auto-renouvellement, la multipotence et la capacité d'activer des programmes migratoires leur permettant d'infiltrer le parenchyme cérébral (Loras et al., 2023 ; Bakhshinyan et al., 2020 ; Zarco et al., 2019 ; Lathia et al., 2015 ; Venkataramani et al., 2022). Des précédents travaux réalisés au laboratoire ont montré qu'une irradiation sublétale unique était capable de stimuler la

migration des CSG (Gauthier et al., 2020) par l'activation de la voie HIF-1α/JMY, dans laquelle HIF-1α régule l'expression de JMY, un régulateur de la réponse au stress génotoxique et de la dynamique du cytosquelette d''actine (Shikama et al., 1999 ; Zuchero et al., 2009 ; Coutts 2005 and 2010 ; King et al., 2021). Compte tenu des similitudes transcriptionnelles et moléculaires entre les CSG et les NPC (Lathia et al., 2015 ; Bakhshinyan et al., 2020), de la capacité des CSG à détourner les programmes de migration cellulaire des NPC et du rôle de JMY dans la morphogenèse neurale en général (Firat-Karalar et al., 2011 ; Azevedo et al., 2018 ; Kuhne et al., 2025), nous avons émis l'hypothèse que l'irradiation pourrait également stimuler la migration des NPC *via* l'axe HIF-1α/JMY.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été de déterminer dans un premier temps, si une irradiation sublétale était capable de modifier la migration et/ou l'invasion des NPC, et dans un second temps d'identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents à ce phénomène. Pour cela, nous avons utilisé des modèles complémentaires de NPC humains et murins, permettant d'analyser leur comportement migratoire dans différents contextes expérimentaux, incluant des approches *in vitro* et *in vivo*.

Ce travail nous a permis de démontrer qu'une irradiation entre 0,5 et 1,5 Gy est suffisante pour induire une augmentation significative de la migration et de l'invasion des NPC, indépendamment de l'espèce ou du stade de développement. Cette réponse repose sur une augmentation précoce des ROS, conduisant à la stabilisation nucléaire de HIF-1α et à l'induction de l'expression de JMY. C'est par sa capacité intrinsèque à nucléer les monomères d'actine en filaments d'actine, que JMY induit alors un remodelage du cytosquelette d'actine favorisant la dynamique migratoire des NPC. L'ensemble de ces résultats identifie l'axe ROS/HIF-1α/JMY comme un régulateur central de la motilité des NPC en réponse à l'irradiation.

II. PUBLICATION

A ROS/HIF-1α/JMY signaling axis drives radiation-induced migration and invasion of neural progenitor cells

Oriane Bergiers[1,2], Hayet Bensalah-Pigeon[1,2], Oscar Gitton-Quent[1,2], Karim Ben M'Barek[1,2], Mahasen Saati[1,2], Christine Granotier-Beckers[1,2], Olivier Etienne[1,2], Denis S. Biard[3], Guillaume Piton[1,2], Didier Busso[1,2], Virginie Rouiller-Fabre[1,2], José R. Pineda[1,2], François D. Boussin[1,2*], Laurent R. Gauthier[1,2*]

[1] Université Paris Cité, Inserm, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, iRCM, F-92265, Fontenay-aux-Roses, France.

[2] Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, iRCM, F-92265, Fontenay-aux-Roses, France.

[3] Université Paris-Saclay, SEPIA, IBFJ, CEA, Fontenay-aux-Roses, France.

* Corresponding authors:

e-mail: laurent-r.gauthier@cea.fr or francois.boussin@cea.fr

Running title: Irradiation enhances migration of NPCs

Key words: JMY, Neural progenitor cells, migration, invasion, irradiation, HIF1α.

ABSTRACT

Background: Neural progenitor cell (NPC) migration is essential for proper cortical development, and its disruption contributes to severe brain malformations such as lissencephaly, polymicrogyria, and microcephaly. Although abnormal neuronal migration has been reported in irradiated embryos, the molecular mechanisms by which ionizing radiation affects NPC motility remain poorly understood.

Methods: Fetal human and mouse NPCs were exposed to low doses of ionizing radiation (0.5– 3Gy). Migratory and invasive properties were assessed both in vitro and in vivo. Reactive oxygen species (ROS) production was monitored shortly after irradiation, and downstream signaling pathways were investigated through analysis of HIF-1α nuclear accumulation and expression of Junction-mediating and regulatory protein (JMY). Functional involvement of HIF-1α and JMY was tested using pharmacological or molecular inhibition approaches.

Results: Ionizing radiation rapidly enhanced the migratory and invasive capacity of fetal human and mouse NPCs in vitro and in vivo. This response was preceded by an early increase in endogenous ROS, which initiated the migratory phenotype. Mechanistically, radiation-induced ROS promoted nuclear accumulation of HIF-1α, leading to upregulation of JMY, an actin nucleation–promoting factor that drives cytoskeletal remodeling and cell motility. Inhibition of either HIF-1α or JMY abolished the radiation-induced increase in NPC migration and invasion, identifying a conserved ROS/HIF-1α/JMY signaling axis as a key mediator of this effect.

Conclusions: These findings reveal that low-dose ionizing radiation stimulates NPC migration and invasion through activation of a ROS/HIF-1α/JMY pathway. Given the critical requirement for tightly regulated NPC migration during brain morphogenesis, aberrant activation of this signaling axis may contribute to radiation-induced neurodevelopmental disorders.

Key words: JMY, Neural progenitor cells, migration, invasion, irradiation, HIF-1α.

1.Background

Proliferation, migration, and differentiation of neural progenitor cells (NPCs) are tightly regulated during brain development [1–3]. NPCs expand within the ventricular zone and give rise to neuronal precursors that progressively differentiate and migrate toward the nascent cortical plate, thereby establishing the laminar architecture of the cerebral cortex required for the formation of functional neuronal networks [2,4–8]. In the adult brain, neurogenic NPCs persist in restricted niches, primarily the subventricular zone (SVZ) and the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus, where they are thought contribute to ongoing neurogenesis and brain plasticity [3,9].

Defects in neuronal and/or NPC migration underlie numerous neurodevelopmental disorders, including lissencephaly, microcephaly, and others malformations of cortical development associated with intellectual disability and epilepsy, highlighting the need for precise spatiotemporal control of these programs [6,7,10]. In physiological conditions, adult NPCs are generally quiescent and display limited migration. However, under pathological conditions such as injury, ischemia or neurodegenerative diseases, endogenous NPCs can be recruited toward damaged tissue by inflammatory and chemokine cues, as documented in models of stroke and neuroinflammation [11–16]. Although this response is often considered reparative, it may also result in aberrant positioning and impaired maturation, potentially exacerbating neural circuit dysfunction [15–18].

Clinical observations in humans and experimental data from rodent models indicate that exposure to ionizing radiation during prenatal or early postnatal periods can produce lasting neurodevelopmental sequelae, including microcephaly, cognitive deficits, altered synaptic plasticity, and behavioral impairments [19–29]. Mechanistically, these outcomes have largely been attributed to radiation-induced NPC apoptosis [23,30–33], impaired proliferation, and disrupted asymmetric division and differentiation [28,29,34–36]. However, the impact of radiation on NPC migration remains comparatively underexplored. This gap is particularly relevant given the sensitivity of developing neural circuits to perturbations in cell positioning.

Glioblastoma stem-like cells (GSCs) share core properties with NPCs, including self-renewal, multipotency, and responsiveness to environmental cues [37–39], and use similar migratory

machinery to infiltrate brain parenchyma, driving progression and resistance [40,41]. Previous work showed that a single irradiation dose (0.5– 1.5 Gy) significantly enhances GSC migration and invasion *via* a HIF1α/JMY pathway, in which radiation-stabilized HIF1α upregulates JMY, an actin nucleation-promoting factor [42]. Given the molecular parallels between GSCs and NPCs, the ability of glioma cells to hijack neuronal/NPC migration programs, and the roles of JMY in neural morphogenesis [43–46], these findings raise the possibility that ionizing radiation could similarly promote NPC migration by inducing JMY expression in a HIF1α-dependent manner.

Here, we report that a single dose of irradiation ranging from 0.5 Gy to 2 Gy increases the migration and invasion capacity of murine and foetal human NPCs. Mechanistically, radiation-induced reactive oxygen species (ROS) drive nuclear accumulation of HIF1α, leading to increased JMY expression and actin nucleation-promoting activity, thereby enhancing NPC motility. These results implicate the ROS/HIF1α/JMY axis as a potential contributor to radiation-associated neurodevelopmental alterations.

2.Material and Methods

2.1 Isolation and culture of human NPCs (hNPCs)

Primary human fetal neural progenitor cells (hNPCs) were isolated from telencephalic tissue obtained from different human foetuses following legal abortion at the Obstetrics and Gynecology Department of Antoine Béclère Hospital in Clamart, France. Fetal age comprise between 6 to 12 weeks (mean 8.6 weeks) was determined by measuring limb and foot length [109]. Each derived hNPC line is identified by a unique CHxxx code. The tissue samples were collected from brain tissues of independent embryos, and the cells were processed as described in the following section. For each sample, written informed consent was obtained from the donors, and all procedures were conducted in compliance with ethical guidelines approved by the local Medical Ethics Committee and the French Biomedecine Agency (reference number PFS12-002).

The embryonic brain tissue was dissected under a binocular microscope, and immediately dissociated into a single-cell suspension using a combination of collagenase (100 U, Gibco) and DNase (100 U, Sigma). After three washes, the dissociated cells were cultured at a density of 2×10^6 cells per T75 flask. The cells were cultured at 37°C in an atmosphere containing 5% CO_2, in serum-free Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/F12 supplemented with, L-glutamine (2 mM, Sigma), B27 without vitamin A (Invitrogen #12587010), penicillin (200 U/ml, Sigma), streptomycin (200 µg/ml, Sigma), heparin (5 µg/ml; STEMCELL Technologies #07980), human recombinant EGF (100 ng/ml, Merck Millipore) and FGF-2 (20 ng/ml, Merck Millipore).

At weekly intervals, neurospheres were mechanically dissociated after a 10-minute incubation at room temperature with Accutase cell dissociation reagent (Sigma) and subsequently reseeded at a density of 0.5×10^6 cells per T75 flask

2.2 Adherent cultures of NPCs

Individual NPCs were obtained from neurospheres following mechanical dissociation after 10 minutes of incubation at room temperature with Accutase cell dissociation reagent (Sigma). Weekly,

these individuals were seeded onto laminin-coated (5 µg/ml, Sigma) T25 flasks at a density of 0.25 × 10^6 cells per flask to enable continuous expansion in monolayer culture. The culture medium composition remained consistent with that utilized for neurosphere culture as previously outlined.

2.3 Animals

C57Bl/6J mice, EGFP mice (C57Bl/6-TgN[beta-act-EGFP], [110], 504/596 Fucci mice (B6.Cg-Tg[Fucci]504Bsi Tg[Fucci]596Bsi) [65], HIF1α$^{fl/fl}$ mice (B6.129-HIF1αtm3Rsjo/J strain from The Jackson Laboratory) and GLAST-CreERT2/R26R-YFP mice [111] were bred in our animal facilities. These mice were housed under standard conditions with *ad libitum* access to food and water in a controlled environment with a constant temperature (19-22°C) and humidity (40-50%) under a 12:12-h light/dark cycle. HIF1α floxed mice (B6.129-Hif1atm3Rsjo/J) harbouring loxP sites flanking exon 2 of HIF1α were crossed with GLAST-CreERT2/R26R-YFP transgenic mice [111] to generate GLAST-CreERT2/R26R-YFP/HIF1α$^{fl/fl}$ (HIF1α floxed) mice. The genotyping methods used for HIF1α floxed mice have been previously described [112]. Embryonic induction of Cre activity was achieved by oral gavage of 3 mg of tamoxifen (Sigma, T5648) to pregnant mothers (at embryonic day E12.5). Deletion of HIF1α in YFP-sorted NPCs isolated from the subventricular zone (SVZ) was confirmed using PCR (Supp Fig 6D).

All animal procedures were carried out in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals as defined by the European Communities Council Directive (2010/63/EU). Ethical approval for all procedures was obtained from our Comité d'Ethique en Expérimentation animale (CEtEA-CEA DRF) and validated by the ethics committee of the French Ministry of Agriculture (Agreement B9203202) under authorizations #A12-029 and APAFIS#13982-2018030811352164v2 (A17-063).

2.4 Isolation and maintenance of murine embryonic and adult NPCs

Murine embryonic NPCs (mNPCs) were extracted from C57Bl/6J, 504/596 Fucci or HIF1α floxed mouse embryos at 14.5 days of gestation. The forebrain meninges were meticulously excised in PBS containing 0.6 g/L glucose, and the dorsal telencephalic cortices were dissected under a binocular

microscope. Subsequently, the dissected tissues were subjected to enzymatic digestion using collagenase I (100 U/mL; Invitrogen) and DNase I (100 U/mL; Sigma) in PBS for 20 minutes at 37°C, followed by mechanical dissociation into single cells. The isolated mNPCs were then cultured in T-25 flasks at a density of 0.3×10^6 cells/5 mL in DMEM-F12 medium (Gibco) with 2% B27 (Gibco 10889-038), N2 supplement (Gibco 17502048), antibiotics (penicillin, 100 U/mL, and streptomycin, 100 µg/mL; Sigma), and human recombinant epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) (Sigma), both at a final concentration of 20 ng/mL. Following a 7-day incubation period, the neurospheres were mechanically dissociated using Accutase cell dissociation reagent (Sigma) after a 10-minute incubation at room temperature and subsequently reseeded at a density of 0.1×10^6 cells per T-25 flask.

Adult mouse NPCs (aNPCs) were obtained from the brains of C57Bl/6J adult mice aged 2 months as previously described [113]. Briefly, the SVZ from dissected adult brains was subjected to enzymatic digestion using papain (1 mg/mL, Worthington) supplemented with 0.01 mg/mL DNase I (Sigma) for 10 minutes at 37°C. Following digestion, the tissue was mechanically dissociated into a single-cell suspension using a P1000 micropipette in an ovomucoid solution (0.7 mg/mL, Sigma). The resulting SVZ cell suspension was cultured at 37°C in 5% CO_2 in NeuroCult NSC basal medium (STEMCELL Technologies) supplemented with antibiotics (penicillin, 100 U/mL, and streptomycin, 100 µg/mL; Sigma), proliferation supplement reagent (STEMCELL Technologies), heparin at 2 µg/mL (STEMCELL Technologies, #07980), epidermal growth factor (EGF) at 20 ng/mL, and fibroblast growth factor (FGF) at 10 ng/mL. After 7 days, the neurospheres were collected through centrifugation and treated with Accutase cell dissociation reagent (Sigma) for 5 minutes before undergoing mechanical dissociation. Subsequently, the dissociated cells were reseeded at a density of 0.1×10^6 cells per T25 flask**.**

2.5 Treatment and irradiation

Neurospheres or individual NPCs were subjected to γ-irradiation at specified doses utilizing a ^{137}Cs irradiator (IBL637, CIS BIO International or GSR-D1, Gamma-Service Medical, GmbH). When specified, N-acetyl-L-cysteine (NAC, Sigma, A9165) was added to the medium at a concentration of 500 µM 1 h prior to irradiation, while deferoxamine (DFO, Interchim) or YC1 (Cayman Chemical) was added 2 h before irradiation.

2.6 NPC random migration assay

At least 8 h post-irradiation, the neurospheres were incubated at room temperature with Accutase cell dissociation reagent (Sigma) for 10 minutes before undergoing mechanical dissociation. Subsequently, individual NPCs were seeded onto 24-well plates at a density of 25-35,000 cells per well. Prior to seeding, the plates were coated with Matrigel (BD Bioscience) or laminin (0.5 µg/cm^2; Sigma L2020 for murine NPCs or BioLamina LN521 for human NPCs).

2.7 Neurosphere spreading assay

Twenty-four hours post-irradiation, neurospheres were chosen based on their diameter falling within the range of 100-150 µm under a microscope and subsequently transferred onto glass coverslips previously coated with laminin (0.5 µg/cm^2; Sigma L2020) or Matrigel (BD Bioscience [114]. Each neurosphere was placed into an individual well of a 24-well plate. The average diameter of the spread of each neurosphere was measured at 0 and 4 h after placement (refer to Figure 1G and Supp Fig 4D).

2.8 Migration assay on brain slices

Male C57Bl/6 mice aged 2 months were euthanized by decapitation, and their brains were immediately submerged in ice-cold PBS containing 3% glucose. The brains were then sectioned into 300 µm coronal slices with a vibratome (VT1200S, Leica) and transferred onto 30 mm Millicell-CM inserts (pore size rating, 0.4 µm; Millipore) in six-well culture plates. Each well contained 1.2 mL of complete slice culture medium comprising 50% MEM (Gibco), 25% heat-inactivated horse serum (PAA), and 25% HBSS (Gibco) supplemented with 1 mM glutamine, 6.5 g of glucose, and 25 mM sodium HEPES, adjusted to pH 7.2. The brain slices were then incubated for 24 h at 37°C in a humidified atmosphere with 95% air and 5% CO_2.

Twenty-four hours post-irradiation, 10 µL of mouse GFP-labelled neurospheres with diameters ranging between 100 and 200 µm were directly deposited onto the brain slices. Fluorescence images were captured using a stereoscopic fluorescence microscope (SteREO Lumar. V12, Zeiss) at 30X magnification. Images were acquired at 0 and 4 h following neurosphere placement and analysed using MetaMorph software to determine the diameter of each neurosphere (Figure 1H).

2.9 Generation of HIF1α- and JMY-deficient NPCs

Following neurosphere dissociation with Accutase cell dissociation reagent (Sigma) for 10 minutes, NPCs were electroporated using the Neon Transfection System (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Electroporation was conducted at 1300 V for 10 ms with 3 pulses using pools of 4 target-specific small interfering RNAs (siRNAs) targeting HIF1α (ON-TARGETplus SMART pool human HIF1α, L-004018-00, Dharmacon) or pools of 3 target-specific siRNAs targeting JMY (siJMY, SC35724, Santa Cruz) as previously described [42]. Negative controls (siCt, Santa Cruz SC37007 or ON-TARGETplus nontargeting pool; D-001810-10-20) were simultaneously utilized to assess the RNAi off-target effects and validate the specificity of gene-specific siRNA-mediated RNAi. Following transfection, the cells were plated onto laminin-coated 24-well plates. The knockdown efficiency was evaluated 24–48 h post-transfection via RT–qPCR.

Generation of stable HIF1α- and JMY-deficient NPCs was performed using lentiviral vectors. The lentiviral vector expressing small hairpin directed against JMY was generated by inserting different hybrids of primers into pTRIP-MND-GFP-H1-SanD1 [115] under the control of the H1 promoter, utilizing complementary single-strand annealing techniques [116]. The shHIF1α lentivirus was kindly provided by Pflumio's laboratory (INSERM U1274, CEA/DRF-JACOB-IRCM, UMR E0008). One day after being plated on a laminin substrate (5 µg/mL; Sigma), NPCs were transduced with a lentiviral vector at a multiplicity of infection (MOI) of 3 (MOI is defined as the number of lentiviral particles able to transduce each HEK-293 cell). Transduced NPCs expressing GFP were then FACS-sorted based on GFP expression and thereafter maintained in culture.

2.10 Time-lapse experiments and cell tracking

Video microscopy was performed immediately after neurosphere plating or at least 8 h after the plating of individual murine NPCs (mNPCs) using an inverted microscope (Olympus IX81) equiped with a CoolSnap HQ camera (Princetown Instruments) and controlled by MetaMorph software (Universal Imaging), as previously described [117] or using a Nikon A1E confocal laser microscope (Nikon Corp. Tokyo) [42]. Both systems were housed within a temperature-controlled incubator chamber maintained at 37°C (the Box & the Cube, LIS). Throughout the experiments, the levels of CO2 (5%), O2 (19), and humidity (95% relative humidity) were rigorously regulated using an active gas supply system (the Brick, LIS). Images were acquired from 5-20 fields per condition at 10-minute

intervals using a 10x objective (Olympus) or *via* mosaic acquisition with a 20x objective (Nikon A1R). Subsequent tracking and overlay of individual cell trajectories over a 4-h period were accomplished using the track object function in MetaMorph software (Molecular Devices) or the MTrackJ plugin in ImageJ software.

Quantitative analyses of migratory characteristics, including the accumulated migration distance, cumulative distance, migration velocity, mean square displacement (MSD), and directional persistence, were performed with the custom-made open-source computer program DiPer [118].

2.11 Immunostaining

Neurospheres and adherent cells were fixed for 10 minutes in 4% paraformaldehyde and subsequently permeabilized in 0.1% Triton X-100 PBS following established protocols. Cells were then incubated with the primary antibody in blocking buffer for 1 h at room temperature, followed by three washes and incubation with an Alexa-conjugated secondary antibody (1/1000, Molecular Probes) for an additional hour. DAPI (1 µg/mL, Sigma) was utilized for nuclear counterstaining, and Fluoromount (Southern Biotech) was used for mounting before observation under a fluorescence microscope.

The primary antibodies used are listed in Supplementary Table S1. Images were acquired using a BX51 microscope (Olympus) equipped with a Retiga200R camera or a Leica TCS SPE confocal microscope (Leica Microsystems). The mean fluorescence intensities of nuclear HIF1α and cytoplasmic JMY were quantified using DAPI or phalloidin staining for object segmentation with ImageJ software.

2.12 Visualization of ROS-positive cells using fluorescence microscopy

The analysis of ROS-positive cells via fluorescence microscopy was performed utilizing CellROX Deep Red Reagent (Molecular Probes) following the manufacturer's guidelines. Briefly, at 24 h post-irradiation (0.5 Gy), CellROX Deep Red Reagent was added to individual migrating cells or those migrating away from the neurospheres after 4 h of migration, with a final concentration of 5 µM, and the cells were incubated for 30 minutes. Images were acquired using a previously described microscopy system. The percentages of ROS-positive cells were determined by calculating the ratio

of ROS-positive cells to the total number of cells counted, ranging from 300 to 1200 cells per condition, across 8 separate fields.

2.13 Cell invasion assay

The invasion experiments were conducted using Matrigel invasion chambers (BD Biosciences) as described previously [42,119]. Briefly, 24 h post-irradiation (0.5 Gy), cell suspensions (5×10^4 cells/0.5 mL) were seeded into the upper chamber with medium lacking growth factors (EGF and FGF), while culture medium supplemented with growth factors was added to the lower chamber. After 29 h of incubation at 37°C, the cells remaining on the upper surface of the membrane were gently removed using cotton-tipped swabs. Cells that invaded the lower surface of the membrane were fixed with 4% paraformaldehyde, and their nuclei were stained with DAPI (1 µg/mL; Sigma). The membranes were imaged using a Nikon Eclipse 50i (objective 10x/NA 0.3) equipped with a Hamamatsu CCD ORCA-05G camera and controlled by NIS-elements BR V3.2 software, which included a motorized stage. Nuclei detected on the membranes were quantified, and the results are expressed as percentages relative to nonirradiated controls.

2.14 Intracerebral grafts

Swiss$^{nu/nu}$ mice were housed under standard conditions with *ad libitum* access to food and water in a controlled environment maintained at a constant temperature (19°C-22°C) and humidity (40-50%) on a 12:12 h light/dark cycle. All animal-related procedures were performed in compliance with the European Communities Council Directive of 22nd September 2010 (EC/2010/63) and were approved by the Comité d'Ethique en Expérimentation Animale, Direction de la Recherche Fondamentale, CEA (authorization #A16-002; CEtEA-CEA DRF). Cell grafts were conducted following established protocols previously described [42,120] using a stereotaxic apparatus (David Kopf model 900 Small Animal Stereotaxic Instrument). Individual dissociated cells (100,000 in 2 µL) derived from small neurospheres of GFP-mNPC were inoculated using a 33G Hamilton syringe needle (Hamilton Bonaduz, Switzerland) at specific coordinates: anteroposterior: +0.5 mm, dorsoventral: -3 mm and lateral: +1.5 (control cells) and -1.5 mm (irradiated cells). Forty-eight hours post-grafting, the animals were deeply anaesthetized and perfused intracardially with 4% paraformaldehyde in PBS. Brain tissues were harvested, postfixed overnight, cryoprotected with 10% sucrose/PBS, and frozen in dry-

ice cooled isopentane. Serial coronal brain sections (14 µm thick) with an interslice spacing of 60 µm were prepared using a cryostat (Leica CM3050S). These sections were then mounted for analysis of the dispersion of the grafted cells *via* immunofluorescence detection of GFP expression as previously described [42]. Images were acquired at 10x magnification using NIS Elements software with a Pathfinder-Nikon motorized microscope (Nikon Instruments, Inc.).

The dispersion of engrafted NPCs in the coronal plane was quantified as the total surface area in μm^2 occupied by human GFP-positive cells across the analysed coronal slices.

2.15 Reverse transcription-quantitative PCR (RT–qPCR)

RNA extraction was carried out using the RNeasy Plus Mini Kit or the RNeasy plus Micro Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The isolated RNA was then transcribed into cDNA using high-capacity RNA in cDNA Master Mix (Applied Biosystems). Quantitative PCRs were conducted in triplicate in 96-well plates using SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). The primer sequences utilized are provided in Supplementary Table S2.

2.16 Western blot analysis

Protein extraction (RIPA buffer) and quantification (Bradford Coomassie) were performed according to the manufacturer's recommendations (Sigma and Thermo Fisher, respectively). Subsequently, 30 to 50 µg of protein was separated by PAGE and transferred following standard procedures. The membranes were initially probed with the primary antibodies listed in Supp Table 1. After washing, the membranes were incubated with secondary antibodies (goat anti-mouse peroxidase or goat anti-rabbit peroxidase, 1/5000; Pierce) for 1 h at room temperature. Analysis was performed using an enhanced chemiluminescence system according to the manufacturer's instructions (SuperSignal West Pico, Pierce).

2.17 Statistical analyses

All values are presented as the mean ± SEM. Statistical significance for comparisons between two groups was determined using the unpaired Mann–Whitney test or t-test. For comparisons among multiple groups, nonparametric ANOVA was conducted, followed by post hoc tests. As previously described, two-way ANOVA with factors of time and condition was used to analyse the MSD data

[121]. GraphPad Prism 7.1 software was used for the statistical analyses. Statistical significance levels are indicated as follows: *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001.

3. Results

γ-radiation increases migration velocity and invasive potential of both human and mouse NPCs

Primary human fetal neural progenitors (hNPCs) were cultured either in suspension or on laminin-coated substrate in a medium supplemented with the growth factors FGF2 and EGF to maintain their stem cell characteristics [26,47]. These analysis revealed that all primary cell lines expressed several key neural progenitor markers (Supp Fig 1) : (1) Nestin, a major intermediate filament protein commonly used as an NPC marker both *in vitro* and *in vivo* [48], (2) Vimentin, another intermediate filament protein expressed in the developing neural tube [49], (3) Musashi-1, an RNA-binding protein essential for NPC self-renewal [50]; (4) SOX1 and (5) SOX2, SRY-box transcription factors SOX critical markers for NPC identity [51,52]; (6) CXCR4, involved in NPC migration during injury [53,54]; and (7) Notch1 identified to largely contributes to the maintenance of neural stem cell [55]. Additionally, their neuroepithelial identity was confirmed by the expression of N-cadherin, a cell adhesion molecule that plays a key role in the maintenance of neural stem cell niches [56]. As previously described, hNPCs were only weakly immunoreactive for GFAP, a marker of astrocytes and radial glial–like neural progenitor cells [47]. Similarly, fewer than 10% of cells were DCX^{high}-positive immature neurons whereas the majority (~90%) expressed low levels of DCX (DCX^{low}), a population previously shown to include a significant proportion of neural stem-like cells [57].

Individual cell tracking analysis, performed 24 hours after plating on laminin, revealed mean migration velocities across five hNPC lines ranging from 33 to 50 µm/h (mean velocity: 44.3 µm/h; Supp Movie S1 and Supp Fig 2A). Over time, hNPCs exhibited random migratory trajectories (Supp Fig 2B) characterized by distinct phases including pausing, acceleration, and deceleration steps as previously observed in neuroblasts (Supp Fig 2C; for review [58]).

We next investigated how different doses of ionizing radiation ranging from 0 to 3 Gy affected hNPC motility. First, the colony formation assay revealed a significant reduction in clonogenicity following a single radiation dose greater than 0.5 Gy (Supp Fig 3A and 3B). Consistently, no significant increase

in cleaved caspase-3-positive cells was detected 24 hours after exposure to 0.5 Gy in hNPC cultures, indicating no detectable apoptosis at this dose and time point (Supp Fig 3C). Similar observations were made in mNPCs (Supp Fig 3D).

We next quantified average migration velocity in two hNPC lines at 4-h intervals between 8 and 28 h post-irradiation across radiation doses (Figure 1A). Whereas the migration velocity of nonirradiated hNPCs remained stable over time, irradiated hNPCs showed a marked increase as early as 8 h post-irradiation, particularly at 0.5 and 1.5 Gy. This enhanced migration persisted through 28 h post-irradiation at both doses.

The radiation-induced increase in migration was consistently observed 24 hours after a 0.5 Gy exposure across all hNPC lines tested, derived from five independent donors (Figure 1B). On average, irradiated hNPCs exhibited a 124% increase in migration relative to nonirradiated controls, with no association between response magnitude and each donor's basal migration rate (Supp Fig 2A).

Long-term time-lapse analysis further revealed that 0.5 Gy irradiation significantly increased migration velocity for up to 52 h post-irradiation before returning to baseline (Figure 1C).

Likewise, single-cell tracking at 24 hours confirmed that irradiated hNPCs exhibited higher migration velocity (+117% vs. controls; Figure 1D, left panel) and greater territory exploration, as evidenced by cumulative trajectories (Figure 1D, middle panels), accumulated distance (Supp Fig 4A, left panel), and mean square displacement (MSD; Figure 1D, right panel). In contrast, directional persistence of the irradiated hNPCs remained unchanged (Supp Fig 4A, right panel).

Similar observations were obtained with mNPCs derived from embryonic and adult mouse brains (Figure 1E and Figure 1F, respectively). Irradiation increased territory exploration (Figure 1E and 1F, middle panels), accumulated distance (Supp Fig 4B and 4C, left panels) and MSD (Figure 1E, 1F, right panels), whereas directional persistence remained unchanged, as observed in hNPCs (Supp Fig 4B and 4C, right panels). To further assess this effect, we analysed neurosphere spreading on laminin, a model of directed migration [59–64] (Figure 1G, Supp Fig 4D, and Supp Movie 2). Irradiated mNPCs (0.5 Gy, 24 h post-irradiation) displayed significantly higher migration velocity and cumulative distance than non-irradiated controls, without changes in directional persistence (Figure 1G). Interestingly, irradiated mNPCs migrated faster on both Matrigel (+146%, Supp Fig 4E) and adult mouse brain slices (+124%, Figure 1H), indicating that the radiation-induced migration is independent of substrate type. Although basal migration speed varied with laminin coating

concentration, substrate composition did modify the radiation response (data not shown). Taken together, these results indicate that radiation-induced NPC migration is conserved across species and developmental stages, manifests in both random and directed migration paradigms, and appears to represent an intrinsic property of neural progenitor cells.

We next examined whether radiation also affects hNPC invasiveness using invasion Matrigel-coated transwell invasion chambers to model extracellular matrix invasion. As shown in Figure 2A, irradiation significantly increased the invasiveness of hNPCs compared with nonirradiated controls. To evaluate the *in vivo* impact of radiation, GFP-labeled mouse NPCs (GFP-mNPCs) were irradiated with 0.5 Gy *in vitro* and subsequently stereotactically implanted into the striatum of adult nude mice (Figure 2B). Analysis of serial coronal brain sections collected two days later showed that irradiated GFP-positive cells exhibited greater dispersion within the coronal plane and enhanced antero-posterior migration compared with nonirradiated controls (Figure 2C and 2D respectively). These findings were consistent with results from *in vitro* random migration assays performed using the same GFP-mNPCs (Figure 2E). Together, these results demonstrate that exposure to 0.5 Gy enhances the *in vivo* invasive capacity of mNPCs.

In vitro radiation-induced migration is not associated with differentiation and does not result from a change in cell-cycle phase.

Immunostaining analyses revealed that, under our culture conditions, irradiated migrating NPCs — both human and murine— expressed specific markers of undifferentiated neural cells at levels comparable to those in nonirradiated controls (Supp Fig 5A, Table 1 [hNPCs] and 2 [mNPCs]). In contrast, markers of neural differentiation, including β3-tubulin, MAP2, and the nuclear markers TBR1 and TBR2, were absent from migrating cells. Only, few β3-tubulin- and MAP2-positive cells were occasionally detected within some neurospheres (Supp Fig 5A and Table 2). Altogether, these findings indicate that migrating NPCs remain undifferentiated throughout the period analysed following 0.5 Gy irradiation.

We then quantified mitotic activity using phospho-Histone H3 (pH3) immunostaining in nonirradiated and irradiated hNPCs (Supp Fig 5B). Across three independent hNPC lines, mitotic

cells constituted 0.6-1.4% of the population under control conditions. Twenty-four hours after 0.5 Gy irradiation, all the three hNPC lines exhibited a significant reduction in pH3-positive hNPCs (Supp Fig 5B), indicating that irradiation decreases the fraction of cells undergoing mitosis.

Finally, to assess whether radiation-induced migration depends on the cell-cycle, we measured mean migration velocity in FUCCI-labelled mNPCs using single-cell tracking in a random migration assay. FUCCI labelling allows discrimination between G1 (red fluorescence) and S/G2 (green fluorescence) phases [65], enabling phase-specific analysis of migratory behaviour. Consistent with previous findings, 0.5 Gy irradiation increased mNPC migration (Supp Fig 5C). However, this radiation-induced enhancement was not associated with a particular cell-cycle phase : migration velocities were comparable between cells in the G1 phase and S/G2 phase cells in both irradiated and nonirradiated groups (Supp Fig 5C and Supp movie 3). These results indicate that, under our culture conditions, radiation-induced migration does not arise from a phase-specific change in cell motility.

Radiation-induced hNPC migration depends on rapid and transient nuclear accumulation of HIF-1α

HIF1α regulates numerous physiological responses to hypoxia, including cell migration and invasion [66–70]. Under normoxia, HIF1α is rapidly degraded *via* the proteasome, whereas under hypoxia, stabilizes the protein, allowing nuclear translocation and transcriptional activation [71]. Because ionizing radiation has been shown to promote HIF1α stabilization and its nuclear accumulation [42,72–76], we examined whether HIF1α contributes to the radiation-induced migration and invasion of hNPCs.

Immunofluorescence analysis revealed that 0.5 Gy irradiation induced a rapid and transient nuclear accumulation of HIF1α (Figure 3A and 3B), a finding further confirmed by Western blot analysis (Supp Fig 6A). RT–qPCR analysis showed that this radiation increase in HIF1α protein levels occurs without changes in HIF1α mRNA expression, which remained comparable to nonirradiated controls (Supp Fig 6B), consistent with a post-transcriptional mechanism gouverning HIF1α stabilization [77].

To further assess the role of HIF1α in radiation-induced migration, hNPCs were treated with the iron chelator deferoxamine (DFO), a well-established stabilizer of HIF1α [78]. DFO treatment induced

robust nuclear accumulation of HIF1α and significantly increased migration velocity, effectively mimicking the effects of irradiation (Figure 3C and 3D). Conversely, pretreatment with YC1, a nitric oxide-independent activator of soluble guanylyl cyclase activator that supress HIF1α expression at the post-transcriptional level [79] and efficiently inhibits HIF1α in GSCs [42], completely abolished radiation-induced hNPC migration (Figure 3D). In line with this pharmacological inhibition, siRNA-mediated knockdown of HIF1α (>95% reduction, Supp Fig 6C) markedly radiation-induced migration compared with the cell transfected with control siRNA-(siCt; (Figure 3E).

Finally, the requirement for HIF1α was confirmed using HIF1α-deficient mNPCs derived from transgenic mice. Consistent with the effects of pharmacological inhibition (Figure 3D) and siRNA-mediated knockdown (Figure 3E), genetic deletion of HIF1α in mNPCs (Supp Fig 6D) completely abolished radiation-induced migration. Irradiated HIF1α-deficient mNPCs failed to exhibit the enhanced migratory response observed in irradiated wild-type controls (Figure 3F). Together, these findings demonstrate that HIF1α is a critical and indispensable mediator of radiation-induced NPC migration.

Radiation-induced migration of NPCs is mediated through the HIF1α/JMY pathway

Previous studies have emphasized that JMY, originally identified as p53 cofactor, is upregulated under hypoxic conditions in a HIF1α-dependent manner and promotes cell motility through its actin-nucleation-promoting activity [80–82]. JMY is also expressed in brain tissue [43,44] and contributes to radiation-induced migration of GSCs [42]. We, therefore hypothesized that JMY may similarly mediate radiation-induced migration of NPCs.

Immunofluorescence quantification using two independent antibodies, supported by Western blot analysis, revealed a significant upregulation of JMY in hNPCs 24 h after 0.5 Gy irradiation (Figure 4A, 4B, 4C; Supp Fig 7A). This radiation-induced increase in JMY was predominantly cytoplasmic (Figure 4A, Supp Fig 7A). As reported in U2OS cells [82], JMY localized to the leading edge of hNPCs (Figure 4D), where its accumulation was markedly enhanced by irradiation. JMY was also enriched in migratory structures involved in cell migration, including lamellipodia (yellow arrows in Figure 4D and Figure 4E) and filopodia (white arrows in Figure 4D and Figure 4F).

Measurement of filopodia lengths showed that irradiation promoted membrane protrusion formation (Figure 4G), consistent with their established role in facilitating cell migration [83]. This increase in JMY expression was consistent with transcriptional regulation, as JMY mRNA levels were significantly elevated by 8 h post-irradiation and remained elevated at 24 h post-irradiation (Figure 4H).

To determine whether JMY is required for radiation-induced migration, we silenced JMY using specific siRNAs, which reduced JMY mRNA levels by 75% compared with control siRNA (siCt) (Supp Fig 7B). JMY depletion did not alter basal hNPC migration but completely abolished radiation-induced migration (Figure 4I), indicating that JMY cytoplasmic accumulation is essential for this response. These results were further validated in two independent hNPC lines generated by lentiviral delivery of distinct shRNAs targeting JMY (Supp Fig 7C). In both cell lines, JMY knowdown did not affect basal migration velocity but fully prevented radiation-induced migration (Figure 4J). Consistently, loss of JMY suppressed radiation-induced invasion in Matrigel invasion assays (Figure 4K).

Finally, to determine whether radiation-induced JMY upregulation depends on HIF1α, we generated two hNPC lines expressing a HIF1α-targeting shRNA (Sh1 and Sh2 HIF1α), which significantly reduced basal HIF1α mRNA (Supp Fig 7D). Whereas irradiation increased JMY mRNA in shCt cells (209% and 235% in hNPCs CH67 and CH127, respectively), this induction was markedly attenuated in irradiated HIF1α-knockdown hNPCs (Supp Fig 7E). Similarly, irradiated HIF1 α-deficient mNPCs showed no increase in JMY mRNA, in contrast to irradiated wild type mNPCs (Supp Fig 7F).

Collectively, these findings demonstrate that radiation-induced JMY expression is HIF1α-dependent, and that ionizing radiation enhances NPC migration and invasion *via* the HIF1α/JMY pathway.

Radiation-induced migration of NPCs depends on an increase in reactive oxygen species (ROS)

Radiation exposure is widely known to stimulate the generation of ROS, which functions as a key mediators in various intracellular signalling pathways and cellular processes, including migration and invasion [84–86]. Previous studies have demonstrated that ROS plays a central role in activating the transcription factor HIF1α by stabilizing it within cells [87–89]. This stabilization enables its nuclear translocation, where its heterodimerizes with HIF1β and triggers the transcription of target genes [71].

To determine whether irradiation increases ROS levels in NPCs, we quantified the number of ROS-positive cells using a fluorogenic probe specifically designed to measure ROS levels in both nonirradiated and irradiated human and murine NPCs 24 h after 0.5 Gy exposure. We found that irradiation led to a significant increase in ROS-positive cells following irradiation in both human and murine NPCs (Figure 5A and Supp Fig 8A, respectively). This increase correlated with higher migration velocity in both random migration (Figure 5B and Supp Fig 8B) and directed migration assays (Figure 5C for hNPCs and Supp Fig 8C and 8D for mNPCs). Moreover, cells positioned near to the neurosphere edge showed lower ROS levels compared with cells that had migrated farther away (Supp Fig 8E).

Based on these observations, we hypothesized that oxidative stress could be attenuated by pharmacological pretreatment with the well-established antioxidant NAC [90–93] thereby modulating ROS levels and, consequently, the radiation-induced NPCs motility. As expected, NAC treatment markedly reduced ROS levels in irradiated NPCs (Figure 5A and Supp Fig 8A) and effectively supressed radiation-induced migration in both random (Figure 5B and Supp Fig 8B) and directed migration assays (Figure 5C and Supp Fig 8C and 8D). Comparable inhibitory effects were observed in invasion assays using hNPCs (Figure 5D). Additionally, NAC pretreatment blocked the radiation-induced upregulation of JMY expression in lamellipodia and filopodia (Figure 5E and 5F, respectively) and prevented the associated increase in filopodia length (Figure 5G).

In summary, these findings indicate that the initial rise in oxidative stress following irradiation is a critical early event required to initiate radiation-induced migration in NPCs.

4. Discussion

Precise spatial positioning of neural progenitor cells (NPCs) and their progeny is essential for proper cortical lamination and the establishment of functional brain circuit [5,6]. Disrupted positioning and ectopic localization of progenitors and/or newly generated neurons are hallmarks of cortical malformations and neurodevelopmental disorders, including lissencephaly, polymicrogyria, microcephaly, which are frequently associated with cognitive impairment and epilepsy [94–97]. In the present study, we demonstrate that a single 0.5 Gy dose of γ-radiation enhances the migration velocity and invasiveness of both human and mouse NPCs *in vitro* and *in vivo*. Such aberrant NPC migration following radiation exposure could therefore promote displacement from native niches and thereby contribute to radiation-associated neurodevelopmental abnormalities by fostering ectopic localization and disrupting cortical architecture [98–100]. Importantly, this pro-migratory effect was absent at 3 Gy, consistent with the pronounced reduction in clonogenic capacity observed at this higher dose. Together, these findings reveal a dose-dependent response in which low-to-moderate irradiation enhances NPC motility and invasiveness, whereas higher doses impair long-term proliferative capacity.

As previously reported in glioma stem cells (GSCs) [42], our study demonstrates that the HIF1α/JMY pathway is a key driver pathway of radiation-induced migration and invasion in both murine and human NPCs. Pharmacological inhibition of HIF1α, along with HIF1α or JMY knockdown/knockout confirmed their essential functions in radiation-induced NPC migration and invasion, identifying both molecules as potential molecular targets. The involvement of the ROS/HIF1α/JMY pathway in both NPCs and GSCs suggests that it may constitute a broader mechanism underlying radiation-induced cell motility. However, its clinical significance in radiation-related neurodevelopmental disorders remains to uncertain. Future studies should also investigate how JMY integrates with other established regulators of NPC migration, including Wnt, Notch, integrin-dependent signaling, and Rho-GTPase/cofilin-mediated actin dynamics).

We also extend previous findings by identifying reactive oxygen species (ROS) as a novel upstream regulator of this pathway. Specifically, we show that the earliest event in radiation-induced NPC migration involves an intracellular increase in ROS, which can be blocked by NAC treatment. Prior work has shown that hypoxia-induced ROS can inhibit prolyl hydroxylase-mediated hydroxylation of HIF1α [101], thereby preventing its rapid proteosomal degradation and promoting its stabilization

and nuclear translocation [88]. Similar mechanisms may also operate in irradiated NPCs, consistent with evidence that HIF1α supports hypoxia-induced cell migration [66–70] and is inducible by ionizing radiation in tumour cells [42,75]. Once translocated into the nucleus, HIF1α binds to promoter regions of its target genes [102], including JMY [80], leading to increased cytoplasmic JMY and enhanced actin nucleation. It will now be important to determine whether ROS elevation also constitutes the initiating step of radiation-induced migration in GSCs as demonstrated here for NPCs.

The increase in NPC migration and invasion observed after irradiation is associated with a significant reduction in NPC proliferation, as showed by immunocytochemical quantification of phosphorylated Histone H3-positive hNPCs. However, FUCCI-based migration tracking reveals that radiation-induced migration does not depend on a particular cell-cycle phase. Importantly, we did not detect premature differentiation under our culture conditions (serum-free medium supplemented with FGF2 and EGF on laminin-coated surfaces). These observations are consistent with previous reports showing no significant differentiation following a 1 Gy dose in mNPC cultures [103]. While these conditions are known to suppress spontaneous differentiation, they may not fully recapitulate *in vivo* dynamics, where NPCs inevitably begin differentiating once they exit their niche [104,105]. Further studies should therefore determine whether low-dose irradiation leads to delayed differentiation or lineage bias over longer post-irradiation periods, as has been described at higher doses [103–105]. In addition**,** the long-term consequences of 0.5 Gy on NPC fate decisions should be adressed in system that better reproduce tissue physiology, such as brain organoids or in vivo systems.

We also evaluated whether irradiation triggers apoptosis in hNPCs. The marked loss of clonogenicity observed at the highest dose tested (3 Gy) likely reflects substantial delayed cellular damage, potentially involving apoptotic mechanisms. By contrast, at 0.5 Gy, we did not detect a significant increase in apoptosis, as the proportion of cleaved caspase-3 positive cells remained low and comparable to that of nonirradiated controls. This result contrasts with *in vivo* murine studies reporting robust apoptosis of proliferating cells within neurogenic regions after irradiation [106,107]. A plausible explanation, also proposed by Konirova et al. [103], is that our serum-free culture conditions combined with growth factor supplementation, maintain progenitor identity and confer partial protection against intermediate doses. Nevertheless, the absence of overt apoptosis *in vitro* should not be interpreted as evidence of minimal biological impact *in vivo*. Even when NPCs survive irradiation, they may undergo persistent alterations in migration dynamics, differentiation, or

integration into developing neural circuits—changes that could contribute to radiation-associated neurodevelopmental dysfunction.

5. Conclusion

In conclusion, our findings indicate the conclusion that intermediate doses of ionizing radiation promote NPC migration and invasion through **a ROS/HIF1α/JMY pathway**. This discovery has important implications for understanding how radiation perturbs brain development. Radiation-induced changes in NPC motility may contribute to cognitive deficits following cranial irradiation, as previously suggested [108] and elucidating the underlying pathway may guide strategies to mitigate these adverse effects. Conversely, understanding how radiation modulates NPC motility may shed light on endogenous repair mechanisms by facilitating NPC recruitment to sites of brain injury or disease. In this context, JMY emerges as a promising target to modulate NPC behaviour: its inhibition could restrain aberrant NPC migration in pathological contexts, whereas transient activation of the pathway might enhance NPC recruitment for regenerative purposes.

However, further studies are required to clarify the long-term consequences of radiation-induced NPC migration and invasion, to establish the contribution of the **ROS/HIF1α/JMY** axis to radiation-associated neurodevelopmental disorders *in vivo* and to assess its translational relevance.

6. List of abbreviations

Cs	Cesium
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DFO	deferoxamine
HIF1α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
JMY	Junction-Mediating and regulatorY protein
FUCCI	fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator
GFP	Green Fluorescent protein
GSCs	Glioblastoma stem-like cells
Gy	Gray
Hs	Homo sapiens
Mm	Mouse musculus
MSD	Mean square displacement
MOI	Multiplicity of infection
NAC	N-acetyl-L-cysteine
NPCs	Neural progenitor cells
PI	Post irradiation
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROS	Reactive oxygen species
RT–qPCR	Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
SEM	*standard* error of mean
SGZ	Subgranular zone
Sh	Small hairpin
SVZ	Subventricular zone
YC1	3-(5′-hydroxymethyl-2′-furyl)-1-benzyl indazole

Ethics approval and consent to participate

See the Materials and Methods section in the paragraphs Isolation and culture of human NPCs (hNPCs) and animals.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author
on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Fundings

OB and MS are recipients of doctoral fellowships provided by the CEA (FOCUS-OSP) and the Ministère de la Recherche, respectively. This work was funded by grants from CEA (Segment radiobiologie), La Ligue Contre Le Cancer (Comité d'Ile de France), Electricité de France (EDF) and Société Française de RadioProtection (SFRP).

Acknowledgements

The authors thank members of the LRP for their valuable discussions and acknowledge V. Barroca, V. Neuville, and the staff of the animal facility for their assistance. They also thank V. Menard for providing irradiation facilities and N. Dechamps and J. Bayer for assistance with cytometry cell sorting. Special thanks are extended to the staff of the Department of Obstetrics and Gynaecology at Antoine Béclère Hospital (Clamart, France). We also thanks F. Pflumio (INSERM U1274, CEA, UMR E008) for providing the pTRIP shHIF1α plasmid and F. Milliat (PSE-SANTE/SERAMED/LRMed, ASNR) providing HIF1α $^{flx/flx}$ mice.

Authors' contributions

K.B.M., M.S., H.B. and L.R.G. conducted the videomicroscopy experiments and RT–qPCR experiments. O.B., K.B.M, H.B., O.E. O.G., C.G.B. and L.R.G. carried out the culture, immunostaining, transfection and transduction procedures. J.R.P. and L.R.G. performed the mNPC engrafment. O.B. and H.B. conducted Western blot experiments. D.B. and G.P. designed and produced the ShJMY and ShHIF1α lentivirus. M.J.G. and D.M. provided the human NPCs. M.S. and L.R.G. performed experiments using HIF1$\alpha^{fl/fl}$ mice. F.B. and L.R.G. conceptualized and designed the study, analysed and interpreted the data, supervised the research and wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Authors' information

	ORCID numbers
Karim Ben M'Barek	0000-0002-2556-0325
Christine Granotier-Beckers	0000-0003-1063-1159
Didier Busso	0000-0003-3027-7900
Marie-Justine Guerquin	0000-0002-1752-7250
Jose R. Pineda	0000-0002-0900-7466
François D. Boussin	0000-0003-3778-4403
Laurent R. Gauthier	0000-0003-4644-7660

7. Supplementary material

Additional file 1 (Supp movie 1) – Representative time-lapse of hNPCs migrating on a on laminin-coated substrate in a random migration assay (Supp Figure 2A and 2B).

Additional file 2 (Supp movie 2) – Time-lapse of mNPCs migrating from a neurosphere plated onto laminin-coated substrate in a directed migration assay (neurosphere spreading; See Figure 1G and Supp Figure 4D).

Additional file 3 (Supp movie 3) – Representative time-lapse of FUCCI-labelled mNPCs tracked over the time in a random migration assay (see Supp Figure 5C).

Figure legends

Figure 1. γ-irradiation stimulates the migration of NPCs.

(A) Dose-dependent effects of ionizing radiation on the migration of hNPCs derived from two distinct human fetal brain samples (CH151 and CH154, represented by blue and purple curves, respectively). Cell motility was monitored using video microscopy over successive 4-h intervals, from 8 to 28 h post-irradiation. The graphs depict radiation-induced alterations in cell migration, expressed as percentages relative to nonirradiated controls, at specific time points post-irradiation. The mean migration velocity was calculated for a minimum of 150 cells (CH151) and 85 cells (CH154) across two independent experiments (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

(B) Increased migration of irradiated hNPCs derived from five human embryonic brains (CH154, CH151, CH210, CH155, and CH67). Percentages were calculated based on the tracking of at least 200 cells for each NPC line (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

(C) Effects of 0.5 Gy irradiation on the migration of hNPCs. hNPCs were irradiated 24 h after plating. The histogram depicts radiation-induced alterations in cell migration velocity, presented as percentages relative to nonirradiated controls, across specific time intervals post-irradiation. At least 100 cells were tracked every 10 min over a total of 124 h, analyse in successive 4-hour period. The data represent the results of three independent experiments. (**p < 0.01 and ***p < 0.001).

(D, E, F) Mean migration velocity, cumulative migration tracks, and MSD curves of the control and irradiated (0.5 Gy) hNPCs (D), as well as mNPCs derived from embryonic day 14.5 cortex (E) or adult cortex (F). Analyses were performed 24-28 h post irradiation for hNPCs (D) and embryonic mNPCs (E), and 24-26 h post-irradiation for adult mNPCs (F). The left histograms display the mean velocities of nonirradiated controls and irradiated cells based on 120 cells per condition (***p < 0.001). The two middle graphs, generated using the DiPer program [118], display the tracking of 50 individual cells, with color-coded traces representing nonirradiated controls and irradiated cells. The right panels show the mean squared displacement (MSD, μm^2), indicating the area explored by the cells at 10-minute intervals over 4-hour period for nonirradiated (blue) and irradiated (red) NPCs (***p <0.001).

(G) Tracking traces of individual mNPCs that migrated out of neurospheres over a 4-hour period in both nonirradiated and irradiated conditions (right panels). Cumulative distance (µm), migration velocity (µm/h) and directional persistence were calculated from individual mNPCs tracks during this period, based on data from at least 200 cells (**p < 0.01 and ***p < 0.001).

(H) Representative images of the nonirradiated and irradiated (0.5 Gy, 24 h PI) murine neurospheres at 0 and 4 h after plating on mouse brain cortical slices. The histogram on the right displays neurosphere diameters at 0 and 4 h after plating. Analyses were based on data from at least 85 neurospheres per condition (***$p < 0.001$).

Figure 2. Irradiation increases the invasiveness of NPC both *in vitro* and *in vivo*.

(A) Matrigel invasion chambers were used to assess the invasiveness of hNPCs 29 h after 0.5 Gy irradiation. Data are expressed as percentages relative to unirradiated controls (n=4 chambers per group; *$p < 0.05$).

(B) Experimental timeline for intracranial grafts of GFP-mNPCs into immunodeficient mice. Unirradiated and irradiated (0.5 Gy) cells were grafted into the striatum *via* stereotaxic surgery. Mice were euthanized after 2 days, and serial coronal cryostat sections were prepared from fixed brains to analyse cell dispersion. Immunostaining with an anti-GFP antibody was performed to visualize the transplanted cells.

(C and D) Quantification of cell dispersion (C) and anteroposterior migration (D) of nonirradiated or irradiated mNPCs estimated from coronal slices of mouse brains immunostained for GFP 48 h after striatal grafting. Data were compiled from two independent experiments, including 4 brains per condition (*$p < 0.05$).

(E) Mean migration velocity of control and irradiated (0.5 Gy) mNPCs, measured 24 h post-irradiation in a random migration assay, and used for intracerebral transplantation in Figure 2C and 2D (***$p < 0.001$).

Figure 3. Rapid and transient nuclear accumulation of HIF1α is involved in radiation-induced migration of NPCs.

(A) Immunostaining of HIF1α in nonirradiated and 0.5 Gy irradiated (4 h PI) hNPCs. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar: 20 μm.

(B) Quantification of nuclear HIF1α fluorescence intensity in 0.5 Gy irradiated hNPCs over time. Data were obtained from 15 to 21 cells per time point (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$ and ***$p < 0.001$).

(C) Percentage of intranuclear HIF1α fluorescence intensity following0.5 Gy irradiation (2 h) or DFO treatment (100 μM, 4 h). Data were collected from 39, 26 and 22 cells per condition; ***$p < 0.001$).

(D) Effects of YC1 (50 μM) or DFO (100 μM) treatment on hNPC migration velocity 24 h PI. Migration velocity is expressed as a percentage of the nonirradiated control and was calculated from at least 120 cells for each condition (**p < 0.01 and ***p < 0.001).

(E) HIF1α knockdown prevents radiation-induced migration of hNPCs. hNPCs were transfected with siRNA targeting HIF1α (siHIF1α) or a scrambled control (siCt) and 0.5 Gy irradiated 24 h later. Migration velocity was assessed 24 h post-irradiation and is expressed as a percentage of the nonirradiated control. Data were obtained from at least 50 cells per condition (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

(F) HIF1α deficiency prevents radiation-induced migration of mNPCs. Compared with irradiated wild-type mNPCs, HIF1α-deficient mNPCs from transgenic mice did not exhibit an increase in migration velocity 24 h post-irradiation (0.5 Gy). Data were collected from 100 cells per condition across four donor mice (***p < 0.001 and ns: not significant).

Figure 4. The HIF1α/JMY pathway contributes to the radiation-induced migration of NPCs.

(A) Immunostaining of hNPCs with an antibody against JMY (green M300 Nterm antibody) 24 h post-irradiation (0 Gy or 0.5 Gy). F-actin filament networks were stained with fluorescent phalloidin (red), and nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 10 μm.

(B) Quantification of JMY fluorescence intensity using two different antibodies targeting the N-terminus (M300) or the C-terminus (L16) of JMY (***p < 0.001).

(C) Western blot analysis of JMY protein levels 24 h post-irradiation (0.5 Gy). Fifty micrograms of protein were loaded and analyzed by immunoblotting. β-Actin was used as a loading control.

(D) Representative image of irradiated hNPCs labelled with JMY (green), showing its localization in lamellipodia (yellow arrows) and filopodia (white arrows). F-actin filament networks were visualized using fluorescent phalloidin staining (red), while nucleus was counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 10 μm.

(E and F) 0.5 Gy irradiation significantly increased JMY expression in lamellipodia (E) and filopodia (F) of hNPCs (24 h PI) (*p < 0.05 and ***p < 0.001).

(G) 0.5 Gy irradiation induced a significant increase in filopodia length in hNPCs (24 h PI; *p < 0.05).

(H) Quantification of JMY mRNA levels in hNPCs over time by RT-qPCR. Experiments were performed in triplicate (*p < 0.05 and ***p < 0.001).

(I) Twenty-four hours post-irradiation (0.5 Gy), hNPCs transfected with siCt or siJMY were tracked every 10 min for 4 h. The data were obtained from at least 50 cells per condition (***p < 0.001). Results are expressed as percentages relative to unirradiated siCt hNPCs.

(J) JMY knockdown prevents radiation-induced migration of hNPCs. hNPCs were transfected with shRNA targeting JMY (sh1 or sh2) or a scrambled control (shCt). Mean velocity was determined 24 h after 0.5 Gy irradiation (24 h PI). The data were obtained from at least 50 cells per condition (*p < 0.05, ***p < 0.001, ###p < 0.001 and ns: not significant).

(K) Matrigel invasion chambers were used to evaluate the invasiveness of shJMY- and shCt-treated hNPCs 24 h post-irradiation (0.5 Gy). The percentage of cells detected in the lower chamber relative to the total number of cells plated in the upper chamber was calculated for each condition (n=2 chambers per condition, 5 fields per chamber; ***p<0.001, ##p < 0.01 and ns: not significant).

Figure 5. Radiation-induced migration of NPCs depends on increased ROS.

(A) NAC treatment prevented the radiation-induced increase in the number of ROS-positive hNPCs, determined by fluorescence 30 min post-incubation with CellROX Deep Red Reagent in living cells (0.5 Gy, 24 h PI). The percentages of ROS-positive cells were assessed by analyzing 500 to 1200 cells, according to the manufacturer's instructions (*p < 0.05).

(B) NAC treatment prevented the radiation-induced migration of hNPCs in a random migration assay (0.5 Gy, 24 h PI). Migration velocity, expressed as a percentage of the nonirradiated control, was calculated from at least 65 cells per condition (***p < 0.001).

(C) NAC treatment prevented the radiation-induced migration of hNPCs in a neurosphere spreading assay (0.5 Gy, 24 h PI). The average radius of spread was measured 4 h after neurosphere plating on Matrigel substrate and calculated from at least 28 neurospheres per condition (***p < 0.001).

(D) Matrigel invasion chambers were used to assess the invasiveness of hNPCs, with or without NAC pretreatment (1 h before 0.5 Gy irradiation). The number of hNPCs present on the lower membrane was quantified 29 h post-irradiation. Results are expressed as percentages relative to the nonirradiated controls (n = 3 human NPC lines from two independent experiments; ***p < 0.001).

(E, F and G) NAC treatment prevented the radiation-induced increase in JMY levels in lamellipodia **(E)** and filopodia **(F),** as well as the increase in filopodia length **(G)** in 0.5 Gy irradiated hNPCs (24 h PI; *p < 0.05 and ***p < 0.001). Note: The data for NAC-free conditions originate from the same analyses shown in figures 4E, 4J and 4G. The results were split into two graphs for clarity.

Supplemental Fig 1

Representative immunostaining of hNPCs derived from three human embryonic brains (CH67, CH104 and CH247) for Nestin, Vimentin, Musashi-1, Sox1, Sox2, CXCR4, Notch-1, N-Cadherin, GFAP and DCX. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar: 100 µM

Supplemental Fig 2

(A) Basal mean migration velocity (µm/h) of hNPCs derived from five human embryonic brains (CH154, CH151, CH210, CH155 and CH67). Mean velocities were calculated from at least 150 tracked cells for each NPC line.

(B) Representative cumulative migration traces of 50 individual hNPCs, color-coded and generated using the DiPer program [118].

(C) Sparkline graphs showing acceleration and deceleration phases of migration for individual hNPCs derived from five human foetal brains over a 4-h period. Negative values (below the mean migration velocity) indicate deceleration phases, while positive values (above the mean migration velocity) indicate acceleration phases.

Supplemental Fig 3

(A, B) hNPCs were plated in 12 replicates wells per 96-well plate across six plates at 32 cells per well using cell sorting (FACSAria II) and irradiated with doses ranging from 0 to 3 Gy 24 h later. Subsequently, the medium was replaced with fresh medium, and the cells were allowed to grow for eight days. The number of neurospheres per plate was counted to determine the plating efficiency for each dose (PE = [number of neurospheres formed/number of seeded cells] x 100), expressed as the mean ± SEM from six replicates (**$p < 0.01$; A). The surviving fraction for each dose was calculated as the ratio of the PE of the irradiated sample to the PE of the nonirradiated control [122]. Data were expressed as the mean ± SEM (**$p < 0.01$; B).

(C) Percentages of cleaved caspase-3 positive cells, assessed 24 hours after 0.5 Gy irradiation or in non-irradiated controls, calculated from 6,000 to 11,000 individual hNPCs cultured on a laminin substrate. hNPCs were derived from three different human embryonic brains (CH67, CH104 and CH247), and analysis was performed using QuPath software (V0.5.1).

(D) Percentage of cleaved caspase-3 positive cells, assessed 24 hours post-irradiation (0.5 Gy) or in non-irradiated controls, calculated from 1,100 to 1,400 mNPCs that had spread out from neurospheres plated on a laminin substrate, derived from mouse embryonic brain tissue.

Supplemental Fig 4

(A, B and C) Accumulated distance (left panels) and directional persistence (right panels) measured from 24 to 28 h post-irradiation in human embryonic NPCs (A), mouse embryonic NPCs (B) and adult NPCs (**C**). Data were obtained from the tracking of 50 to 115 cells per condition (**p < 0.01, ***p < 0.001 and ns: not significant).

(D) Representative time-lapse images from video 1 depicting cell spreading from the neurosphere over 240 min. Elapsed time (in minutes) is indicated on each image. The final image shows tracking traces of individual cells that migrated out of the neurosphere. Scale bar: 100 μm.

(E) Mean migration velocity of control and 0.5 Gy irradiated hNPCs from 24 to 28 h post-irradiation on a Matrigel substrate was calculated from at least 65 cells per condition (***p < 0.001).

Supplemental Fig 5

(A) Immunostaining of mNPCs after 4 h of migration on a Matrigel substrate. Cells that migrated out of the neurospheres predominantly expressed Nestin (green), Sox2, and GLAST, while showing negligible expression of Tbr1, Tbr2 and GFAP. The neuronal markers βIII-tubulin and Map2 were not detected in migrating cells, although a few neurospheres may contained interspersed βIII-tubulin/Map2-positive cells. Quantifications for each cell population are shown in Table 2. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 50 μm.

(B) Percentages of Phospho-Histone H3 positive cells, assessed 24 hours after 0.5 Gy irradiation or in nonirradiated controls, calculated from 6,000 to 11,000 individual hNPCs cultured on a laminin substrate. Data were derived from three different human embryonic brains (CH67, CH104 and CH247), using QuPath software (V0.5.1), (***p < 0.001).

(C) Mean migration velocity according to cell cycle phase in nonirradiated and 0.5 Gy irradiated FUCCI-labelled NPCs (24 h PI). Migration velocity was measured for each cell relative to its cell cycle phase. Red bars represent the mean migration velocity of cells in the G1 phase, while yellow and green bars represent the mean migration velocity of cells in the G1/S and S/G/M phases, respectively. A minimum of 26 cells were tracked for each condition (ns: not significant).

Supplemental Fig 6

(A) Western blot analysis of HIF1α 4 h PI (0.5 Gy) in hNPCs. Fifty micrograms of protein were analyzed by immunoblotting, with α-Tubulin used as a loading control.

(B) RT–qPCR quantification of HIF1α mRNA in hNPCs at various time points following 0.5 Gy irradiation.

(C) HIF1α mRNA levels in hNPCs transfected with siRNA targeting HIF1α (siHIF1α) or control siRNA (siCt). Each condition was tested in triplicate (***$p < 0.001$).

(D) HIF1α mRNA levels in HIF1α $^{WT/WT}$ and HIF1α$^{flox/flox}$ mNPC. Each condition was tested in triplicate (***$p < 0.001$).

Supplemental Fig 7

(A) Immunostaining of JMY (green, L16 Cterm Antibody) in hNPCs 24 h PI with 0 Gy or 0.5 Gy irradiation. The white dotted line outlines the edge of the cell. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 20 μm.

(B) Quantification of JMY mRNA levels by RT–qPCR in hNPCs transduced with control siRNA (siCt) or JMY-targeting siRNA (siJMY). Each condition was tested in quadruplicate (***$p < 0.001$).

(C) Quantification of JMY mRNA levels by RT–qPCR in hNPCs transduced with small hairpins targeting JMY (sh1 or sh2) or with scrambled shRNA (shCt). Each condition was performed in duplicate (**$p < 0.01$ and ***$p < 0.001$).

(D) Quantification of HIF1α mRNA levels by RT–qPCR in two hNPC lines transduced with a lentivirus encoding a small hairpin RNA against HIF1α (sh1 and sh2 HIF1α). Each condition was tested in triplicate (***$p < 0.001$).

(E) Quantification of JMY mRNA levels by RT–qPCR in two nonirradiated and 0.5 Gy irradiated (24 h PI) HIF1α knockdown hNPC lines. The experiments were performed in triplicate (***$p < 0.01$ and ***$p < 0.001$).

(F) Quantification of JMY mRNA levels by RT–qPCR in unirradiated and 0.5 Gy irradiated (24 h PI) HIF1α knock-out mNPCs. Each condition was tested in quadruplicate (***$p < 0.001$).

Supplemental Fig 8

(A) ROS-positive mNPCs were assessed by fluorescence 30 min after the application of CellROX Deep Red Reagent to living cells (0.5 Gy, 24 h PI). Percentages were calculated from at least 300 cells per condition (***$p < 0.001$).

(B) Migration velocity of mNPCs, assessed using a random migration assay (0.5 Gy, 24 h PI), is shown as a percentage relative to nonirradiated controls. Calculations were based on at least 100 cells per condition (*$p < 0.05$).

(C) Representative images showing the 4-h migration of mNPCs from nonirradiated and 0.5 Gy irradiated (24 h PI) neurospheres plated on a Matrigel substrate, with or without NAC pretreatment. The white line indicates the cell front 4 h post-plating. Scale bar: 100 µm.

(D) The average spread radius was measured 4 h after mouse neurosphere plating on a Matrigel substrate and calculated from at least 25 neurospheres per condition (***$p < 0.001$).

(E) Representative transmitted light (upper panels) and fluorescence images (lower panels) of mNPCs migrating from the neurosphere. Green fluorescence intensities are proportional to intracellular ROS levesl. White arrows highlight cells with high ROS levels, which migrated farther than cells with low ROS levels. Scale bar: 25 µm. The histogram represents the fluorescence intensity percentages in high- versus low-migrating cells (**$p < 0.01$).

Supplementary Table S1. List of primaryand secondary antibodies used for immunostaining and Western blotting.

Primary antibody	Isotype	Supplier (Cat number)	Working concentration IF (WB)	RRID
Nestin	Mouse	BD Pharmingen (556309)	1/200	AB_396354
Nestin	Mouse	R&D (MAB1259)	1/200	AB_2251304
SOX1	Goat	Biotechne (SC025; #967237)	1/10	AB_2239879
SOX2	Rabbit	Millipore (AB5603)	1/300	AB_2286686
SOX2	Goat	Biotechne (SC025; #967242)	1/10	AB_355110
GLAST	Guinea	Chemicon (AB1782)	1/500	AB_90959
Vimentin	Rat	Biotechne (SC025; #967238)	1/10	AB_10573430
Musashi-1	Goat	Biotechne (SC025; #967240)	1/10	AB_2147926
Notch-1	Rabbit	Cell signaling (C37C7)	1/200	AB_1281343
Tbr1	Rabbit	Imgenex (imx-4950)	1/300	AB_1152080
Tbr2	Rabbit	Millipore (AB2283)	1/300	AB_10806889
CXCR4	Mouse	Biotechne (SC025; #967241)	1/10	AB_357073
N-Cadherin	Mouse	R&D (MAB13881)	1/200	AB_10973316
GFAP	Mouse	Millipore (MAB3402)	1/200	AB_94844
GFAP	Mouse	Millipore (IF03L)	1/200	AB_2294571
DCX	Rabbit	Cell Signaling (4604)	1/200	AB_561007
BIII-Tubulin	Rabbit	Covance (PRB-435P)	1/1000	AB_291637
Map2	Mouse	Chemicon (MAB3418)	1/200	AB_94856
Phospho H3	Mouse	Cell Signaling (9706S)	1/100	AB_331748
Cl. caspase-3	Rabbit	Cell Signaling (D175 #9661S)	1/200	AB_2341188
HIF1α	Mouse	Novus Bio (NB100-105)	1/200 (1/500)	AB_10001154
α-tubuline	Mouse	Sigma (DM1A)	(1/4000)	AB_477583
GFP	Goat	Abcam (AB6673)	1/200	AB_305643
JMY	Rabbit	Santa Cruz (M300)	1/200	AB_2280656
JMY	Rabbit	Sigma (HPA0433308)	1/500 (1/1000)	AB_10806502

JMY	Goat	Santa Cruz (L16)	1/500	AB_2265139
β-actin	Mouse	Sigma (A5316)	(1/2000)	AB_476743
Secondary antibody	**Isotype**	**Supplier (Cat number)**	**Working concentration IF (WB)**	
Goat anti-mouse 488	Goat	Invitrogen (Alexa Fluo A11001)	1/1000	AB_2534069
Goat anti-rabbit 488	Goat	Invitrogen (Alexa Fluo A11008)	1/1000	AB_143165
Goat anti-guinea 594	Goat	Invitrogen (Alexa Fluo A11076)	1/1000	AB_141930
Donkey anti-rat 488	Donkey	Invitrogen (Alexa Fluo A21208)	1/1000	AB_2535794
Donkey anti-goat 647	Donkey	Invitrogen (Alexa Fluo A21447)	1/1000	AB_141844
Chicken anti-mouse 488	Chicken	Invitrogen (Alexa Fluo A21200)	1/1000	AB_2535786
Chicken anti-goat 488	Chicken	Invitrogen (Alexa Fluo A21467)	1/1000	AB_10055703
Chicken anti-goat 594	Chicken	Invitrogen (Alexa Fluo A21468)	1/1000	AB_10563772
Goat anti-mouse Perox	Goat	Thermo Scientific (Pierce, #31430)	(1/5000)	AB_228307
Goat anti-rabbit Perox	Goat	Thermo Scientific (Pierce, #31466)	(1/5000)	AB_10960844

Supplementary Table S2. Primers used for quantative Real-Time PCR.

Primers	Couple	Sequences
Hs HIF1α	F1-60 R1-61	Forward: TGCAACATGGAAGGTATTGCAC Reverse: GCACCAAGCAGGTCATAGGT
Mm HIF1α	F1-214 R1-215	Forward: AGGATGAGTTCTGAACGTCGAAA Reverse: CTTCAGACTCTTTGCTTCGCC
Hs JMY	F2-58 R2-59	Forward: GCTTGGAACAGCGGAAACATGCAC Reverse: TCGCTTCTGTACCACCCCGCA
Hs JMY	F3-68 R3-69	Forward: GCCAAGAGAGACAGAGAAC Reverse: GCATGAGCTAGTCGTAATC
Hs JMY	F4-70 R4-71	Forward: CAAGAGAGACAGAGAACACTGGA Reverse: TGCATGAGCTAGTCGTAATCTGG
Mm JMY	F1-260 R1-261	Forward: TTCAAATTACAAGCCGTGCACCCG Reverse: AGCTGCCTTCTGGACCTTTACTGA
Hs GAPDH	F-28 R-29	Forward: AGAAGGCTGGGGCTCATTTG Reverse: AGGGGCCATCCACAGTCTTC
Hs GUS	F2-96 R2-97	Forward: ACCTCCAAGTATCCCAAGG Reverse: ACAGAAGTACAGACCGCTG
Mm GUS	F-191 R-192	Forward: GCCACAGCTGAATAGCCAGTT Reverse: CTCCTCACTGAACATGCGAGG

8. References

1. Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. Science. 1994;264:1145–8. https://doi.org/10.1126/science.8178174
2. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. Annu Rev Neurosci. 2009;32:149–84. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600
3. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. Neuron. 2011;70:687–702. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001
4. Rakic P. Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. Science. 1974;183:425–7. https://doi.org/10.1126/science.183.4123.425
5. Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature. 2001;409:714–20. https://doi.org/10.1038/35055553
6. Ayala R, Shu T, Tsai LH. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. Cell. 2007;128:29–43. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.021
7. Marin O, Valiente M, Ge X, Tsai LH. Guiding neuronal cell migrations. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2:a001834. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001834
8. Tan X, Shi SH. Neocortical neurogenesis and neuronal migration. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2013;2:443–59. https://doi.org/10.1002/wdev.88
9. Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. J Comp Neurol. 2001;435:406–17. https://doi.org/10.1002/cne.1040
10. Barkovich AJ. Developmental disorders of the midbrain and hindbrain. Front Neuroanat. 2012;6:7. https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00007
11. Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, et al. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. Stem Cells. 2006;24:739–47. https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0281
12. Belmadani A, Tran PB, Ren D, Miller RJ. Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation. J Neurosci. 2006;26:3182–91. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0156-06.2006
13. Leong SY, Turnley AM. Regulation of adult neural precursor cell migration. Neurochem Int. 2011;59:382–93. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.12.024

14. Christie KJ, Turnley AM. Regulation of endogenous neural stem/progenitor cells for neural repair-factors that promote neurogenesis and gliogenesis in the normal and damaged brain. Front Cell Neurosci. 2012;6:70. https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00070
15. Shapiro LA. Altered Hippocampal Neurogenesis during the First 7 Days after a Fluid Percussion Traumatic Brain Injury. Cell Transplant. 2017;26:1314–8. https://doi.org/10.1177/0963689717714099
16. Ibrahim S, Hu W, Wang X, Gao X, He C, Chen J. Traumatic Brain Injury Causes Aberrant Migration of Adult-Born Neurons in the Hippocampus. Sci Rep. 2016;6:21793. https://doi.org/10.1038/srep21793
17. Geribaldi-Doldan N, Carrascal L, Perez-Garcia P, Oliva-Montero JM, Pardillo-Diaz R, Dominguez-Garcia S, et al. Migratory Response of Cells in Neurogenic Niches to Neuronal Death: The Onset of Harmonic Repair? Int J Mol Sci. 2023;24. https://doi.org/10.3390/ijms24076587
18. Sukumaran SK, Paul P, Guttal V, Holla B, Vemula A, Bhatt H, et al. Abnormalities in the migration of neural precursor cells in familial bipolar disorder. Model Mech. 2022;15. https://doi.org/10.1242/dmm.049526
19. Ferrer I, Alcantara S, Marti E. A four-layered “lissencephalic” cortex induced by prenatal X-irradiation in the rat. Neuropathol Appl Neurobiol. 1993;19:74–81.
20. Devi PU, Baskar R, Hande MP. Effect of exposure to low-dose gamma radiation during late organogenesis in the mouse fetus. Radiat Res. 1994;138:133–8.
21. Hossain M, Chetana M, Devi PU. Late effect of prenatal irradiation on the hippocampal histology and brain weight in adult mice. Int J Dev Neurosci. 2005;23:307–13. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2005.01.006
22. Verreet T, Rangarajan JR, Quintens R, Verslegers M, Lo AC, Govaerts K, et al. Persistent Impact of In utero Irradiation on Mouse Brain Structure and Function Characterized by MR Imaging and Behavioral Analysis. Front Behav Neurosci. 2016;10:83. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00083
23. Verreet T, Verslegers M, Quintens R, Baatout S, Benotmane MA. Current Evidence for Developmental, Structural, and Functional Brain Defects following Prenatal Radiation Exposure. Neural Plast. 2016;2016:1243527. https://doi.org/10.1155/2016/1243527
24. Kempf SJ, Casciati A, Buratovic S, Janik D, von Toerne C, Ueffing M, et al. The cognitive defects of neonatally irradiated mice are accompanied by changed synaptic plasticity, adult neurogenesis and neuroinflammation. Mol Neurodegener. 2014;9:57. https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-57

25. Otake M, Schull WJ. Radiation-related brain damage and growth retardation among the prenatally exposed atomic bomb survivors. Int J Radiat Biol. 1998;74:159–71. https://doi.org/10.1080/095530098141555
26. Hall P, Adami HO, Trichopoulos D, Pedersen NL, Lagiou P, Ekbom A, et al. Effect of low doses of ionising radiation in infancy on cognitive function in adulthood: Swedish population based cohort study. BMJ. 2004;328:19. https://doi.org/10.1136/bmj.328.7430.19%2520328/7430/19%2520%255Bpii%255D
27. Fushiki S, Hyodo-Taguchi Y, Kinoshita C, Ishikawa Y, Hirobe T. Short- and long-term effects of low-dose prenatal X-irradiation in mouse cerebral cortex, with special reference to neuronal migration. Acta Neuropathol. 1997;93:443–9.
28. Barazzuol L, Hopkins SR, Ju L, Jeggo PA. Distinct response of adult neural stem cells to low versus high dose ionising radiation. DNA Repair Amst. 2019;76:70–5. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.01.004
29. Licursi V, Anzellotti S, Favaro J, Sineri S, Carucci N, Cundari E, et al. X-ray irradiated cultures of mouse cortical neural stem/progenitor cells recover cell viability and proliferation with dose-dependent kinetics. Sci Rep. 2020;10:6562. https://doi.org/10.1038/s41598-020-63348-2
30. Nowak E, Etienne O, Millet P, Lages CS, Mathieu C, Mouthon MA, et al. Radiation-induced H2AX phosphorylation and neural precursor apoptosis in the developing brain of mice. Radiat Res. 2006;165:155–64. https://doi.org/RR3496%2520%255Bpii%255D
31. Etienne O, Roque T, Haton C, Boussin FD. Variation of radiation-sensitivity of neural stem and progenitor cell populations within the developing mouse brain. Int J Radiat Biol. 2012;88:694–702. https://doi.org/10.3109/09553002.2012.710927
32. Acharya MM, Lan ML, Kan VH, Patel NH, Giedzinski E, Tseng BP, et al. Consequences of ionizing radiation-induced damage in human neural stem cells. Free Radic Biol Med. 2010;49:1846–55. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.021
33. Kanzawa T, Iwado E, Aoki H, Iwamaru A, Hollingsworth EF, Sawaya R, et al. Ionizing radiation induces apoptosis and inhibits neuronal differentiation in rat neural stem cells via the c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) pathway. Oncogene. 2006;25:3638–48. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209414
34. Bery A, Etienne O, Mouton L, Mokrani S, Granotier-Beckers C, Gauthier LR, et al. XLF/Cernunnos loss impairs mouse brain development by altering symmetric proliferative divisions of neural progenitors. Cell Rep. 2023;42:112342. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112342

35. Wei LC, Ding YX, Liu YH, Duan L, Bai Y, Shi M, et al. Low-dose radiation stimulates Wnt/beta-catenin signaling, neural stem cell proliferation and neurogenesis of the mouse hippocampus in vitro and in vivo. Curr Alzheimer Res. 2012;9:278–89. https://doi.org/10.2174/156720512800107627

36. Chen H, Goodus MT, de Toledo SM, Azzam EI, Levison SW, Souayah N. Ionizing Radiation Perturbs Cell Cycle Progression of Neural Precursors in the Subventricular Zone Without Affecting Their Long-Term Self-Renewal. ASN Neuro. 2015;7. https://doi.org/10.1177/1759091415578026

37. Loras A, Gonzalez-Bonet LG, Gutierrez-Arroyo JL, Martinez-Cadenas C, Marques-Torrejon MA. Neural Stem Cells as Potential Glioblastoma Cells of Origin. Life Basel. 2023;13. https://doi.org/10.3390/life13040905

38. Bakhshinyan D, Savage N, Salim SK, Venugopal C, Singh SK. The Strange Case of Jekyll and Hyde: Parallels Between Neural Stem Cells and Glioblastoma-Initiating Cells. Front Oncol. 2020;10:603738. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.603738

39. Zarco N, Norton E, Quinones-Hinojosa A, Guerrero-Cazares H. Overlapping migratory mechanisms between neural progenitor cells and brain tumor stem cells. Cell Mol Life Sci. 2019;76:3553–70. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03149-7

40. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. Genes Dev. 2015;29:1203–17. https://doi.org/10.1101/gad.261982.115

41. Venkataramani V, Yang Y, Schubert MC, Reyhan E, Tetzlaff SK, Wissmann N, et al. Glioblastoma hijacks neuronal mechanisms for brain invasion. Cell. 2022;185:2899-2917 e31. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.054

42. Gauthier LR, Saati M, Bensalah-Pigeon H, Ben M'Barek K, Gitton-Quent O, Bertrand R, et al. The HIF1alpha/JMY pathway promotes glioblastoma stem-like cell invasiveness after irradiation. Sci Rep. 2020;10:18742. https://doi.org/10.1038/s41598-020-75300-5

43. Shikama N, Lee CW, France S, Delavaine L, Lyon J, Krstic-Demonacos M, et al. A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response. Mol Cell. 1999;4:365–76.

44. Firat-Karalar EN, Hsiue PP, Welch MD. The actin nucleation factor JMY is a negative regulator of neuritogenesis. Mol Biol Cell. 2011;22:4563–74. https://doi.org/10.1091/mbc.E11-06-0585

45. Azevedo MM, Domingues HS, Cordelieres FP, Sampaio P, Seixas AI, Relvas JB. Jmy regulates oligodendrocyte differentiation via modulation of actin cytoskeleton dynamics. Glia. 2018;66:1826–44. https://doi.org/10.1002/glia.23342

46. Kuhne M, Zepernick AL, Qualmann B, Kessels MM, Izadi-Seitz M. JMY powers dendritogenesis and is regulated by CaM revealing a general, critical principle in neuromorphogenesis. Commun Biol. 2025;8:784. https://doi.org/10.1038/s42003-025-08208-3

47. Sun Y, Pollard S, Conti L, Toselli M, Biella G, Parkin G, et al. Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture. Mol Cell Neurosci. 2008;38:245–58. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.02.014

48. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell. 1990;60:585–95. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90662-x

49. Houle J, Fedoroff S. Temporal relationship between the appearance of vimentin and neural tube development. Brain Res. 1983;285:189–95. https://doi.org/10.1016/0165-3806(83)90051-2

50. MacNicol AM, Wilczynska A, MacNicol MC. Function and regulation of the mammalian Musashi mRNA translational regulator. Biochem Soc Trans. 2008;36:528–30. https://doi.org/10.1042/BST0360528

51. Barraud P, Thompson L, Kirik D, Bjorklund A, Parmar M. Isolation and characterization of neural precursor cells from the Sox1-GFP reporter mouse. Eur J Neurosci. 2005;22:1555–69. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04352.x

52. Ellis P, Fagan BM, Magness ST, Hutton S, Taranova O, Hayashi S, et al. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. Dev Neurosci. 2004;26:148–65. https://doi.org/10.1159/000082134

53. Ni HT, Hu S, Sheng WS, Olson JM, Cheeran MC, Chan AS, et al. High-level expression of functional chemokine receptor CXCR4 on human neural precursor cells. Brain Res Dev Brain Res. 2004;152:159–69. https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2004.06.015

54. Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, et al. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. Proc Natl Acad Sci U A. 2004;101:18117–22. https://doi.org/10.1073/pnas.0408258102

55. Yoon K, Nery S, Rutlin ML, Radtke F, Fishell G, Gaiano N. Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors. J Neurosci. 2004;24:9497–506. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0993-04.2004

56. Zhang J, Woodhead GJ, Swaminathan SK, Noles SR, McQuinn ER, Pisarek AJ, et al. Cortical neural precursors inhibit their own differentiation via N-cadherin maintenance of beta-catenin signaling. Dev Cell. 2010;18:472–9. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.12.025

57. Walker TL, Yasuda T, Adams DJ, Bartlett PF. The doublecortin-expressing population in the developing and adult brain contains multipotential precursors in addition to neuronal-lineage cells. J Neurosci. 2007;27:3734–42. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5060-06.2007

58. Kaneko N, Sawada M, Sawamoto K. Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. J Neurochem. 2017;141:835–47. https://doi.org/10.1111/jnc.14002

59. Zhang RL, LeTourneau Y, Gregg SR, Wang Y, Toh Y, Robin AM, et al. Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: a study of dynamic migratory and proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone. J Neurosci. 2007;27:3157–62. https://doi.org/27/12/3157%2520%255Bpii%255D%252010.1523/JNEUROSCI.4969-06.2007

60. Dizon ML, Shin L, Sundholm-Peters NL, Kang E, Szele FG. Subventricular zone cells remain stable in vitro after brain injury. Neuroscience. 2006;142:717–25. https://doi.org/S0306-4522(06)00879-7%2520%255Bpii%255D%252010.1016/j.neuroscience.2006.06.050

61. Durbec P, Franceschini I, Lazarini F, Dubois-Dalcq M. In vitro migration assays of neural stem cells. Methods Mol Biol. 2008;438:213–25. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-133-8_18

62. Moors M, Rockel TD, Abel J, Cline JE, Gassmann K, Schreiber T, et al. Human neurospheres as three-dimensional cellular systems for developmental neurotoxicity testing. Env Health Perspect. 2009;117:1131–8. https://doi.org/10.1289/ehp.0800207

63. Santiago MF, Liour SS, Mendez-Otero R, Yu RK. Glial-guided neuronal migration in P19 embryonal carcinoma stem cell aggregates. J Neurosci Res. 2005;81:9–20. https://doi.org/10.1002/jnr.20532

64. Tegenge MA, Rockel TD, Fritsche E, Bicker G. Nitric oxide stimulates human neural progenitor cell migration via cGMP-mediated signal transduction. Cell Mol Life Sci. 2011;68:2089–99. https://doi.org/10.1007/s00018-010-0554-9

65. Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. Cell. 2008;132:487–98. https://doi.org/S0092-8674(08)00054-8%2520%255Bpii%255D%252010.1016/j.cell.2007.12.033

66. Fujiwara S, Nakagawa K, Harada H, Nagato S, Furukawa K, Teraoka M, et al. Silencing hypoxia-inducible factor-1alpha inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. Int J Oncol. 2007;30:793–802.

67. Joseph JV, Conroy S, Pavlov K, Sontakke P, Tomar T, Eggens-Meijer E, et al. Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1alpha-ZEB1 axis. Cancer Lett. 2015;359:107–16. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.01.010

68. Kim YH, Yoo KC, Cui YH, Uddin N, Lim EJ, Kim MJ, et al. Radiation promotes malignant progression of glioma cells through HIF-1alpha stabilization. Cancer Lett. 2014;354:132–41. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.07.048

69. Zhang Y, Liu Q, Wang F, Ling EA, Liu S, Wang L, et al. Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1alpha. J Pineal Res. 2013;55:121–30. https://doi.org/10.1111/jpi.12052

70. Mendez O, Zavadil J, Esencay M, Lukyanov Y, Santovasi D, Wang SC, et al. Knock down of HIF-1alpha in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres. Mol Cancer. 2010;9:133. https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-133

71. Chandel NS, Schumacker PT, Arch RH. Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. J Biol Chem. 2001;276:42728–36. https://doi.org/10.1074/jbc.M103074200

72. Harada H, Itasaka S, Kizaka-Kondoh S, Shibuya K, Morinibu A, Shinomiya K, et al. The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1alpha protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors. J Biol Chem. 2009;284:5332–42. https://doi.org/10.1074/jbc.M806653200

73. Kim WY, Oh SH, Woo JK, Hong WK, Lee HY. Targeting heat shock protein 90 overrides the resistance of lung cancer cells by blocking radiation-induced stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha. Cancer Res. 2009;69:1624–32. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0505

74. Lu H, Liang K, Lu Y, Fan Z. The anti-EGFR antibody cetuximab sensitizes human head and neck squamous cell carcinoma cells to radiation in part through inhibiting radiation-induced upregulation of HIF-1alpha. Cancer Lett. 2012;322:78–85. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.02.012

75. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. Cancer Cell. 2004;5:429–41.

76. Nakajima A, Endo H, Okuyama H, Kiyohara Y, Kimura T, Kamiura S, et al. Radiation sensitivity assay with a panel of patient-derived spheroids of small cell carcinoma of the cervix. Int J Cancer. 2015;136:2949–60. https://doi.org/10.1002/ijc.29349

77. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. J Biol Chem. 1996;271:32253–9.

78. Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. Blood. 1993;82:3610–5.
79. Chun YS, Yeo EJ, Park JW. Versatile pharmacological actions of YC-1: anti-platelet to anticancer. Cancer Lett. 2004;207:1–7.
80. Coutts AS, Pires IM, Weston L, Buffa FM, Milani M, Li JL, et al. Hypoxia-driven cell motility reflects the interplay between JMY and HIF-1alpha. Oncogene. 2011;30:4835–42. https://doi.org/10.1038/onc.2011.188
81. Coutts AS, Weston L, La Thangue NB. A transcription co-factor integrates cell adhesion and motility with the p53 response. Proc Natl Acad Sci U A. 2009;106:19872–7. https://doi.org/10.1073/pnas.0906785106
82. Zuchero JB, Coutts AS, Quinlan ME, Thangue NB, Mullins RD. p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. Nat Cell Biol. 2009;11:451–9. https://doi.org/10.1038/ncb1852
83. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9:446–54. https://doi.org/10.1038/nrm2406
84. Hurd TR, DeGennaro M, Lehmann R. Redox regulation of cell migration and adhesion. Trends Cell Biol. 2012;22:107–15. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.11.002
85. Shi D, Li X, Chen H, Che N, Zhou S, Lu Z, et al. High level of reactive oxygen species impaired mesenchymal stem cell migration via overpolymerization of F-actin cytoskeleton in systemic lupus erythematosus. Pathol Biol Paris. 2014;62:382–90. https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.07.009
86. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:4350965. https://doi.org/10.1155/2016/4350965
87. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. Proc Natl Acad Sci U A. 1998;95:11715–20. https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11715
88. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. J Biol Chem. 2000;275:25130–8. https://doi.org/10.1074/jbc.M001914200
89. Simon MC. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxic HIF alpha stabilization. Adv Exp Med Biol. 2006;588:165–70. https://doi.org/10.1007/978-0-387-34817-9_15

90. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Cell Mol Life Sci. 2003;60:6–20. https://doi.org/10.1007/s000180300001

91. Dringen R, Hamprecht B. N-acetylcysteine, but not methionine or 2-oxothiazolidine-4-carboxylate, serves as cysteine donor for the synthesis of glutathione in cultured neurons derived from embryonal rat brain. Neurosci Lett. 1999;259:79–82.

92. Jayalakshmi K, Sairam M, Singh SB, Sharma SK, Ilavazhagan G, Banerjee PK. Neuroprotective effect of N-acetyl cysteine on hypoxia-induced oxidative stress in primary hippocampal culture. Brain Res. 2005;1046:97–104. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.03.054

93. Rodriguez-Martin E, Casarejos MJ, Canals S, de Bernardo S, Mena MA. Thiolic antioxidants protect from nitric oxide-induced toxicity in fetal midbrain cultures. Neuropharmacology. 2002;43:877–88. https://doi.org/10.1016/s0028-3908(02)00150-8

94. Subramanian J, Savage JC, Tremblay ME. Synaptic Loss in Alzheimer's Disease: Mechanistic Insights Provided by Two-Photon in vivo Imaging of Transgenic Mouse Models. Front Cell Neurosci. 2020;14:592607. https://doi.org/10.3389/fncel.2020.592607

95. Guerrini R, Dobyns WB. Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. Lancet Neurol. 2014;13:710–26. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70040-7

96. Represa A. Why Malformations of Cortical Development Cause Epilepsy. Front Neurosci. 2019;13:250. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00250

97. Cho KO, Lybrand ZR, Ito N, Brulet R, Tafacory F, Zhang L, et al. Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. Nat Commun. 2015;6:6606. https://doi.org/10.1038/ncomms7606

98. Rola R, Raber J, Rizk A, Otsuka S, VandenBerg SR, Morhardt DR, et al. Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. Exp Neurol. 2004;188:316–30. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.05.005%2520S0014488604001748%2520%255Bpii%255D

99. Berden L, Rajan N, Mbouombouo Mfossa AC, De Bie I, Etlioglu E, Benotmane MA, et al. Interneuron migration impairment and brain region-specific DNA damage response following irradiation during early neurogenesis in mice. Cell Mol Life Sci. 2025;82:118. https://doi.org/10.1007/s00018-025-05643-7

100. Francis F, Cappello S. Neuronal migration and disorders - an update. Curr Opin Neurobiol. 2021;66:57–68. https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.10.002

101. Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. Curr Opin Cell Biol. 2009;21:894–9. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.08.005

102. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. Science. 2001;292:468–72. https://doi.org/10.1126/science.1059796

103. Konirova J, Cupal L, Jarosova S, Michaelidesova A, Vachelova J, Davidkova M, et al. Differentiation Induction as a Response to Irradiation in Neural Stem Cells In Vitro. Cancers Basel. 2019;11. https://doi.org/10.3390/cancers11070913

104. Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. Nat Med. 2002;8:955–62. https://doi.org/10.1038/nm749%2520nm749%2520%255Bpii%255D

105. Schneider L, Pellegatta S, Favaro R, Pisati F, Roncaglia P, Testa G, et al. DNA damage in mammalian neural stem cells leads to astrocytic differentiation mediated by BMP2 signaling through JAK-STAT. Stem Cell Rep. 2013;1:123–38. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.06.004

106. Bellinzona M, Gobbel GT, Shinohara C, Fike JR. Apoptosis is induced in the subependyma of young adult rats by ionizing irradiation. Neurosci Lett. 1996;208:163–6. https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12572-6

107. Daynac M, Chicheportiche A, Pineda JR, Gauthier LR, Boussin FD, Mouthon MA. Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABAAR signaling following radiation damage. Stem Cell Res. 2013;11:516–28. https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.02.008

108. Pereira Dias G, Hollywood R, Bevilaqua MC, da Luz AC, Hindges R, Nardi AE, et al. Consequences of cancer treatments on adult hippocampal neurogenesis: implications for cognitive function and depressive symptoms. Neuro Oncol. 2014;16:476–92. https://doi.org/10.1093/neuonc/not321

109. Evtouchenko L, Studer L, Spenger C, Dreher E, Seiler RW. A mathematical model for the estimation of human embryonic and fetal age. Cell Transpl. 1996;5:453–64. https://doi.org/10.1016/0963-6897(96)00079-6

110. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. “Green mice” as a source of ubiquitous green cells. FEBS Lett. 1997;407:313–9. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00313-x

111. Ferent J, Cochard L, Faure H, Taddei M, Hahn H, Ruat M, et al. Genetic activation of Hedgehog signaling unbalances the rate of neural stem cell renewal by increasing symmetric divisions. Stem Cell Rep. 2014;3:312–23. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.016

112. Toullec A, Buard V, Rannou E, Tarlet G, Guipaud O, Robine S, et al. HIF-1alpha Deletion in the Endothelium, but Not in the Epithelium, Protects From Radiation-Induced Enteritis. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2018;5:15–30. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.08.001

113. Pineda JR, Daynac M, Chicheportiche A, Cebrian-Silla A, Sii Felice K, Garcia-Verdugo JM, et al. Vascular-derived TGF-β increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain. EMBO Mol Med. 2013;5:548–62. https://doi.org/10.1002/emmm.201202197

114. Braun H, Bühnemann C, Neumann J, Reymann KG. Preparation of a tissue-like cortical primary culture from embryonic rats using Matrigel and serum free Start V Medium. J Neurosci Methods. 2006;157:32–8. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.03.019

115. Gerby B, Armstrong F, de la Grange PB, Medyouf H, Calvo J, Verhoeyen E, et al. Optimized gene transfer into human primary leukemic T cell with NOD-SCID/leukemia-initiating cell activity. Leukemia. 2010;24:646–9. https://doi.org/10.1038/leu.2009.235

116. Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. Nat Methods. 2007;4:251–6. https://doi.org/10.1038/nmeth1010

117. Gauthier LR, Granotier C, Hoffschir F, Etienne O, Ayouaz A, Desmaze C, et al. Rad51 and DNA-PKcs are involved in the generation of specific telomere aberrations induced by the quadruplex ligand 360A that impair mitotic cell progression and lead to cell death. Cell Mol Life Sci. 2011; https://doi.org/10.1007/s00018-011-0767-6

118. Gorelik R, Gautreau A. Quantitative and unbiased analysis of directional persistence in cell migration. Nat Protoc. 2014;9:1931–43. https://doi.org/10.1038/nprot.2014.131

119. Silvestre DC, Pineda JR, Hoffschir F, Studler JM, Mouthon MA, Pflumio F, et al. Alternative lengthening of telomeres in human glioma stem cells. Stem Cells. 2011;29:440–51. https://doi.org/10.1002/stem.600

120. Jeitany M, Pineda JR, Liu Q, Porreca RM, Hoffschir F, Desmaze C, et al. A preclinical mouse model of glioma with an alternative mechanism of telomere maintenance (ALT). Int J Cancer. 2015;136:1546–58. https://doi.org/10.1002/ijc.29171

121. Dang I, Gorelik R, Sousa-Blin C, Derivery E, Guérin C, Linkner J, et al. Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration. Nature. 2013;503:281–4. https://doi.org/10.1038/nature12611

122. Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. Clonogenic cell survival assay. Methods Mol Med. 2005;110:21–8. https://doi.org/10.1385/1-59259-869-2:021

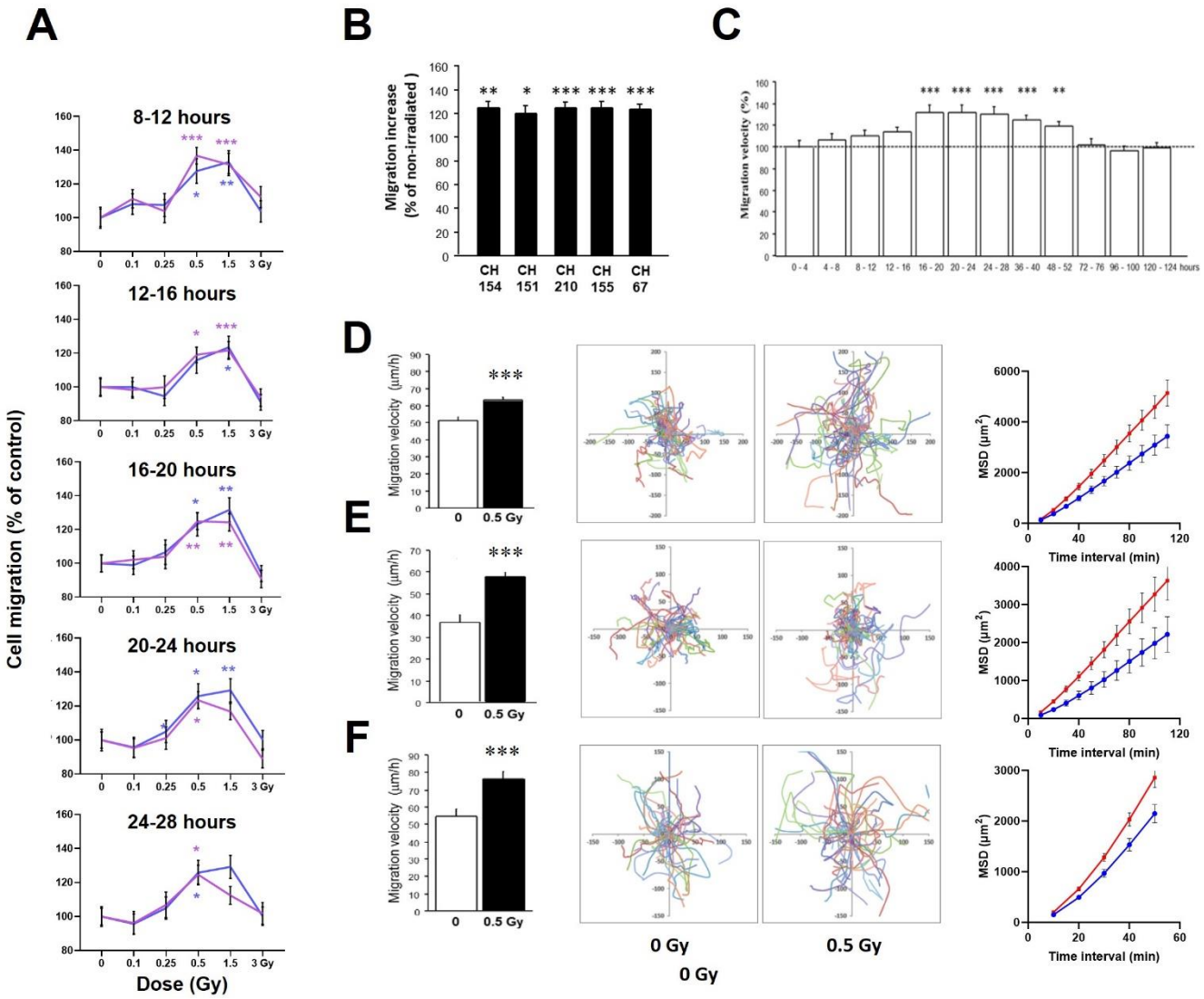

A
8-12 hours
12-16 hours
16-20 hours
20-24 hours
24-28 hours
Cell migration (% of control)
Dose (Gy)
B
Migration increase (% of non-irradiated)
CH 154
CH 151
CH 210
CH 155
CH 67
C
Migration velocity (%)
0 - 4
4 - 8
8 - 12
12 - 16
16 - 20
20 - 24
24 - 28
36 - 40
48 - 52
72 - 76
96 - 100
120 - 124 hours
D
E
F
Migration velocity (µm/h)
MSD (µm²)
Time interval (min)
0 Gy
0.5 Gy
G
Migration velocity (µm/h)
Accumulated distance (µm)
Directional persistence
ns
H
Neurosphere diameter (AU)
4 hours

Figure 1

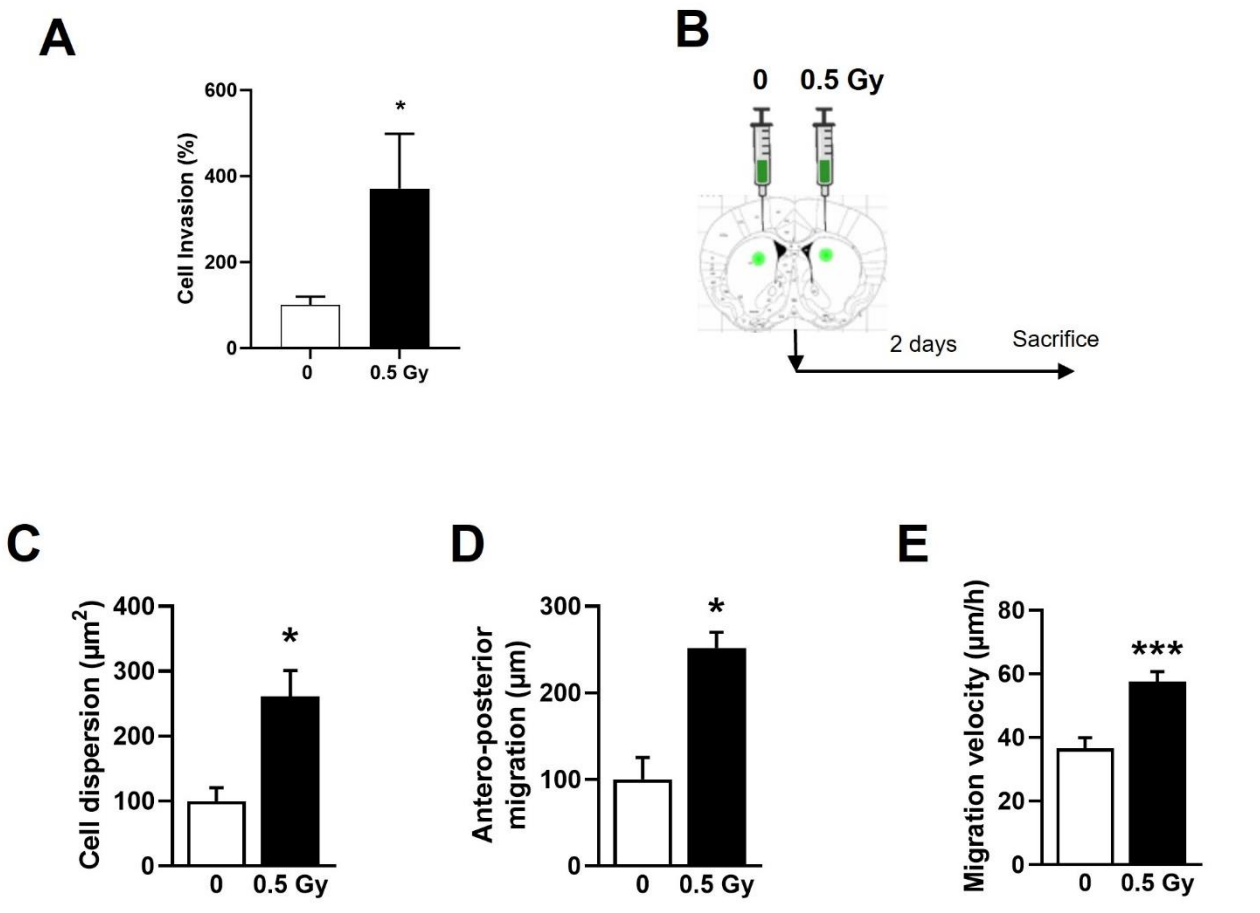

A
Cell Invasion (%)
600
400
200
0
*
0
0.5 Gy
B
0
0.5 Gy
2 days
Sacrifice
C
Cell dispersion (µm²)
400
300
200
100
0
*
0
0.5 Gy
D
Antero-posterior migration (µm)
300
200
100
0
*
0
0.5 Gy
E
Migration velocity (µm/h)
80
60
40
20
0
***
0
0.5 Gy

Figure 2

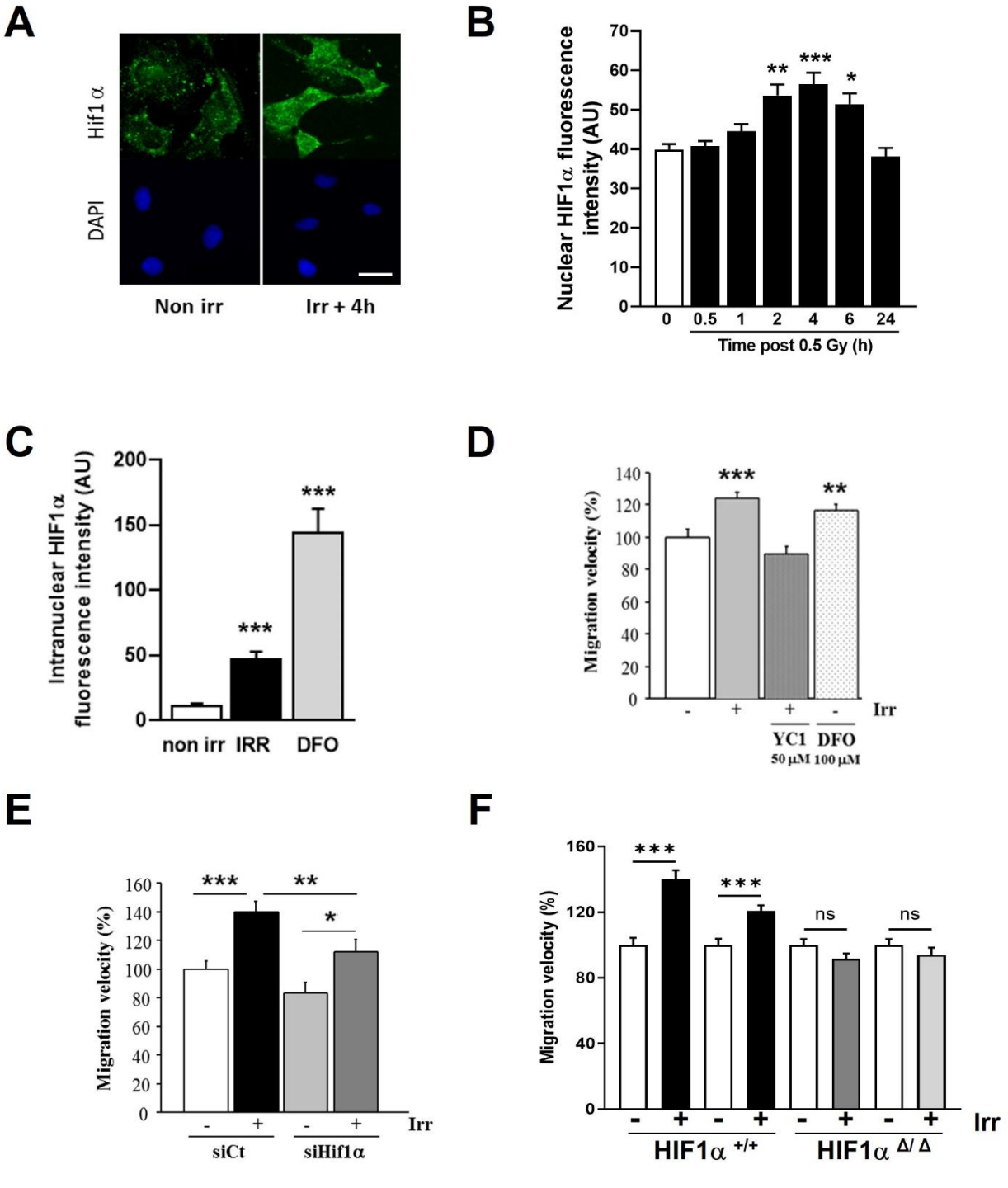

A
Hif1 α
DAPI
Non irr
Irr + 4h
B
Nuclear HIF1α fluorescence intensity (AU)
70
60
50
40
30
20
10
0
**
***
*
0
0.5
1
2
4
6
24
Time post 0.5 Gy (h)
C
Intranuclear HIF1α fluorescence intensity (AU)
200
150
100
50
0
***
***
non irr
IRR
DFO
D
Migration velocity (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
***
**
-
+
+
-
Irr
YC1
50 µM
DFO
100 µM
E
Migration velocity (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
***
**
*
-
+
-
+
Irr
siCt
siHif1α
F
Migration velocity (%)
160
120
80
40
0
***
***
ns
ns
-
+
-
+
-
+
-
+
Irr
HIF1α +/+
HIF1α Δ/Δ

Figure 3

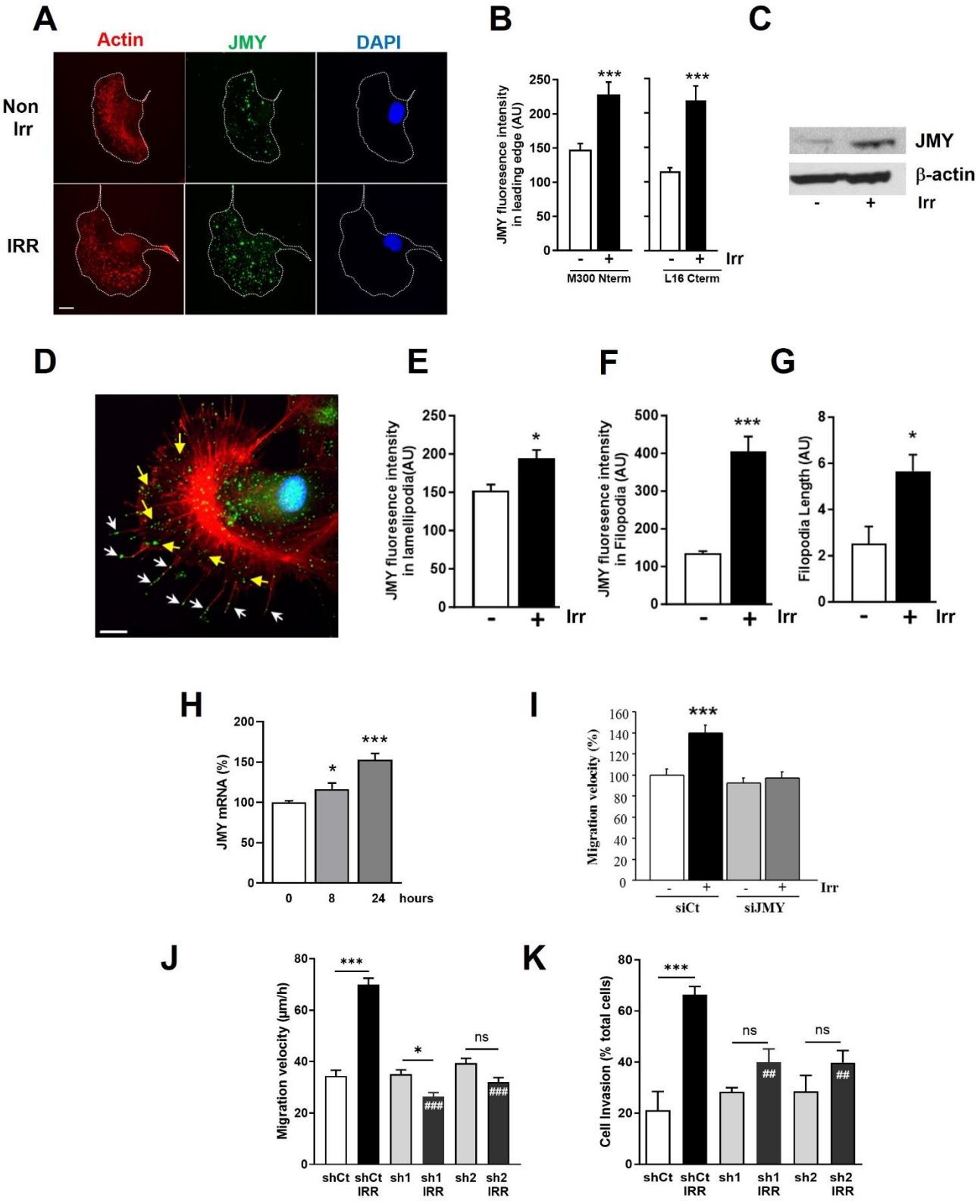

A
Actin
JMY
DAPI
Non Irr
IRR
B
JMY fluorescence intensity in leading edge (AU)
***
***
M300 Nterm
L16 Cterm
Irr
C
JMY
β-actin
Irr
D
E
JMY fluorescence intensity in lamellipodia(AU)
F
JMY fluorescence intensity in Filopodia (AU)
G
Filopodia Length (AU)
H
JMY mRNA (%)
0
8
24
hours
I
Migration velocity (%)
siCt
siJMY
J
Migration velocity (µm/h)
shCt
shCt IRR
sh1
sh1 IRR
sh2
sh2 IRR
K
Cell Invasion (% total cells)

Figure 4

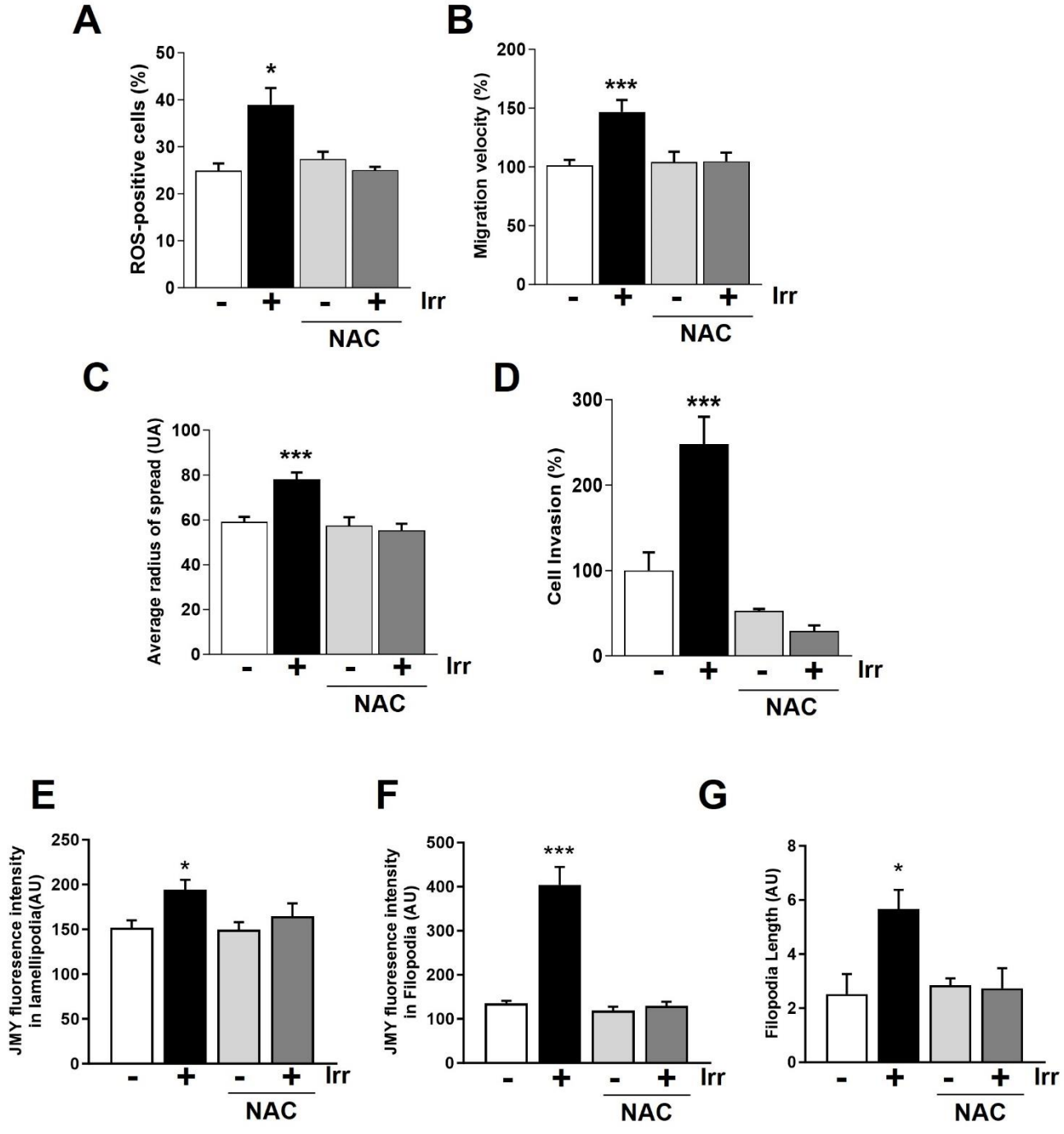
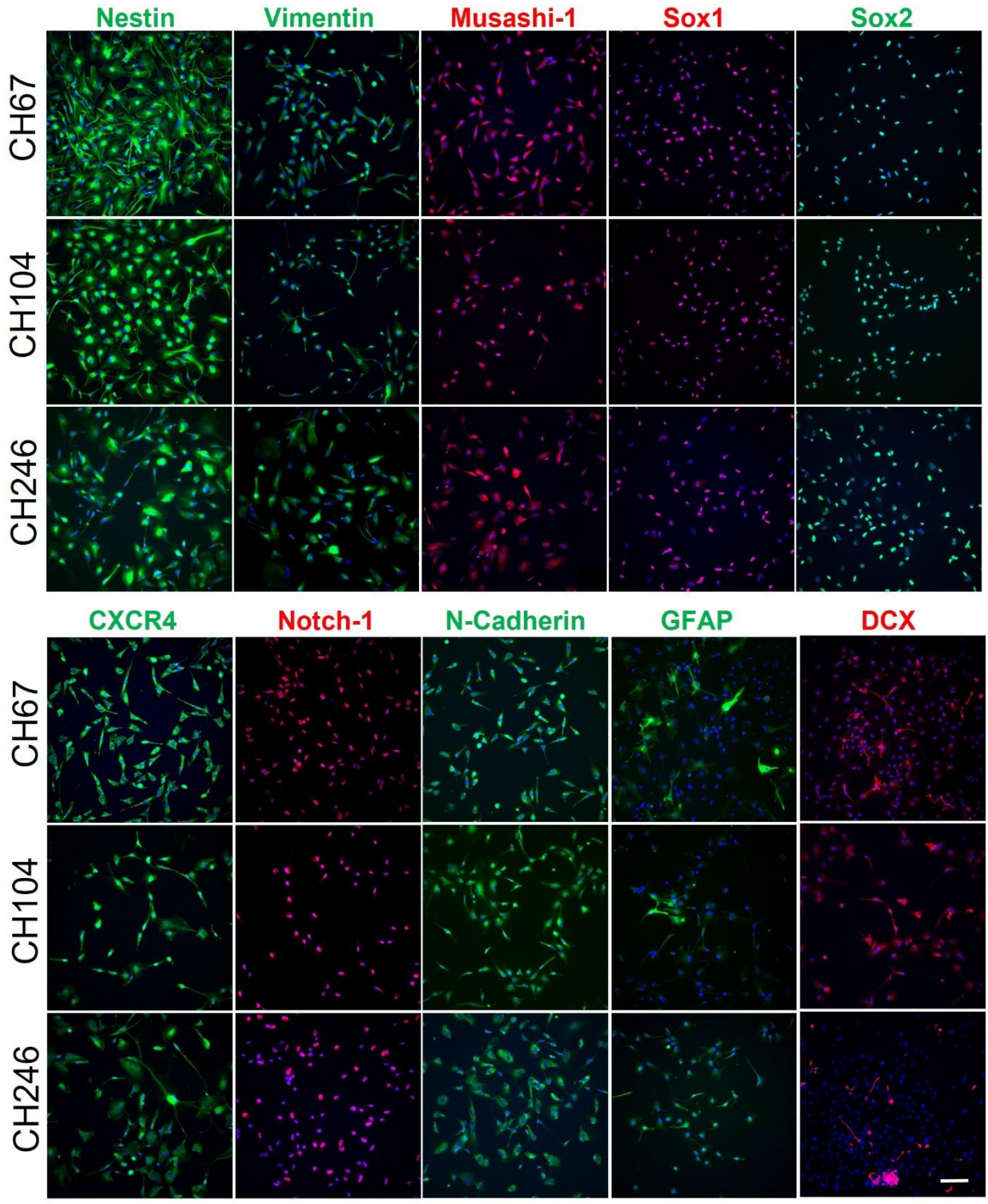
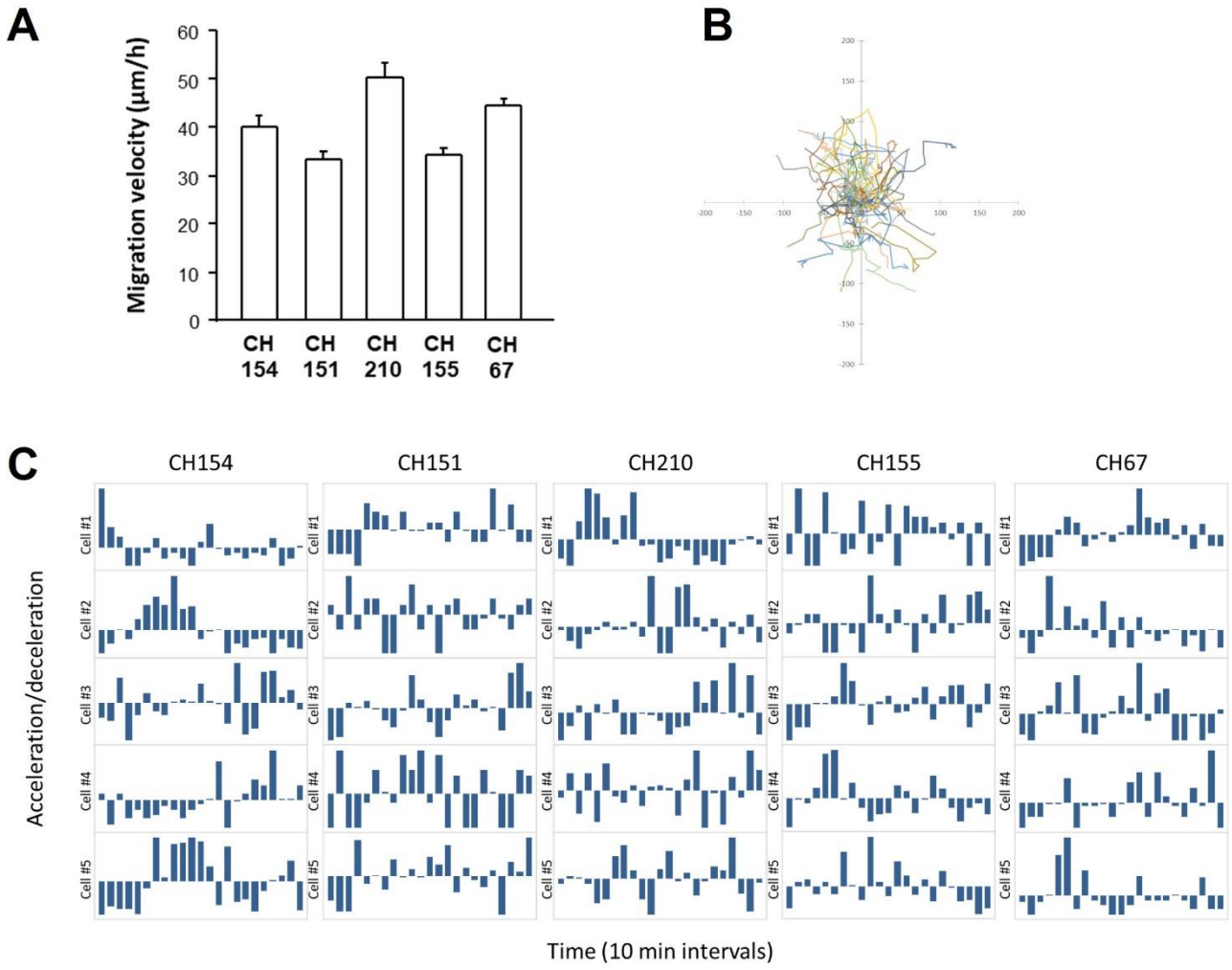

A
ROS-positive cells (%)
50
40
30
20
10
0
*
- + - +
Irr
NAC
B
Migration velocity (%)
200
150
100
50
0
***
- + - +
Irr
NAC
C
Average radius of spread (UA)
100
80
60
40
20
0
***
- + - +
Irr
NAC
D
Cell Invasion (%)
300
200
100
0
***
- + - +
Irr
NAC
E
JMY fluoresence intensity in lamellipodia(AU)
250
200
150
100
50
0
*
- + - +
Irr
NAC
F
JMY fluoresence intensity in Filopodia (AU)
500
400
300
200
100
0
***
- + - +
Irr
NAC
G
Filopodia Length (AU)
8
6
4
2
0
*
- + - +
Irr
NAC

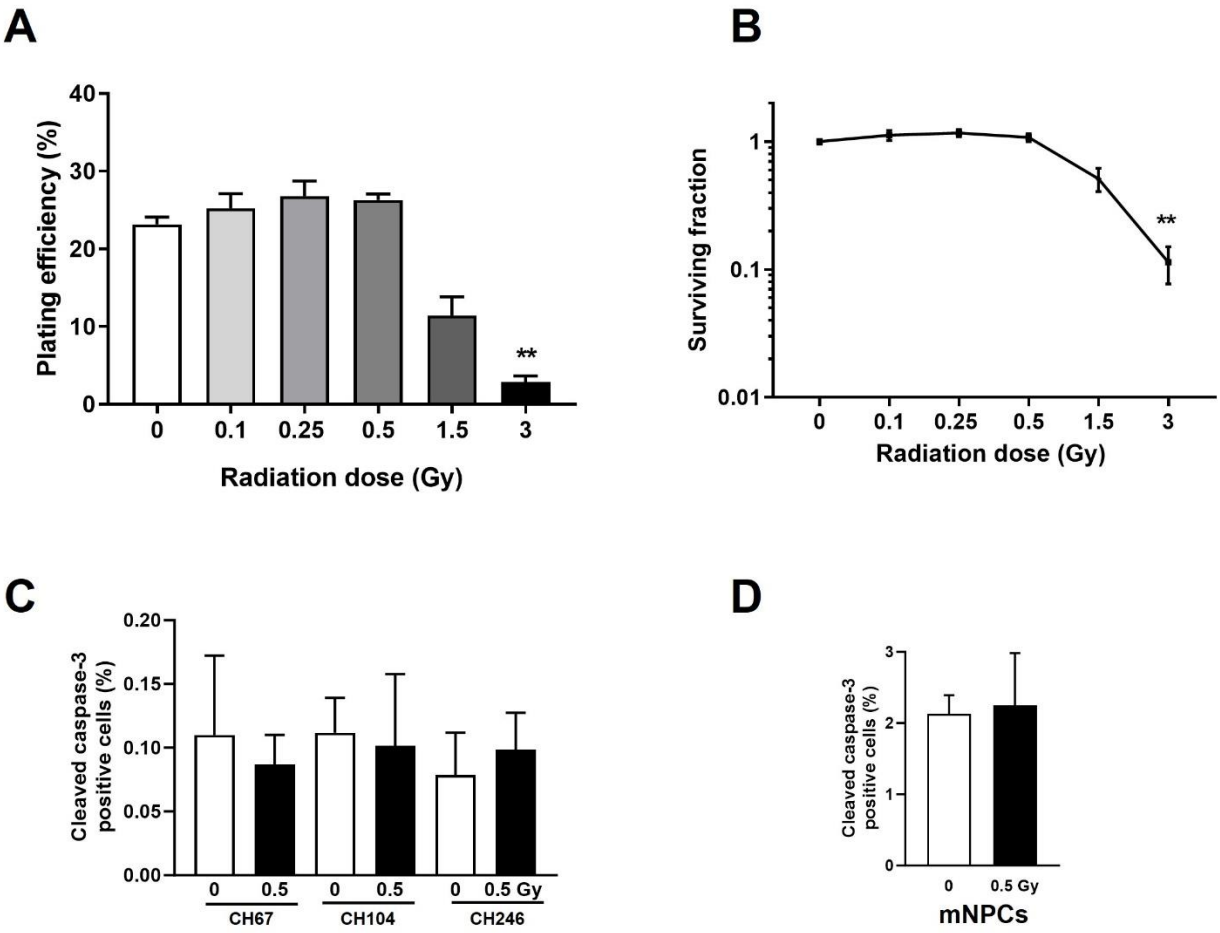
Figure 5



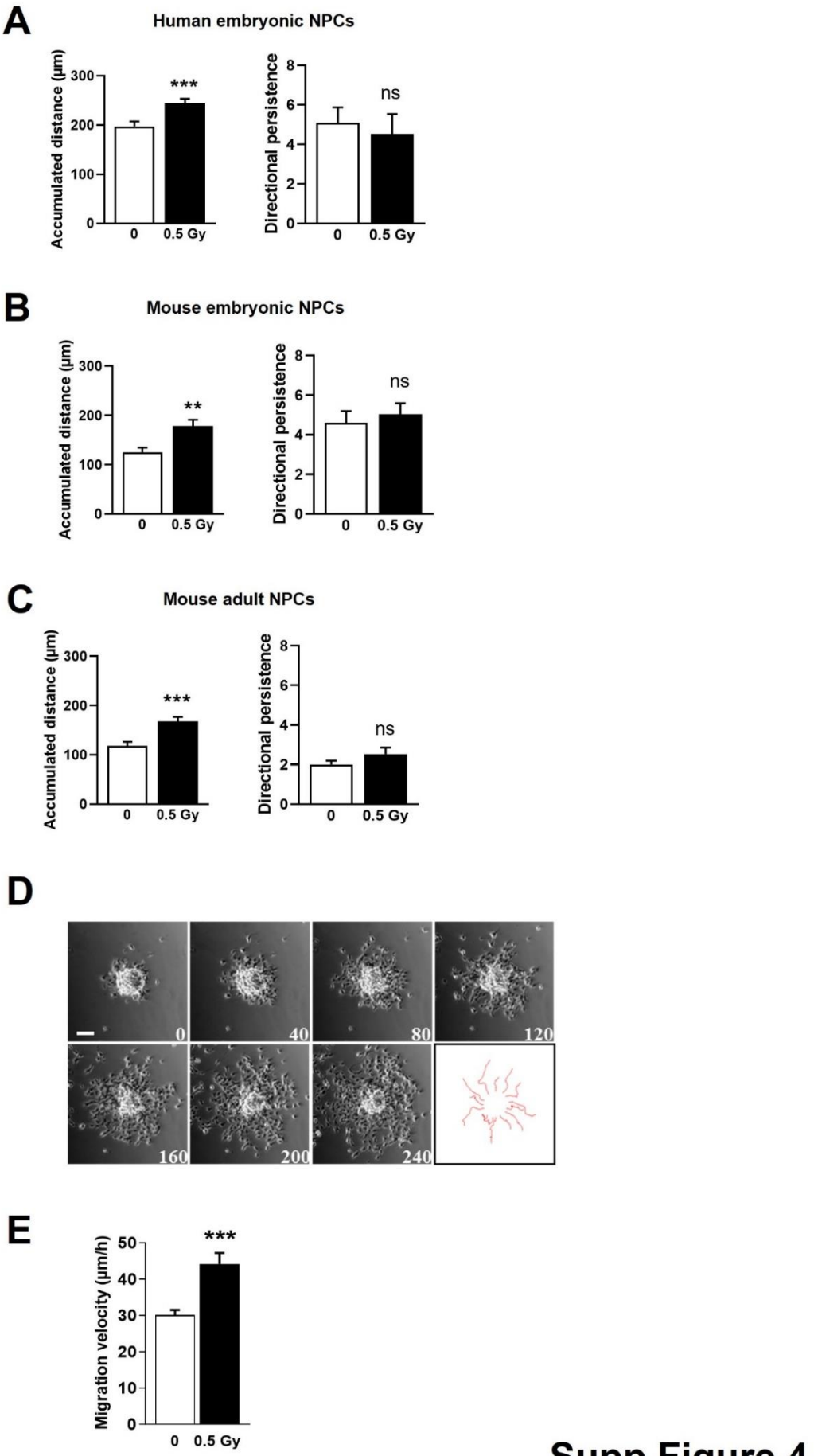
Supp Figure 1



Supp Figure 2

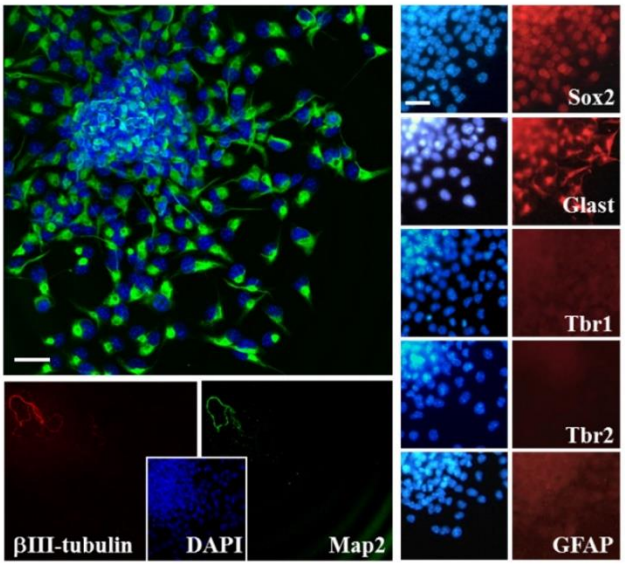


Supp Figure 3

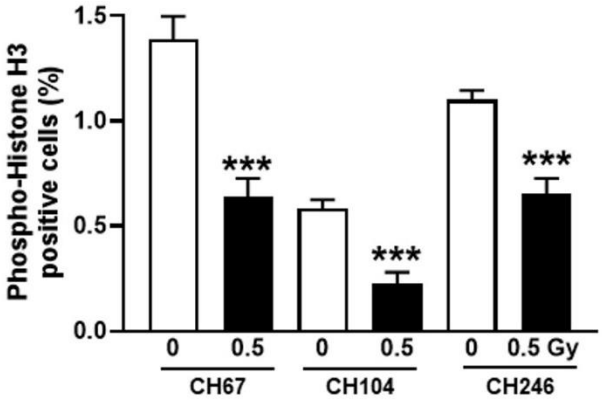


Supp Figure 4

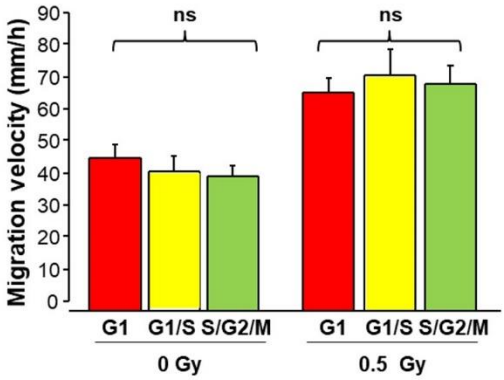
A



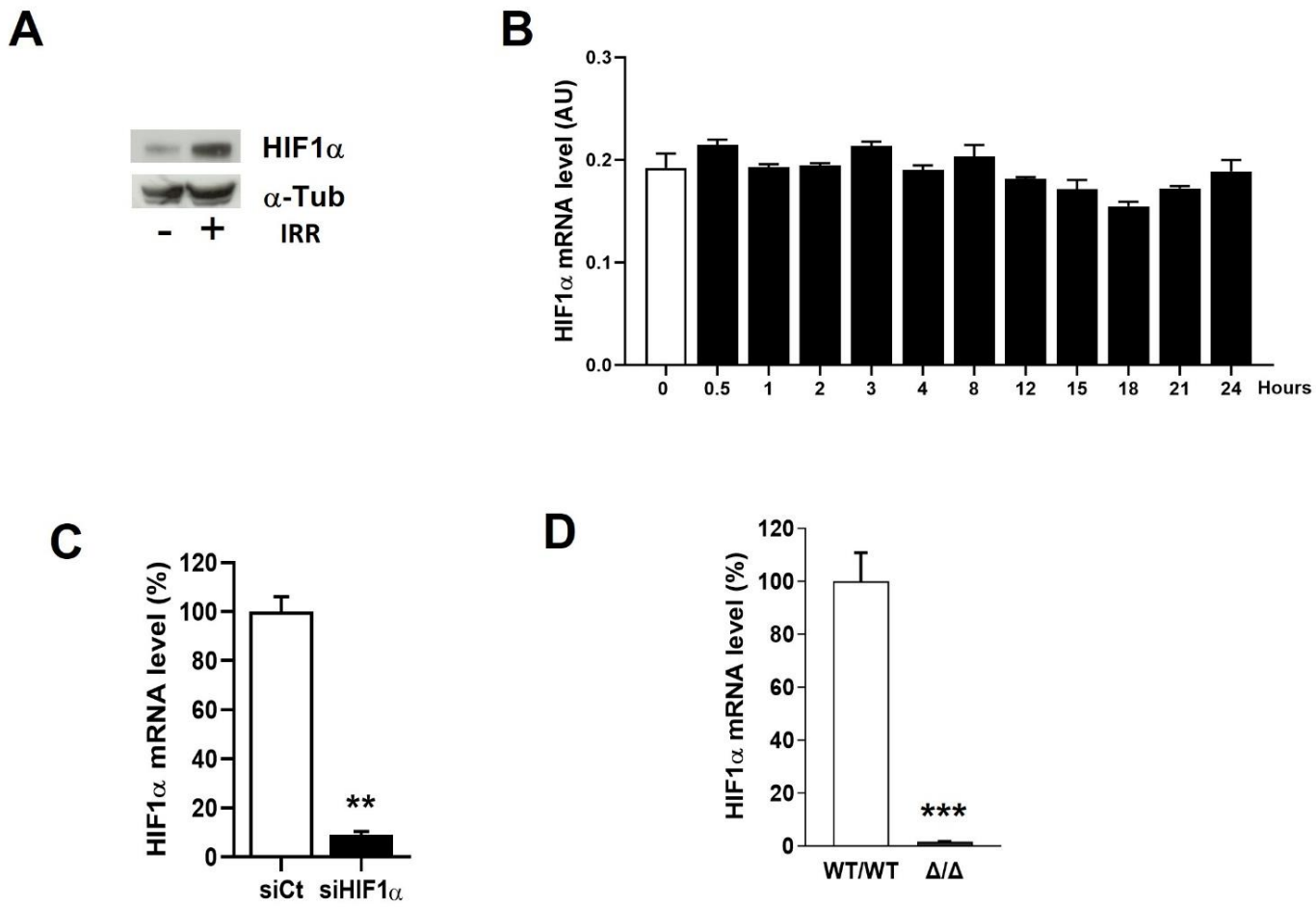
B



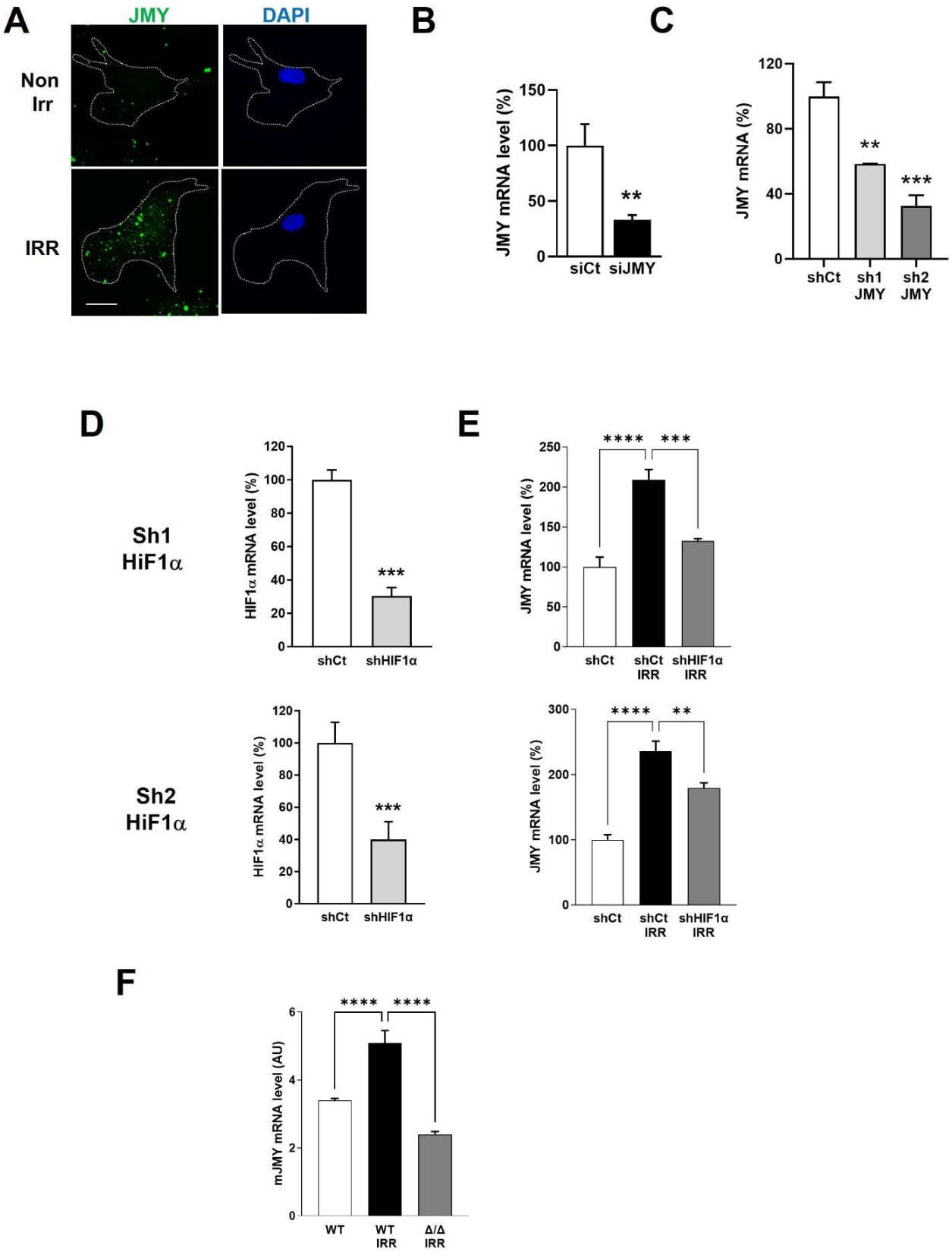
C



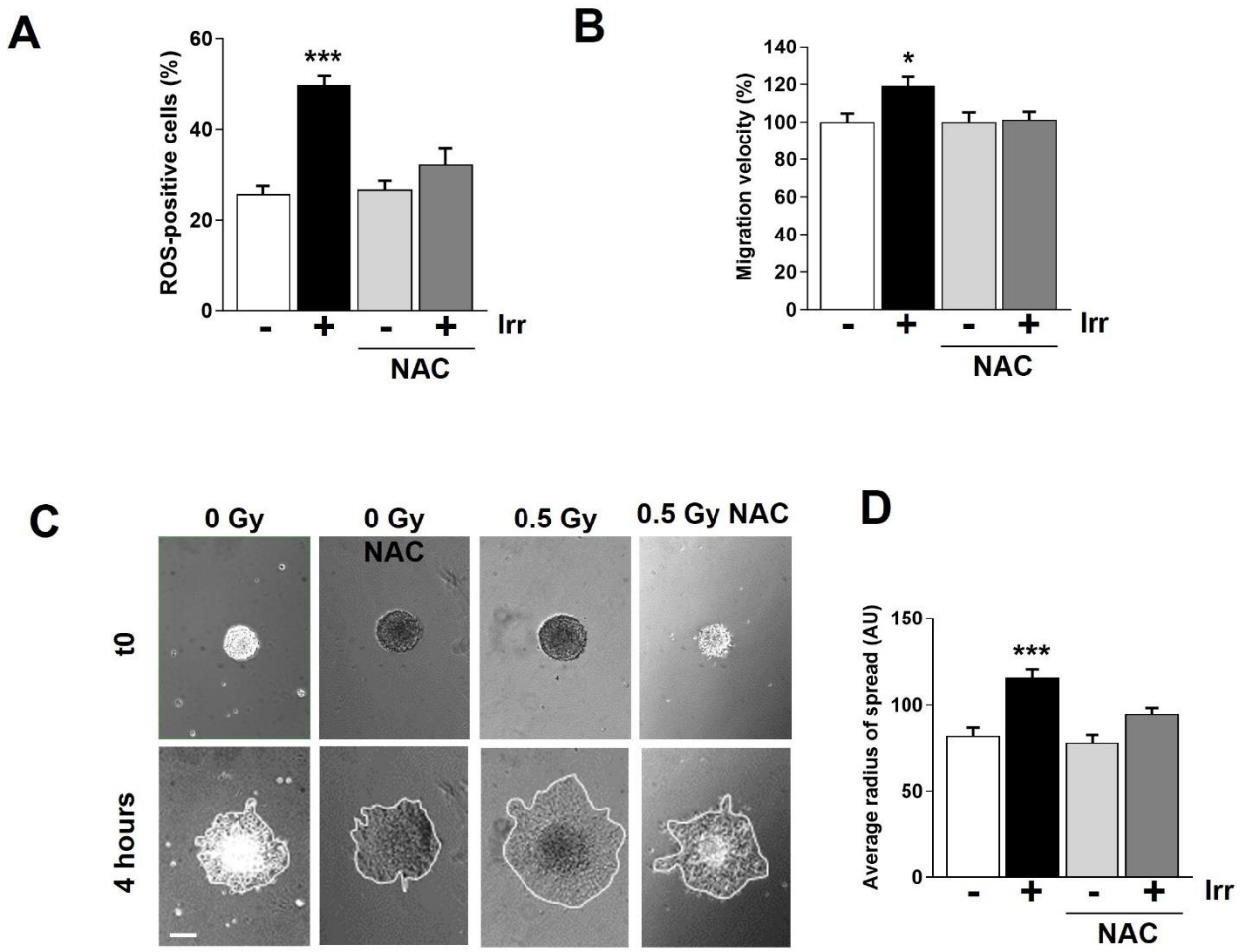
Supp Figure 5



Supp Figure 6



Supp Figure 7



Supp Figure 8

Table 1

Immunostaining characterization of individual hNPCs plated on laminin, derived from three human embryonic brains (CH67, CH104 and CH246), was performed 24 hours after irradiation (0.5 Gy; 24 h PI). or in non irradiated control cells. The percentage ± SEM and number of cells corresponding to each phenotype are indicated in parentheses.

	CH67		CH104		CH246	
IRR	**-**	**+**	**-**	**+**	**-**	**+**
Nestin	100.0 ± 0.0 (416)	100 ± 0.0 (372)	98.1 ± 1.2 (227)	100 ± 0.0 (177)	100 ± 0.0 (286)	92.6 ± 1.9 (213)
Vimentin	100.0 ± 0.0 (210)	100.0 ± 0.0 (402)	100.0 ± 0.0 (163)	100.0 ± 0.0 (271)	100.0 ± 0.0 (333)	100.0 ± 0.0 (290)
Musashi	100.0 ± 0.0 (368)	100.0 ± 0.0 (246)	93.8 ± 3.2 (168)	100.0 ± 0.0 (230)	93.5 ± .2 (283)	97.0 ± 1.7 (277)
Sox1	95.9 ± 2.6 (416)	99.0 ± 0.5 (372)	97.9 ± 1.4 (227)	94.2 ± 4.3 (177)	44.2 ± 2.2 (286)	45.1 ± 2.1 (213)
Sox2	96.1 ± 2.5 (245)	98.7 ± 1.2 (303)	100.0 ± 0.0 (253)	100.0 ± 0.0 (224)	92.8 ± 2.3 (305)	88.0 ± 3.4 (243)
CXCR4	100.0 ± 0.0 (368)	100.0 ± 0.0 (246)	100.0 ± 0.0 (168)	100.0 ± 0.0 (230)	100.0 ± 0.0 (283)	100.0 ± 0.0 (277)
N-Cadherin	100.0 ± 0.0 (261)	97.3 ± 2.7 (369)	100.0 ± 0.0 (147)	100.0 ± 0.0 (253)	100.0 ± 0.0 (314)	100.0 ± 0.0 (251)
GLAST	100.0 ± 0.0 (649)	100.0 ± 0.0 (578)	96.9 ± 1.4 (229)	98.0 ± 2.1 (225)	98.2 ± 1.1 (225)	98.6 ± 0.9 (727)
GFAP	10.4 ± 1.1 (1006)	11.1 ± 1.3 (1055)	1.7 ± 1.2 (479)	3.7 ± 1.5 (481)	1.8 ± 0.3 (1463)	1.7 ± 0.6 (929)
DCX high	5.3 ± 2.6 (822)	5.3 ± 1.1 (1163)	5.4 ± 1.6 (593)	6.1 ± 2.6 (589)	5.5 ± 2.9 (796)	nd
Notch	95.2 ± 0.1 (10978)	nd	91,7 ± 0.1 (4074)	nd	94.2 ± 0.1 (3891)	nd

Table 2

Percentage of mNPCs that spread out from the neurospheres after four hours, either from non irradiated or irradiated conditions (0.5 Gy; 24 h PI) that express the markers GLAST, Nestin, Sox2, Tbr2, Tbr1, III-tubulin, Map2 or cleaved caspase-3. The number of cells counted for each condition is indicated in parentheses.

IRR	-	+
Glast	98.5 ± 0.7 (743)	96.1 ± 3.1 (817)
Nestin	97.8 ± 4.3 (2230)	97.7 ± 1.1 (380)
Sox 2	98.6 ± 0.7 (1195)	98.4 ± 0.6 (967)
Tbr2	0.0 ± 0.0 (1032)	0.0 ± 0.0 (596)
Tbr1	0.0 ± 0.0 (1336)	0.0 ± 0.0 (999)
βIII-tubulin	0.0 ± 0.0 (1598)	0.2 ± 0.2 (1090)
Map2	0.0 ± 0.0 (1598)	0.0 ± 0.2 (1090)
Cleaved caspase-3	2.1 ± 0.3 (1394)	2.2 ± 0.7 (1167)

RESULTATS ET DISCUSSION

Rôle de JMY dans la migration et l'invasion radio-induites des cellules souches de glioblastome dans des organoïdes cérébraux

Article en préparation

I. INTRODUCTION :

Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale primitive la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte. Son évolution clinique est marquée par une infiltration diffuse du parenchyme cérébral, rendant impossible une résection chirurgicale complète et limitant fortement l'efficacité des traitements conventionnels. Malgré l'association de la chirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie selon le protocole de Stupp (Stupp et al., 2005 ; 2009), la récidive est quasi systématique, principalement en raison de la persistance de cellules tumorales infiltrantes dans le tissu cérébral environnant. Dans ce contexte, les cellules souches de glioblastome (CSG) jouent un rôle central, en raison de leur capacité à résister aux traitements, à s'adapter au microenvironnement et à reformer la tumeur de novo (Bao et al., 2006 ; Chen et al., 2012).

Au-delà de son effet cytotoxique, l'irradiation est aujourd'hui reconnue comme un stress capable d'induire des réponses adaptatives dans les cellules tumorales survivantes. Plusieurs études ont montré que des doses sublétales peuvent paradoxalement favoriser la migration et l'invasion des cellules de gliome (Wild-Bode et al., 2001 ; Park et al., 2006 ; Badiga et al., 2011, Gauthier 2020), suggérant l'activation de programmes pro-invasifs en réponse au stress génotoxique. Cependant, ces observations reposent majoritairement sur des modèles bidimensionnels, qui ne permettent pas de prendre en compte la complexité du microenvironnement cérébral, qui pourrait être déterminante dans la régulation du comportement invasif (Giese et al., 2003 ; Friedl et Alexander, 2011).

Dans ce contexte, le développement de modèles tridimensionnels apparaît essentiel. Les organoïdes cérébraux dérivés d'iPSC humaines constituent une approche particulièrement pertinente, puisqu'ils reproduisent une organisation tissulaire et une hétérogénéité cellulaire proches de celles du cerveau en développement (Lancaster et al., 2013 ; Lancaster et Knoblich, 2014). Nous avons développé deux modèles complémentaires : des organoïdes corticaux dirigés, basé sur le protocole de Pasca et al. (2015), permettant d'obtenir des tissus avec une identité corticale relativement homogènes, et des organoïdes cérébraux non dirigés selon le protocole de Lancaster et al. (2013), reposant sur les capacités d'auto-organisation des iPSC et conduisant à la formation de structures plus hétérogènes avec une diversité cellulaire plus grande.

Ces modèles ont été utilisés pour établir des systèmes de coculture de type GLICO (GLIoma Cerebral Organoid) avec des cellules souches de glioblastome permettant d'analyser l'invasion tumorale dans un environnement cérébral humain tridimensionnel (Linkous et al., 2019 ; Jacob et al., 2020). Cette approche permet d'étudier non seulement la capacité d'infiltration des cellules tumorales, mais également leur dynamique de migration et leurs interactions avec le tissu neural.

Dans cette deuxième partie, nous décrivons tout d'abord la génération et la caractérisation de ces organoïdes cérébraux. Nous montrons ensuite qu'une irradiation modérée et sublétale est capable d'induire une augmentation significative de l'invasion des CSG dans le tissu organoïde en rapport avec l'augmentation significative de la vitesse de migration des CSG au sein du tissu organoïde, révélant une plasticité invasive radio-induite. Cette analyse repose sur des approches expérimentales complémentaires, incluant différents modes d'invasion (cellules dissociées ou gliosphères) ainsi que l'étude de l'infiltration dans des organoïdes entiers fixés en 3D et l'analyse de la dynamique de migration dans des coupes organotypiques vivantes d'organoïdes. Enfin, nous mettons en évidence le rôle central de JMY dans cette réponse adaptative, en montrant qu'elle contrôle le remodelage du cytosquelette d'actine, l'extension des microtubes tumoraux et l'augmentation de l'invasion après irradiation.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1 Culture des cellules souches des gliomes (CSG)

Les lignées de CSG TG1N et TG16 ont été établies à partir de résections chirurgicales obtenues auprès de patients atteints des gliomes IDH sauvage, conformément à la classification de l'OMS (collaboration avec Hervé Chneiweiss, IBPS, CNRS, UMR8246, Paris ; Silvestre et al. 2011). Les CSG ont été cultivées soit sous forme de gliosphères soit en conditions adhérents sur un substrat de laminine 251 (Biolumina) dans un milieu défini pour les cellules souches composé de DMEM/F12 sans sérum (Gibco), supplémenté avec 1% de peni/strepto (Gibco), B27 1X sans vitamine A [Gibco], 5 µg/mL d'héparine (Stem Cell Technologies), 20 ng/ml de facteur de croissance EGF (Sigma Aldrich) et 20 ng/ml de bFGF (Gibco). Les cellules sont maintenues à 37 °C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO2. Les cellules sont dissociées une fois par semaine après une incubation de 10 minutes à température ambiante avec le réactif de dissociation Accutase (Sigma Aldrich), puis réensemencées à une densité de 0,25 × 10^6 cellules par flacon T25. Les lignées de CSG ont été transduites à l'aide d'un vecteur lentiviral contenant une cassette Luciferase/eGFP (pTRIP-MND-Luciferase-Ires GFP) (Silvestre et al. 2011).

II.2 Obtention des lignées clonales déficientes pour JMY

La génération de CSG déficientes pour JMY a été réalisée à partir d'une population de cellules TG1N transduites avec des lentivirus produits par Vector Builder codant simultanément pour une nucléase Cas9 et un guide ARN (gRNA) et ciblant spécifiquement JMY. Cinq conditions de transductions (MOI 3) ont été réalisées en parallèle : une condition contrôle utilisant un lentivirus codant pour un gRNA scramble, trois conditions utilisant chacune un lentivirus codant pour un gRNA distinct ciblant l'exon 1 de JMY et une condition combinant les trois gRNA précédents. Après transduction, les cellules TG1N ont été sélectionnée en présence de puromycine (0,4 mg/ml) pendant 10 jours puis clonées par cytométrie en flux (INFLUX) en plaque 96 puits à raison d'une cellule par puit. Une plaque de 96 puits a été réalisée pour chaque conditions (Scr, gRNA1, gRNA2, gRNA3 et 3gRNA). Les clones ont ensuite été amplifiés successivement en plaques de 48, 24, puis 12 puits avant d'être transférées en

flacon T25. L'invalidation de JMY a été confirmée pour chaque lignée clonale par Western Blot. Dans cette étude, deux lignées contrôles scramble, trois lignées ciblant JMY (chacune avec un gRNA distinct) et une lignée ciblant JMY avec la combinaison des trois gRNA ont été utilisées (Table 1 et figure supplémentaire 2).

II.3 Transduction de lentivirus codant pour les formes pleine longueur de JMY couplé à l'eGFP

Les TG1N et TG16 cultivés en adhérence sur substrat laminine sont infectés (MOI 3) à l'aide d'un lentivirus codant l'eGFP-JMY ou le JMY-eGFP produit par Vector Builder. Après 24 heures de contact, le milieu est changé. L'expression est vérifiée par l'observation des cellules sous microscope à fluorescence. En parallèle, des cellules TG1N et TG16 contrôle sont transduit avec un lentivirus codant uniquement pour l'eGFP.

II.4 Culture des cellules souches pluripotentes induites (iPSC)

Les lignées d'iPSC PDF01 (ISTEM, Evry, France) et GM25256 (Coriell) ont été cultivées respectivement dans les milieux IPS-BREW XF (Miltenyi Biotec) et mTESR1 (StemCell Technologies) dans des boîtes de Pétri recouvertes de vitronectine (0,5µg/cm^2 Gibco) ou de Matrigel (1X Corning). Lorsque les iPSC atteignaient 70 à 80 % de confluence, elles étaient dissociées à l'aide d'une solution d'EDTA 0,5 mM (Gibco) puis remises en culture dans les mêmes conditions. Le maintien de la pluripotence a été régulièrement évalué par cytométrie de flux. Les cellules ont été dissociées en suspension unicellulaire, lavées puis incubées avec des anticorps conjugués dirigés contre TRA-1-60 (R and D Systems) et SSEA-3 (R&D Systems). Après lavage, l'analyse a été réalisée sur un minimum de 10 000 événements par échantillon. Les cellules positives ont été quantifiées après exclusion des débris cellulaires et des doublets. La proportion des cellules double-positives étant généralement supérieure à 85 % (voir Figure supplémentaire 1).

II.5 Génération d'organoïdes cérébraux

Les organoïdes cérébraux ont été générés selon le protocole décrit par Lancaster et al. (2014), à partir des lignées iPSC PDF01 et GM25256. Le schéma récapitulatif de ce protocole est présenté en Figure 1 des résultats. Les cellules souches pluripotentes induites humaines (iPSC) ont été maintenues sur des plaques recouvertes de Matrigel (1X Corning) dans un milieu mTeSR1 (StemCell Technologies), renouvelé quotidiennement. Les cellules ont été passées tous les 4 à 5 jours, dissociées à l'aide de 0,5 mM d'EDTA (Gibco), puis d'Accutase, en veillant à maintenir leur pluripotence et leur morphologie caractéristique. Les iPSC ont été dissociées en cellules uniques puis ensemencées à une densité contrôlée dans des plaques à faible adhérence afin de favoriser leur agrégation spontanée et la formation de corps embryoïdes (EB). Les cellules sont ensuite cultivées dans un milieu d'induction embryoïde (EB medium) composé de DMEM/F12 (Gibco) supplémenté en KnockOut Serum Replacement (KOSR), L-glutamine, non-essential amino acids (NEAA) et β-mercaptoéthanol.Après 48 heures (J2), des agrégats sphériques homogènes ont été observés, correspondant aux corps embryoïdes initiaux. À J5, les EB sont transférés dans un milieu d'induction neurale dépourvu de sérum, contenant du N2 supplement (Thermo Fisher Scientific), afin de promouvoir l'engagement vers la lignée neuroectodermique. Cette étape favorise l'apparition de structures neuroépithéliales polarisées. Le milieu a été renouvelé tous les deux jours. À J9, les EB présentant des structures neuroépithéliales bien définies sont inclus dans une goutte de Matrigel (1X) puis cultivées dans un milieu de différenciation neuronale (Neurobasal medium complété avec B27 sans vitamine A, Glutamax et antibiotiques). À partir de J15, les organoïdes sont transférés dans des flacons en agitation (orbital shaker, 65–80 rpm) afin d'améliorer la diffusion des nutriments et de l'oxygène. Le milieu a été remplacé par un milieu de maturation contenant du B27 avec vitamine A, favorisant la différenciation neuronale et la complexification tissulaire.

Les organoïdes sont maintenus en culture jusqu'à J30 et au-delà, avec un renouvellement du milieu deux fois par semaine. Au cours de cette phase, une augmentation progressive de la taille et de la densité cellulaire a été observée, ainsi qu'une organisation plus complexe rappelant les structures corticales primitives.

II.6 Génération d'organoïdes corticaux

Les organoïdes corticaux humains ont été générés à partir de la lignée iPSC PDF01, selon une adaptation du protocole décrit par Pasca et al., 2015. Les iPSC ont été dissociées à l'aide de 0,5 mM d'EDTA (Gibco), puis d'Accutase®, et ensemencées à raison de 9000 cellules par puits dans des plaques 96 puits à faible adhérence (Corning) afin de former des corps embryoïdes. La différenciation neurale a été initiée par inhibition de la voie TGFβ/Smad (SB431542, 10 µM ; Noggin, 266 ng/mL) en présence de Y-27632 (10 µM) dans un milieu d'organoïde. Après deux jours d'agrégation, le milieu a été renouvelé quotidiennement pendant trois jours avec les mêmes conditions. Au 7e jour, les corps embryoïdes ont été inclus dans du Matrigel (Corning) en gouttelettes, puis cultivés dans un milieu d'organoïde supplémenté en FGF2 et EGF (20 ng/mL chacun) avec renouvellement du milieu tous les 2 jours jusqu'au jour 24. Les organoïdes ont été maintenus sans agitation jusqu'au 11e jour, puis en agitation douce à partir de ce stade. À partir du 25e jour, le milieu a été remplacé par un milieu de maturation contenant BDNF et NT-3 (20 ng/mL chacun), renouvelé tous les 3 jours jusqu'au 34e jour.

II.7 Suivi de la croissance des organoïdes

Les organoïdes cérébraux dérivés d'iPSC ont été suivis au cours du temps et de leur maturation à l'aide d'un microscope EVOS (FL Imaging System). Des acquisitions d'images ont été réalisées à différents temps (J2, J5, J9, J15, J21 et J30), permettant de documenter l'évolution morphologique depuis les corps embryoïdes au 2e jour jusqu'aux organoïdes de plus de 30 jours.

II.8 Protocole d'invasion des CSG dans les organoïdes cérébraux (modèle GLICO)

Les organoïdes cérébraux ou corticaux dérivés d'iPSC ont été mis en coculture après 30 jours de différenciation.

II.8.1 Modèle d'invasion à partir de cellules uniques

20 000 cellules souches de glioblastome (CSG) de la lignée TG1N exprimant l'eGFP (TG1N-eGFP) ont été dissociées en cellules uniques puis mises en co-culture avec les organoïdes de 30 jours dans des plaques 24 puits, en milieu IDM supplémenté (IDM+A). Après un temps d'adhésion de 2 heures, certains puits ont été irradiés à une dose de 0,5 Gy. L'ensemble organoïde-CSG constitue le modèle GLICO (Glioblastoma Cerebral Organoid). Les co-cultures ont été maintenues pendant 2 ou 4 jours après irradiation, puis fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4 %. Les échantillons ont ensuite été immunomarqués avec du DAPI et un anticorps anti-GFP afin de détecter les cellules TG1N-GFP, puis transparisés par la méthode Ce3D pour permettre une imagerie 3D en profondeur.

II.8.2 Modèle d'invasion à partir de gliosphères

Dans un second modèle, les cellules TG1N-eGFP ont été dissociées puis comptées afin d'obtenir 20 000 cellules, ensemencées dans un milieu de culture de cellules souches contenant EGF et bFGF (FGF2). Dans ces conditions définies, les CSG forment spontanément des gliosphères en 24 heures. Après 24 heures de formation, les gliosphères ont été mises au contact des organoïdes de 30 jours pour une co-culture de 24 heures. Les GLICO ainsi formés ont ensuite été irradiés (0,5 Gy) ou maintenus comme contrôles non irradiés. Les échantillons ont été fixés 4 jours après irradiation au PFA 4 %. Les étapes de marquage et d'imagerie ont été réalisées de manière similaire au modèle 1, incluant un immunomarquage GFP, une transparisation (Ce3D).

II.9 Irradiation des cellules de glioblastomes et des GLICO

Les cellules, les GLICO, ou les coupes organotypiques de GLICO ont été irradiées aux rayons γ à la dose de 0.5 Gy à l'aide d'un irradiateur au ^{137}Cs (GSR-D1, Gamma-Service Medical GmbH), avec un débit de dose de 0,69 $Gy \cdot min^{-1}$.

II.10 Acquisitions par microscopie confocal spinning disk

Les acquisitions des cellules adhérentes, des coupes de GLICO ou de GLICO entier ont été réalisé avec un microscope confocal Spinning-Disk (Nikon, GATTACA) aux objectifs 10X/0,45 NA, ou 20X/0,75 NA couplé à un piézoélectrique de 1mm (Piezoconcept) avec les objectifs suivants : Les images ont été analysées avec le logiciel IMARIS.

II.11 Acquisitions par microscopie à fluorescence plein champ

Les acquisitions des coupe d'organoïdes pour leur caractérisation cellulaire ont été réalisé avec un microscope inversé à fluorescence plein champ (Nikon) à l'objectif X20 en mode mosaïque et couplé à une caméra (ORCA- Fusion BT). La reconstruction a été effectué avec le logiciel Metamorph. Vidéomicroscopie en temps réel sur coupe organotypique de GLICO

Des expériences d'imagerie en temps réel ont été réalisées afin d'évaluer la dynamique d'invasion des cellules TG1N-eGFP dans des coupes organotypiques d'organoïdes. Des cellules TG1N-eGFP dissociées (20 000 cellules) ont été mises en co-culture avec des organoïdes corticaux (GLICO). Après 24 h de co-culture, les organoides ont été enrobés dans de l'agarose low melting (2%) afin de réaliser des coupes organotypiques vivantes de 300 µm d'épaisseur à l'aide d'un vibratome (Leica VT1200S), puis déposées sur des inserts Millicell (Millipore) et maintenues en culture pendant 24 h afin de permettre leur stabilisation. Deux protocoles d'irradiation ont été mis en place. Dans le premier, les GLICO entiers ont été irradiés (0,5 Gy) ou non avant la réalisation des coupes organotypiques. Dans le second, les coupes ont été réalisées en amont puis irradiées (0,5 Gy) ou non directement sur la Millicell.

Les acquisitions en vidéomicroscopie ont été réalisées à 37 °C, 5 % CO_2, 18 % O_2 et 95 % d'humidité, contrôlées par un système d'alimentation en gaz (The Brick, LIS). Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal NIKON en mode mosaïque avec un objectif 20X, avec une prise d'image toutes les 15 minutes pendant 6 h.Le suivi des cellules a été réalisé à partir des séquences time-lapse par tracking individuel à l'aide des fonctions dédiées (ImageJ), permettant de reconstruire les trajectoires cellulaires.

II.12 Marquages immunofluorescents

Des immunomarquages ont été réalisés à la fois sur des cultures 2D de cellules TG1N et TG16 et sur des coupes d'organoïdes afin de caractériser leur organisation et leur phénotype.

Pour les cultures 2D, les cellules TG1N ont été ensemencées sur des supports préalablement recouverts de laminine LN521, puis fixées pendant 10 min dans du paraformaldéhyde (4 % dans PBS) et perméabilisées dans du Triton X-100 à 0,1 %. Après une étape de blocage (PBS 1%TritonX100, 3% BAS, SVF 1%), les cellules ont été incubées avec les anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage pendant 1 h à température ambiante, puis lavées et incubées avec les anticorps secondaires conjugués à l'Alexa Fluor (1/1000, Molecular Probes) pendant une heure. La F-actine a été marquée à l'aide de phalloïdine conjuguée à l'Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific), et les noyaux ont été contre-colorés au DAPI (1 µg/mL, Sigma). Les échantillons ont ensuite été montés avec du Fluoromount (Southern Biotech). Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal (Leica TCS SPE).

Les organoïdes ont été inclus en paraffine avant d'être sectionnés en coupe de 8 µm au microtome. Une fois déparaffinées, réhydratées et soumises à une étape de perméabilisation et d'un blocage, les coupes ont ensuite été incubés avec les anticorps primaires, puis avec les anticorps secondaires fluorescents selon un protocole similaire à celui utilisé en 2D. Après contre coloration au DAPI, les coupes ont été montées et imagées en microscopie confocale.

Anticorps	Fournisseur	Ref	Dilution	Espèce
DCX	Cell signaling	4604	1/100	Rabbit
Notch	Cell signaling	58745	1/200	Rabbit
Pax 6	Cell signaling	60433	1/300	Rabbit
Connexine 43	Abcam	ab11370	1/500	Rabbit
JMY	Sigma	HPA 043308	1/200	Rabbit
Sox 2	Cell signaling	4900S	1/400	Mouse
Nestine	R&D systems	967243	1/200	Mouse
Vimentine	Santa Cruz	sc-7557	1/200	Goat
Ki-67	Novusbio	NB110-89717	1/200	Rabbit
MAP 2	Chemicon	MAB3418	1/100	Mouse
BIII-tub	Biolegend - Ozyme	BLE801202	1/200	Mouse
PH3	Cell Signaling	9706S	1/200	Mouse
Iba 1	Novus	NB100-1028	1/400	Goat
α-Tubuline				
GFP	Novus	NB100-1770	1/500	Goat
TBR1	Novus	NBP2-19019	1/200	Rabbit
ActinRed 555 (Phaloïdine*)	Invitrogen	R37112	1/200	
GAPDH	Cell Signaling	5419F	1/1000	Goat
SSEA3-AF488	R&D systems	392105	1/50	Mouse
TRA-1-81-AF594	R&D systems	IC8495T	1/50	Rabbit
Goat anti-mouse 488	Invitrogen	Alexa Fluo A11001	1/1000	Goat
Goat anti-rabbit 488	Invitrogen	Alexa Fluo A11008	1/1000	Goat
Goat anti-guinea 594	Invitrogen	Alexa Fluo A11076	1/1000	Goat
Donkey anti-rat 488	Invitrogen	Alexa Fluo A21206	1/1000	Donkey
Donkey anti-goat 647	Invitrogen	Alexa Fluo A21447	1/1000	Donkey
Chicken anti-mouse 488	Invitrogen	Alexa Fluo A21200	1/1000	Chicken
Chicken anti-goat 488	Invitrogen	Alexa Fluo A21467	1/1000	Chicken
Chicken FITC	Thermo Fisher Scientific	SA1-9511	1/1000	Chicken
Donkey anti-mouse 555	Thermo Fisher Scientific	A-21200	1/10000	Donkey

Tableau : Anticorps primaires utilisés pour les analyses d'immunofluorescence (IF)

Liste des anticorps (Ac) primaires utilisés pour les expériences d'immunofluorescence (IF), incluant le fournisseur, la référence (Ref), la dilution d'utilisation et l'espèce d'origine. DCX : doublecortine ; Pax6 : paired box protein 6 ; Sox2 : SRY-box transcription factor 2 ; MAP2 : microtubule-associated protein 2 ; βIII-t ub : βIII-tubuline ; PH3 : phospho-histone H3 ; Iba1 : ionized calcium-binding adaptor molecule 1.

II.13 Immunofluorescence sur organoïde entiers

Les organoïdes fixés au PFA 4% ont été immunomarqués et transparisés en suivant le protocole Ce3D avec certaines adaptations (Li, Germain and Gerner, 2019). Les organoïdes ont été bloqués pendant 24 h dans un tampon de blocage alternatif (ABB) composé de PBS, 0,3 % de Triton X-100, 1 % de BSA et 1× BD Perm/Wash Buffer ; pour les incubations avec les anticorps secondaires, 1 % de sérum bovin a été ajouté. Les organoïdes ont ensuite été incubés pendant 72 h avec les anticorps primaires dilués (Tableau 1) dans l'ABB, à 37 °C sous agitation (85 rpm). Après un lavage de 12 h dans un tampon de lavage conventionnel (CWB, PBS contenant 0,3 % de Triton X-100, 0,5 % de 1-thioglycérol [Sigma] et 0,1 % de saponine [Sigma]), à 37 °C sous agitation (85 rpm), les échantillons ont été incubés pendant 72 h avec les anticorps secondaires (1/1000, Tableau S3 de l'article) et 5 µg/mL de DAPI (Sigma), dans l'ABB, dans les mêmes conditions. Après un nouveau lavage dans le CWB, les organoïdes ont été transférés dans des plaques 24 puits à fond de verre (Azenta), puis transparisés progressivement sous agitation orbitale (100 rpm) à l'aide de gradients de solution Ce3D dans du PBS (30 %, 50 %, 70 % et 90 %, 1 h 30 chacun), suivis d'une incubation finale dans 100 % de solution Ce3D pendant une nuit.

II.14 Mesure de la profondeur d'invasion des CSG dans l'organoïde par analyse d'image avec Imaris

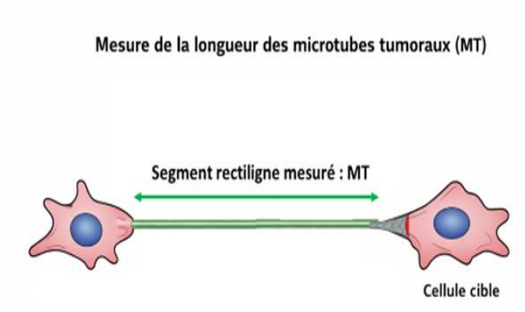
L'analyse de l'invasion des cellules TG1N au sein des organoïdes a été réalisée à partir d'images confocales 3D en utilisant le logiciel Imaris. Dans un premier modèle, les volumes d'organoïdes (GLICO) ont été reconstruits en 3D, puis chaque cellule TG1N a été détectée et annotée à l'aide de la fonction spot detection, permettant d'obtenir leurs coordonnées spatiales (x, y, z). La surface de l'organoïde a été définie à partir du signal (DAPI) afin de générer une enveloppe 3D servant de référence. La profondeur d'invasion a été déterminée en calculant, pour chaque cellule, la distance minimale (shortest distance) entre sa position et la surface de l'organoïde en 3D. Cette approche permet de quantifier la distribution des cellules en fonction de leur distance au bord et d'extraire des paramètres tels que la profondeur moyenne et maximale d'invasion.

Pour le second modèle impliquant une gliosphère, l'invasion a été étudiée à partir du bord de la gliosphère. Après reconstruction des volumes sous Imaris, la gliosphère a été segmentée afin de définir son contour 3D, utilisé comme référence spatiale. Les cellules issues de la gliosphère ont été détectées par spot detection et leur distance au bord de la gliosphère a été calculée en 3D selon le même principe de distance minimale (shortest distance), permettant de quantifier la distance d'invasion à partir du site d'origine.

Une représentation en fausses couleurs a été utilisée pour visualiser ces distances, les cellules proches de la structure d'origine apparaissant en couleurs froides et les cellules les plus éloignées en couleurs chaudes. L'ensemble de ces analyses repose donc sur une quantification tridimensionnelle de la distance minimale à une surface de référence (bord de l'organoïde ou de la gliosphère), permettant une mesure comparable de la profondeur d'invasion des cellules TG1N dans les différents modèles expérimentaux.

II.15 Mesure de la longueur et le pourcentage de MT sur cellules en adhérence

La longueur des MT a été mesurée à partir de la périphérie du soma (base du prolongement), en ne prenant en compte que la portion la plus rectiligne du MT afin de standardiser les mesures. L'extrémité du MT était définie en excluant les zones de contact avec d'autres cellules, notamment avant l'apparition du cône de connexion formé avec le corps cellulaire de la cellule cible (voir schéma). Le nombre de MT a été quantifié en comptabilisant le nombre de prolongements par cellule. Cette analyse a été réalisée à l'échelle du champ d'observation, en rapportant le nombre total de MT au nombre de noyaux (DAPI) présents dans ce champ.



II.16 Mesure de la longueur des MT en GLICO

Les MT ont été identifiés dans la profondeur des organoïdes grâce au signal eGFP. Leur présence a été détectée dans différents plans z, et leur longueur a pu être mesurée à l'aide du logiciel Imaris sur plusieurs champs à différentes profondeurs, tant que le signal GFP restait détectable.

II.17 Analyse statistique

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. La significativité statistique entre deux groupes a été évaluée à l'aide d'un test t ou du test non paramétrique de Mann–Whitney. Pour les comparaisons multiples, une ANOVA non paramétrique a été utilisée. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 9.2. Les seuils de significativité sont les suivants : *p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001 ou ****p < 0,0001.

III. RESULTATS EXPERIMENTAUX

III.1. Génération et caractérisation des organoïdes cérébraux dérivés d'iPSC

La génération d'organoïdes cérébraux a été réalisée à partir de la lignée d'iPSC PDF01 ou de la lignée GM25256, dérivée de fibroblastes cutanés humains provenant respectivement d'une femme et d'un homme, et reprogrammés en cellules pluripotentes induites (iPSC).

La pluripotence des iPSC a été contrôlée par cytométrie en flux par l'analyse de l'expression des marqueurs de surface SSEA-3 (Stage-Specific Embryonic Antigen-3) et TRA1-81 qui révèle que 90 % des cellules GM25256 et 97,2 % des cellules PDF01 sont doublement positives pour SSEA-3 et TRA-1-81 (Figure Supp 1). Ces données indiquent que la grande majorité de ces cellules présente un phénotype compatible avec un état pluripotent non différencié caractéristique des cellules souches.

L'approche choisie pour générer des organoïdes cérébraux repose sur le protocole initialement décrit par Lancaster et al., qui permet la formation d'organoïdes cérébraux non dirigés (unguided cerebral organoids ; Lancaster et al., 2013). Contrairement aux protocoles dirigés qui utilisent des facteurs morphogénétiques spécifiques pour orienter la différenciation vers une région cérébrale donnée (méthode Pasca, Pasca et al., 2015), l'approche Lancaster repose sur l'auto-organisation intrinsèque des cellules et conduit à la formation d'organoïdes présentant une diversité de structures cérébrales rappelant différentes régions du cerveau en développement. Dans ce protocole, les iPSC s'agrègent et s'auto-organisent en corps embryoïdes dès J2, puis s'expandent jusqu'à J4 avant d'être soumises à des conditions favorisant une induction neurale pendant cinq jours. Au jour 9 de culture, les agrégats cellulaires d'une moyenne de 1.5 mm^2 sont incorporés dans une matrice extracellulaire (Matrigel). L'ajout d'un milieu de différenciation défini permet de soutenir leur expansion tridimensionnelle ainsi que leur différenciation, conduisant à la formation de structures neuroépithéliales au sein des organoïdes. La culture est par la suite maintenue en agitation afin d'améliorer la diffusion des nutriments et de favoriser la croissance des organoïdes (Figure 1B). Dans ces conditions, les organoïdes dérivés de ces deux lignées de iPSC présentent une évolution morphologique progressive au cours du temps, caractérisée par une augmentation de leur

taille et la mise en place d'une organisation tissulaire de plus en plus complexe (Figure 1A). A 30 jours de culture, les organoïdes présentent une morphologie compacte et une aire moyenne de 6,5 mm^2 (Figure 1B-D).

La caractérisation des populations cellulaires réalisée par immunofluorescence sur des coupes d'organoïdes de 30 jours révèle une organisation tissulaire, comprenant des zones de prolifération principalement retrouvée au niveau des rosettes neuroépithéliales, caractéristiques des organoïdes cérébraux (Lancaster et al., 2014).Ces rosettes, d'un diamètre moyen de 50 à 150 µm, sont généralement présentes au nombre de 5 à 20 rosettes par organoïdes, selon l'âge et la taille de celui-ci (Lancaster et al., 2014 ; Tidball et al., 2023). Les populations cellulaires au sein de ces rosettes présentent une activité prolifératives importante mise en évidence par l'expression du marqueur Ki-67, exprimé dans les cellules cyclantes (Figure 1E - Sun et al., 2018) ainsi que par celle de la phospho-histone H3 (PH3), un marqueur spécifique des cellules en mitose (Tancredi-Cueto et al., 2022). Concernant leur phénotype, les rosettes sont composées de cellules exprimant SOX2, facteur de transcription impliqué dans le maintien et la prolifération des cellules souches neurales (Episkopou, 2005 ; Wegner et Stolt, 2005). L'expression de SOX2 est associée à celle de Pax6, un régulateur clé du destin neuronal et un marqueur des cellules de la glie radiaire ainsi que des progéniteurs de la zone sous-ventriculaire (Figure 1E - Englund et al., 2005 ; Zhang et Jiao, 2015). L'expression du filament intermédiaire Nestine, caractéristique des progéniteurs neuraux, est également retrouvée autour des rosettes avec un organisation radiale dans ces organoïdes de 30 jours (Figure 1E). L'expression de la vimentine souligne cette organisation radiale rappelant celle de la glie radiaire, tandis que les signaux Notch et Cx43 sont observés dans des régions compatibles avec des niches progénitrices et des zones de communication intercellulaire (Figure 1E). L'ensemble de ces marquages indique une persistance de populations progénitrices organisées en structures neuroépithéliales.

Parallèlement, l'expression de la βIII-tubuline et de la doublecortine (DCX), respectivement marqueurs de neurones post-mitotiques immatures et de neurones en cours de différentiation et de migration, (Duly AMP et al., 2022 ; Walker et al., 2007), ainsi que celle de MAP2, marqueur de neurones plus matures (Johnson GV, Jope RS., 1992), témoigne de la coexistence de cellules à différents stades de maturation neuronale au sein de l'organoïde (Figure 1E). Enfin, la détection de

TBR1, facteur de transcription caractéristique des neurones corticaux de projection (Hevner RF et al., 2001), suggère l'émergence de populations neuronales présentant une identité corticale (Figure 1E). En revanche, aucun marquage détectable n'a été observé pour IBA1 et pour GFAP (données non montrées), suggérant une absence de populations microgliales et astrocytaires matures à ce stade de différenciation.

Au total la caractérisation de ces organoïdes cérébraux humains de 30 jours indiquent qu'ils reproduisent, au moins en partie, une organisation neuroépithéliale stratifiée et hétérogène, caractérisée par la coexistence de compartiments progéniteurs et neuronaux, compatible avec des stades précoces du développement cérébral humain. Ils constituent un environnement tridimensionnel pertinent pour étudier les interactions entre tissu cérébral humain et cellules tumorales. Nous avons donc utilisé ce modèle pour analyser la capacité invasive des cellules souches de glioblastome et son éventuelle modulation par l'irradiation.

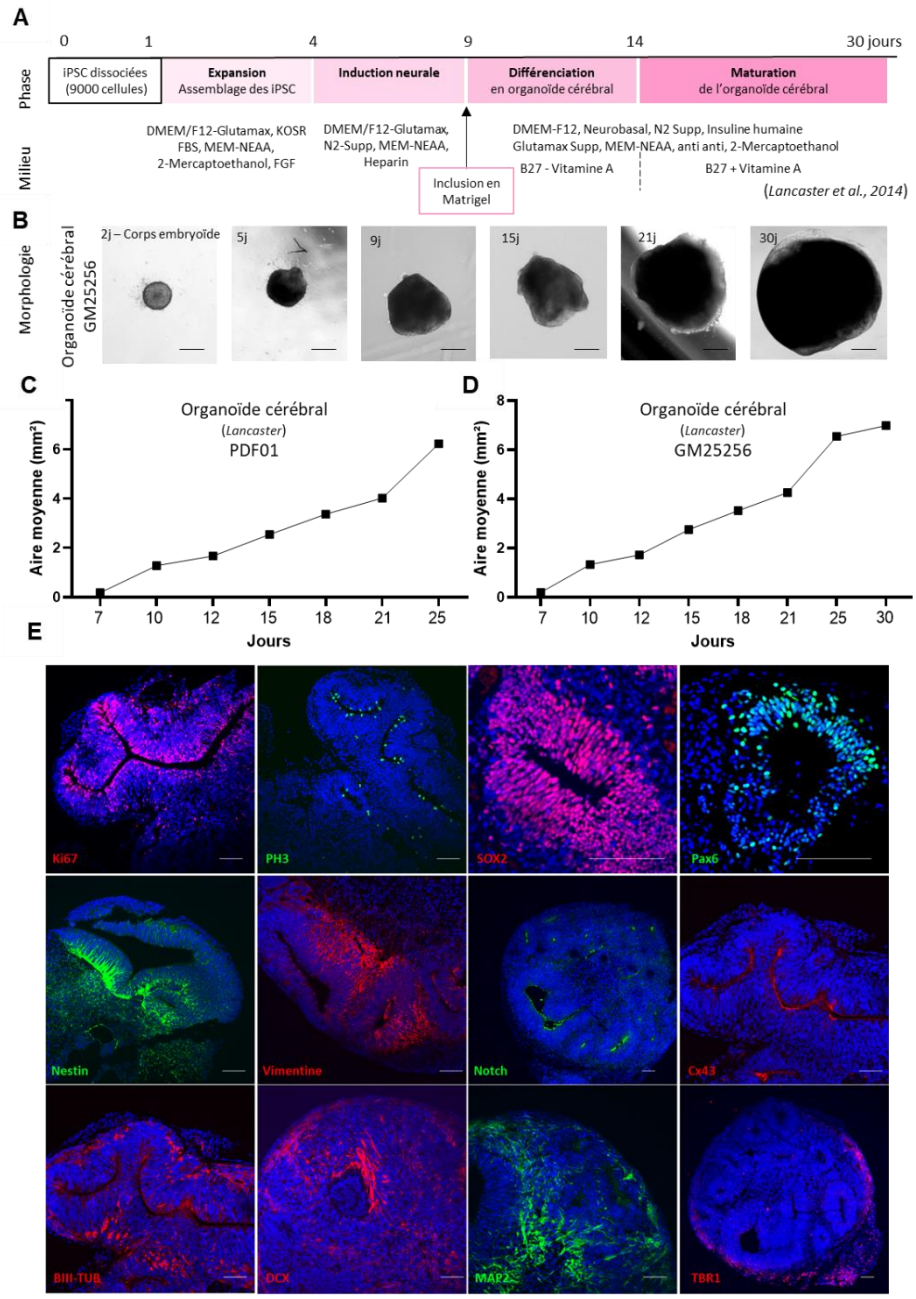


Figure 1 : : Génération, croissance et caractérisation de l'organoïde cérébral dérivé de iPSC.

A : Protocole de différenciation menant à la formation d'organoïdes cérébraux humain à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSC GM25256 dans notre étude, adapté de Lancaster et al., 2013). Après agrégation des iPSC en corps embryoïdes, les agrégats cellulaires sont soumis successivement à une phase d'expansion (J1 à J4), d'induction neurale (J4 à J9), de différenciation (J9 à J14) puis de maturation (J14 à J30).

B : Les microphotographies illustrent l'évolution morphologique au cours du temps depuis un corps embryoïde de deux jours jusqu'à un organoïde cérébral à J30, mettant en évidence une augmentation progressive de la taille et de sa compaction. Barre d'échelle : 100µm

C, D : Evolution de l'aire moyenne au cours du temps d'organoïdes obtenus avec le protocole de Lancaster à partir d'iPSC PDF01 (C) ou d'iPSC GM25256 (D) (n = 6 organoïdes). Les mesures montrent une augmentation progressive de l'aire moyenne (mm^2).

E : Caractérisation immunohistochimique des organoïdes cérébraux dérivés d'IPSC GM25256 à J30. Les immunomarquages révèlent la présence de cellules prolifératives (PH3, Ki67), de progéniteurs neuraux (SOX2, Nestine, Vimentine), ainsi que de l'expression de Notch qui contribue au maintien de leur état indifférencié au sein des structures de type rosette. L'expression de Cx43 souligne la présence de jonctions communicantes au sein du tissu. Ces immunomarquages confirment l'organisation neuroépithéliale des organoïdes ainsi que la progression vers une différenciation neuronale au sein des organoïdes par l'expression de marqueur de différenciation comme PAX6, βIII-tubuline (βIII-TUB), DCX, MAP2 et TBR1. Les noyaux sont contrecolorés au DAPI (bleu). Echelle : 100µm.

III.2. L'irradiation augmente l'invasion des CSG TG1N dans des organoïdes cérébraux humains

La capacité invasive des CSG TG1N-eGFP a été évaluée dans un modèle de coculture avec des organoïdes cérébraux humains (modèle GLICO pour « Cerebral Organoid Glioma » ; Linkous et al., 2019), générés à partir de lignées iPSC selon le protocole de Lancaster. Les CSG TG1N, obtenues à partir d'une tumeur primaire de glioblastome (Patru et al., 2010), ont été préalablement transduites par un lentivirus exprimant l'eGFP, puis mises en contact sous forme de cellules dissociées avec des organoïdes cérébraux humains de 30 jours dérivés de la lignée iPSC PDF01 ou GM25256.

Après deux heures de coculture, les GLICO ont été irradiés puis fixés deux ou quatre jours après irradiation (PFA 4%), immunomarqués (eGFP, DAPI), transparisés (Ce3D) puis imagés en 3D par microscopie confocale spinning disk (Figure 2A). Les reconstructions volumiques et l'analyse à l'aide du logiciel Imaris ont permis de localiser chaque cellule TG1N-eGFP dans la profondeur de l'organoïde et de mesurer sa distance par rapport à la surface de l'organoïde.

Dans les organoïdes cérébraux dérivés de la lignée PDF01, analysés après deux jours d'invasion, les cellules TG1N-eGFP non irradiées infiltrent l'organoïde jusqu'à une profondeur moyenne de 140,2 ± 1,4 µm, avec une distance maximale d'invasion atteignant 500 µm (Figure 2B-C). En revanche, dans les GLICO irradiés à 0.5 Gy, la profondeur moyenne d'invasion augmente significativement pour atteindre 181,9 ± 1,5 µm, certaines cellules étant localisées jusqu'à une profondeur de 600 µm du bord de l'organoïde (Figure 2B-C).

Afin d'exclure un effet dépendant de la lignée d'iPSC utilisée pour générer les organoïdes, ces expériences ont été répétées dans des organoïdes dérivés de la lignée GM25256 (Figure 2D-E). Une tendance similaire est observée : dans la condition irradiée après deux jours d'invasion, les cellules TG1N-eGFP présentent une profondeur moyenne d'invasion significativement plus élevée que dans les conditions contrôles non irradiés (19,0 ± 0,5 µm versus 11,1 ± 0,4 µm ; Figure 2E).

L'analyse de l'invasion à J4 post-coculture pour cette même lignée GM25256 (Figure 2F) montre que les cellules TG1N irradiées atteignent une profondeur moyenne de 50,4 ± 0,4 µm, tandis que la profondeur moyenne d'invasion est de 37,9 ± 0,4 µm en condition non irradiée.

Bien que la profondeur basale d'invasion des TG1N-eGFP soit plus faible dans ce modèle d'organoïde dérivé des GM25256 à J2, l'irradiation induit une augmentation significative de l'invasion des CSG. Ainsi, malgré des différences de permissivité à l'invasion entre les organoïdes générés par des lignées d'iPSC distinctes, l'effet pro-invasif radio-induit des CSG TG1N apparaît conservé.

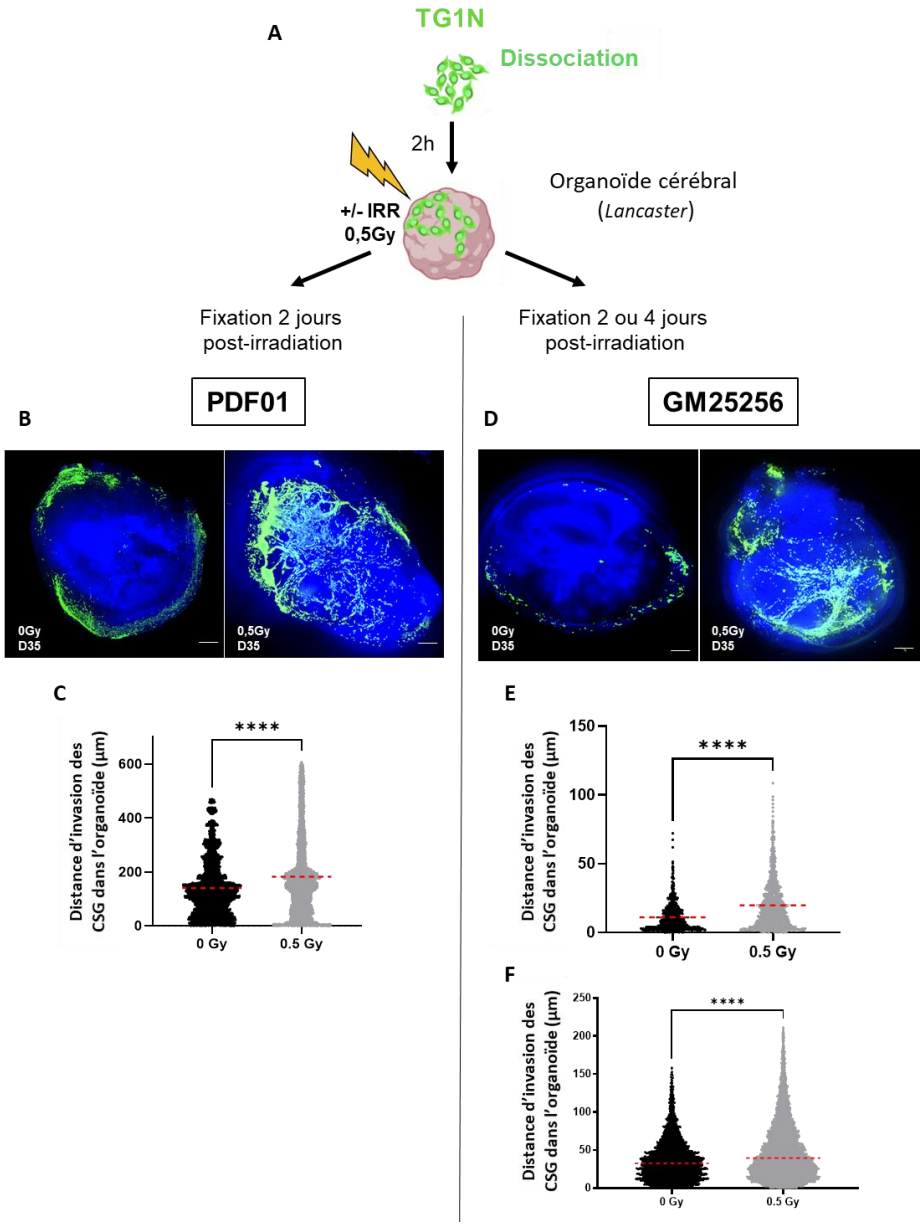


Figure 2 : Analyse de l'invasion de CSG après irradiation dans des organoïdes cérébraux dérivés de deux lignées distinctes d'iPSC humaines

A : Schéma expérimental du modèle GLICO. Les cellules tumorales TG1N sont dissociées puis mises en co-culture avec des organoïdes cérébraux dérivés d'iPSC (lignées PDF01 ou GM25256). L'irradiation est appliquée à l'ensemble du système (organoïde et cellules tumorales) à une dose de 0,5 Gy. L'invasion tumorale est analysée sur des GLICO fixés, immunomarqués et transparisés, 2 ou 4 jours après irradiation.

B : Projection maximale d'une reconstruction tridimensionnelle d'un organoïde cérébral (PDF01, J35 ; protocole Lancaster) infiltré par des cellules TG1N-eGFP (vert). Les noyaux sont contre-colorés au DAPI (bleu). Echelle : 200 µm
C : Quantification de la distance d'invasion des CSG au sein de l'organoïde (µm). Mesures réalisées dans des organoïdes dérivés de la lignée PDF01, fixés 2 jours après irradiation à 0.5 Gy (0 Gy, n = 8 et 0.5 Gy, n = 8). Les lignes rouges pointillées indiquent la moyenne (**** $p < 0,001$).
D : Projection maximale d'une reconstruction tridimensionnelle d'un organoïde cérébral (GM25256, J35 ; protocole Lancaster) infiltré par des cellules TG1N-eGFP (vert). Les noyaux sont contre-colorés au DAPI (bleu). Echelle : 200 µm.
E et F : Quantification de la distance d'invasion des CSG au sein de l'organoïde (µm). Mesures réalisées dans des organoïdes dérivés de la lignée GM25256, fixés 2 ou 4 jours après une irradiation à 0.5 Gy (E et F, respectivement). Les lignes rouges pointillées indiquent la moyenne. A J2 : 0 Gy, n = 5 et 0.5 Gy, n = 2. A J4 : 0 Gy, n = 3 et 0.5 Gy, n = 3 (**** $p < 0,001$).

Un second modèle d'invasion, imposant une entrée localisée des cellules tumorales, a été développé à l'aide de gliosphères de 20 000 CSG TG1N-eGFP. Après 24 h de mise en contact avec les organoïdes (dérivés de GM25256), les échantillons ont été irradiés à 0,5 Gy puis analysés 4 jours plus tard (Figure 3A). Les reconstructions tridimensionnelles mettent en évidence que des cellules TG1N-eGFP s'échappent de la gliosphère et infiltrent le tissu organoïde en profondeur, ce qui est confirmé par l'analyse plan par plan dans le volume de l'organoïde (Figure 3B). La modélisation sous Imaris permet de définir précisément le contour externe de la gliosphère et de calculer, pour chaque cellule disséminée, la distance par rapport au bord le plus externe de la gliosphère. Un code couleur permet de visualiser le gradient de dispersion des cellules (Figure 3C). En condition contrôle non irradiée, peu de cellules issues de la gliosphère se disséminent dans l'organoïde après 4 jours d'invasion. En revanche, après irradiation, la dissémination des TG1N-eGFP est significativement augmentée, avec de nombreuses cellules s'échappant de la gliosphère et s'infiltrant plus profondément dans le tissu de l'organoïde (Figure 3D). La quantification confirme ces observations puisque dans la condition non irradiée, les cellules migrent à une profondeur moyenne de 69,1 µm ± 0,2 µm par rapport au bord externe de la gliosphère, avec une distance maximale atteignant 500 µm. Après irradiation, cette distance moyenne augmente significativement pour atteindre 128.1 ± 0,9 µm avec une distance maximale d'invasion de 800 µm (Figure 3E). Cette analyse a été réalisée sur 6 organoïdes en condition contrôle et 7 organoïdes en condition irradiée, et l'expérience a été répétée à deux reprises.

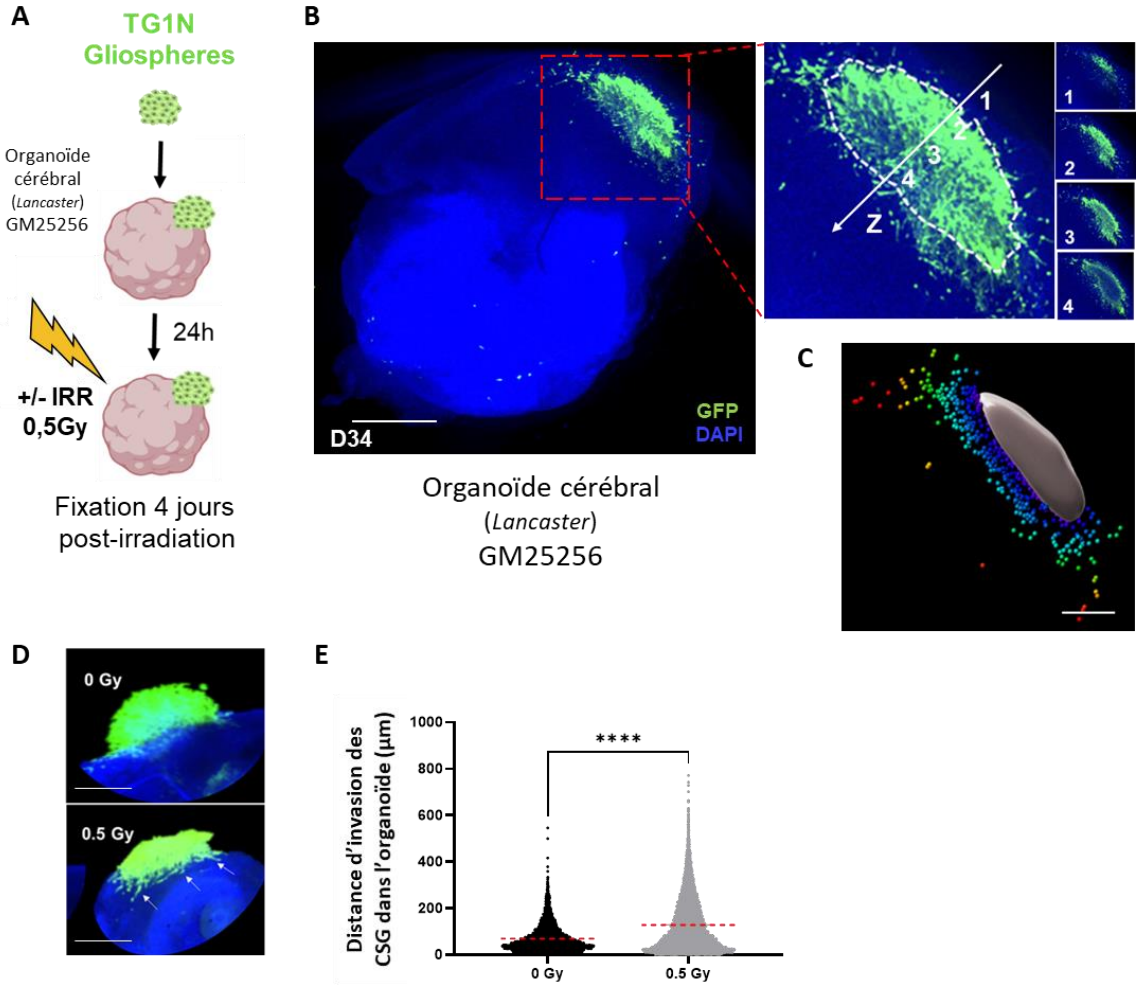


Figure 3 : Analyse de l'invasion de CSG provenant d'une gliosphère des organoïdes cérébraux

A : Schéma expérimental du modèle GLICO associé à une gliosphère de CSG. Une gliosphère composée de 20 000 cellules TG1N est mise en co-culture avec un organoïde cérébral humain pendant 24 h (GM25256, protocole Lancaster). Le système (organoïde et cellules tumorales) est ensuite irradié à 0,5 Gy, puis fixé 4 jours après irradiation pour analyse de l'invasion tumorale.

B : Image représentative d'un organoïde cortical de 34 jours infiltré par des cellules TG1N-eGFP issues d'une gliosphère (vert). Les noyaux cellulaires sont contre-colorés au DAPI (bleu). L'encadré rouge en pointillés indique la région agrandie, permettant de visualiser la zone d'invasion des cellules tumorales à partir de la gliosphère dans le tissu cérébral. Les positions le long de l'axe Z (1 à 4) sont utilisées pour quantifier la profondeur d'invasion. Echelle : 100µm.

C : Exemple d'une reconstruction tridimensionnelles illustrant l'infiltration de cellules TG1N-eGFP dans l'organoïde. Chaque point correspond à une cellule issue de la gliosphère infiltrant l'organoïde. Le code couleur reflète la distance au site initial : les couleurs bleu et vert indiquent une proximité avec la gliosphère, tandis que les couleurs jaune, orange et rouge correspondent à une infiltration plus profonde dans le tissu. Echelle : 100 µm

D : Agrandissement de deux gliosphères, contrôle et irradiée à 0,5 Gy. Dans la condition irradiée, des cellules quittant la gliosphère sont visibles (flèches blanches), tandis que dans la condition contrôle (0 Gy), moins de cellules infiltrantes sont observées. Echelle : 100µm

E : Quantification de la profondeur d'invasion des cellules TG1N-eGFP (contrôle, n = 5 et irradié, n = 5). L'irradiation augmente significativement l'invasion par rapport au contrôle (0 Gy). Les lignes rouges pointillées indiquent la moyenne (****$p < 0,001$).

Jusqu'à présent, nous avons utilisé des organoïdes cérébraux générés selon le protocole décrit par Lancaster qui permet d'obtenir des organoïdes cérébraux non dirigés à partir d'iPSC PDF01 et GM25256.

Afin de déterminer si l'effet pro-invasif de l'irradiation sur les CSG dépendait du type d'organoïde utilisé, nous avons généré des organoïdes corticaux selon le protocole établi par Pasca et al. 2015 à partir d'iPSC PDF01. Contrairement au protocole non dirigé de Lancaster, cette approche repose sur des conditions de différenciation favorisant spécifiquement la formation de tissus corticaux et la maturation progressive de populations neuronales glutamatergiques (voir mat et med).

Nous avons établi des cocultures de CSG TG1N-eGFP avec des organoïdes corticaux âgés de 30 jours pendant 2 heures, puis les GLICO établis ont été irradiés ou non (Figure 4A). Comme précédemment observé avec les organoïdes cérébraux non-dirigé, les cellules TG1N-eGFP présentent une capacité invasive significativement accrue après irradiation par rapport à la condition contrôle non irradiée (Figure 4B et 4C). En effet, la profondeur moyenne de migration atteint 75,8 ± 1,4 µm dans la condition irradiée contre 55,7 ± 0,6 µm dans la condition contrôle (Figure 4C).

Ces résultats montrent que l'effet pro-invasif induit par l'irradiation des CSG TG1N-eGFP est également observé dans un modèle d'organoïdes corticaux.

Afin d'évaluer le rôle du microenvironnement tissulaire dans l'invasion radio-induite des CSG, nous avons analysé l'impact de l'irradiation appliquée uniquement sur les CSG avant leur mise en coculture avec des organoïdes corticaux non irradiés (Figure 4D). Dans ces conditions, les CSG TG1N-eGFP irradiées sont toujours capables d'envahir plus profondément l'organoïdes que les CSG TG1N-eGFP contrôles non irradiées avec une profondeur moyenne d'invasion de 113,0 ± 2,3 µm contre seulement 74,9 ± 1,8 µm pour les cellules non irradiées (Figure 4E).

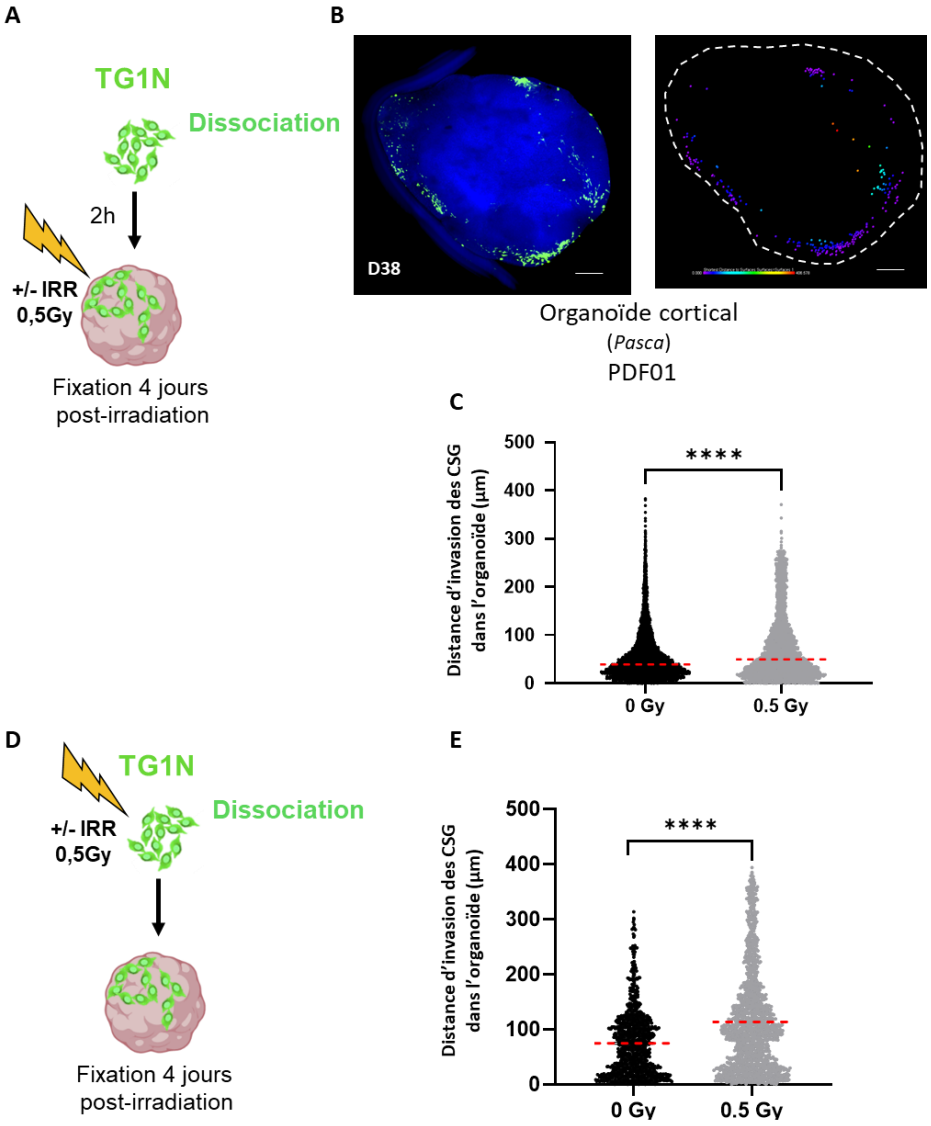


Figure 4 : Effet de l'irradiation sur l'invasion de CSG après irradiation dans des organoïdes corticaux dérivés d'IPSC humaines PDF01.

A : Schéma expérimental du modèle GLICO. Les cellules tumorales TG1N sont dissociées puis mises en co-culture avec des organoïdes corticaux dérivés d'iPSC (lignée PDF01, protocole Pasca). L'irradiation est appliquée à l'ensemble du système (organoïde et cellules tumorales) à une dose de 0,5 Gy. L'invasion tumorale est analysée sur des GLICO fixés, immunomarqués et transparisés, 4 jours après irradiation.

B : Projection maximale d'une reconstruction tridimensionnelle d'un organoïde cortical (PDF01, J35 ; protocole Pasca) infiltré par des cellules TG1N-eGFP (vert). Les noyaux sont contre-colorés au DAPI (bleu). À droite, une cartographie spatiale des cellules tumorales permettant de quantifier leur distance par rapport au bord de l'organoïde visualisé par une ligne pointillé blanche. Echelle : 200 µm.

C : Quantification de la distance d'invasion des CSG au sein de l'organoïde (µm). Mesures réalisées dans des organoïdes dérivés de la lignée PDF01, fixés 4 jours après irradiation à 0.5 Gy (0 Gy, n = 6 et 0.5 Gy, n = 6). Les lignes rouges pointillées indiquent la moyenne (**** $p < 0,001$).

D : Schéma expérimental du modèle GLICO. Les cellules tumorales TG1N sont dissociées puis irradiée (0.5 Gy) avant d'être mises en co-culture avec des organoïdes corticaux dérivés d'iPSC (lignée PDF01, protocole Pasca). L'invasion tumorale est analysée sur des GLICO fixés, immunomarqués et transparisés, 4 jours après irradiation.

E : Quantification de la distance d'invasion des CSG au sein de l'organoïde (µm). Mesures réalisées dans des organoïdes dérivés de la lignée PDF01, fixés 4 jours après irradiation à 0.5 Gy (0 Gy, n = 3 et 0.5 Gy, n = 3). Les lignes rouges pointillées indiquent la moyenne (**** p < 0,001).

Au regard des résultats obtenus après irradiation du GLICO (Figures 2 et 3), ces données, dans lesquelles seules les CSG sont irradiées, suggèrent que l'effet pro-invasif induit par l'irradiation repose principalement sur des modifications intrinsèques des cellules tumorales, plutôt que sur des altérations du tissu organoïde.

Au total, nous avons pu montrer que, dans deux modèles expérimentaux différents (cellules dissociées et gliosphères), une irradiation unique à 0.5 Gy induit une augmentation significative de l'invasion des TG1N au sein des organoïdes, suggérant une plasticité invasive radio-induite des CSG dans un environnement cérébral tridimensionnel. Ce phénomène radio-induit apparaît indépendant de l'orientation tissulaire des organoïdes puisqu'il est observé aussi bien dans des organoïdes cérébraux non dirigés que dans des organoïdes corticaux. Nos données suggèrent également que l'augmentation radio-induite de l'invasion des CSG repose principalement sur des modifications intrinsèques de leurs propriétés migratoires plutôt que sur un effet direct du microenvironnement tissulaire des organoïdes.

Afin de déterminer si cette augmentation d'invasion est associée à une altération dynamique de la motilité des CSG au sein du tissu, nous avons analysé en temps réel la vitesse de migration des TG1N-eGFP dans des coupes organotypiques dérivées d'organoïdes.

III.3. L'irradiation augmente la vitesse d'invasion des TG1N dans des organoïdes cérébraux

La motilité des CSG TG1N-eGFP a été analysée en temps réel dans des coupes organotypiques vivantes d'organoïdes cérébraux humains (iPSC PDF01, protocole Lancaster) préalablement mis en coculture avec 20 000 cellules TG1N dissociées exprimant la eGFP (Figure 5A). Vingt-quatre heures plus tard, des coupes organotypiques d'une épaisseur de 300 µm ont été réalisées au vibratome,

puis déposées pendant 24 heures sur une membrane poreuse (Millicell) afin de permettre leur stabilisation avant des acquisitions à l'aide d'un vidéomicroscope confocal (Figure 5A).

Les acquisitions time-lapse ont été effectuées à des intervalles de 15 minutes pendant 6 heures nous permettant un suivi individuel des cellules TG1N-eGFP au sein du tissu organoïde. Le tracking des CSG TG1N-eGFP ainsi que les analyses associées ont été réalisées à l'aide du logiciel Fiji-ImageJ à partir de ces acquisitions (Figure 5B). L'analyse des trajectoires met en évidence que les CSG présentent des déplacements complexes, non linéaires et multidirectionnels, traduisant une migration/invasion tridimensionnelle dans l'environnement de l'organoïde. En effet, certaines cellules progressent en profondeur dans la coupe jusqu'à sortir du plan d'imagerie (Figure 5B).

En condition basale (sans irradiation), la quantification des déplacements des CSG dans quatre GLICO indépendants montre que les CSG TG1N-eGFP migrent avec une vitesse moyenne comprise entre 10,3 ± 0,6 µm/h et 12,4 ± 0,2 µm/h), mettant en évidence une variabilité inter-organoïdes relativement bien limitée (Figure 5C).

Afin d'évaluer l'impact de l'irradiation, un premier protocole a consisté à mesurer les vitesses d'invasion des CSG TG1N-eGFP sur des coupes organotypiques issues de GLICO non irradiés et irradiés (Figure 5D). Dans ces conditions, les CSG présentes dans les coupes issues de GLICO non irradiées migrent à une vitesse moyenne de 9,3 ± 0,2 µm/h. En revanche, dans les coupes provenant de GLICO irradiés à 0,5 Gy, la vitesse d'invasion est significativement augmentée, atteignant une vitesse de 14,1 ± 0,3 µm/h, soit une augmentation d'environ 50 % par rapport à la condition non irradiée (Figure 5E). Cet effet est reproductible puisque observé dans quatre expériences indépendantes.

Afin de prendre en compte les variations inter-organoïdes, bien que celles-ci soient faibles (Figure 5C), un second protocole a été mis en place, consistant à comparer des coupes irradiées et non irradiées provenant d'un même GLICO, permettant ainsi une comparaison directe entre conditions (Figure 5F). Dans ce cadre expérimental, l'analyse de la vitesse de migration des CSG dans des coupes non irradiée et irradiées provenant de cinq GLICO indépendants montre que la vitesse moyenne de migration des TG1N-eGFP passe de 11,9 ± 0,3 µm/h en condition non irradiées à 15,1 ± 0,4 µm/h après irradiation (Figure 5G). L'analyse par paires confirme que l'irradiation est

systématiquement associée à une augmentation significative de la vitesse d'invasion dans chaque organoïde analysé (Figure 5H).

Ces résultats démontrent que l'irradiation stimule l'invasion en profondeur des CSG et qu'elle est associée par une augmentation significative de la vitesse d'invasion des CSG dans environnement cérébral tridimensionnel.

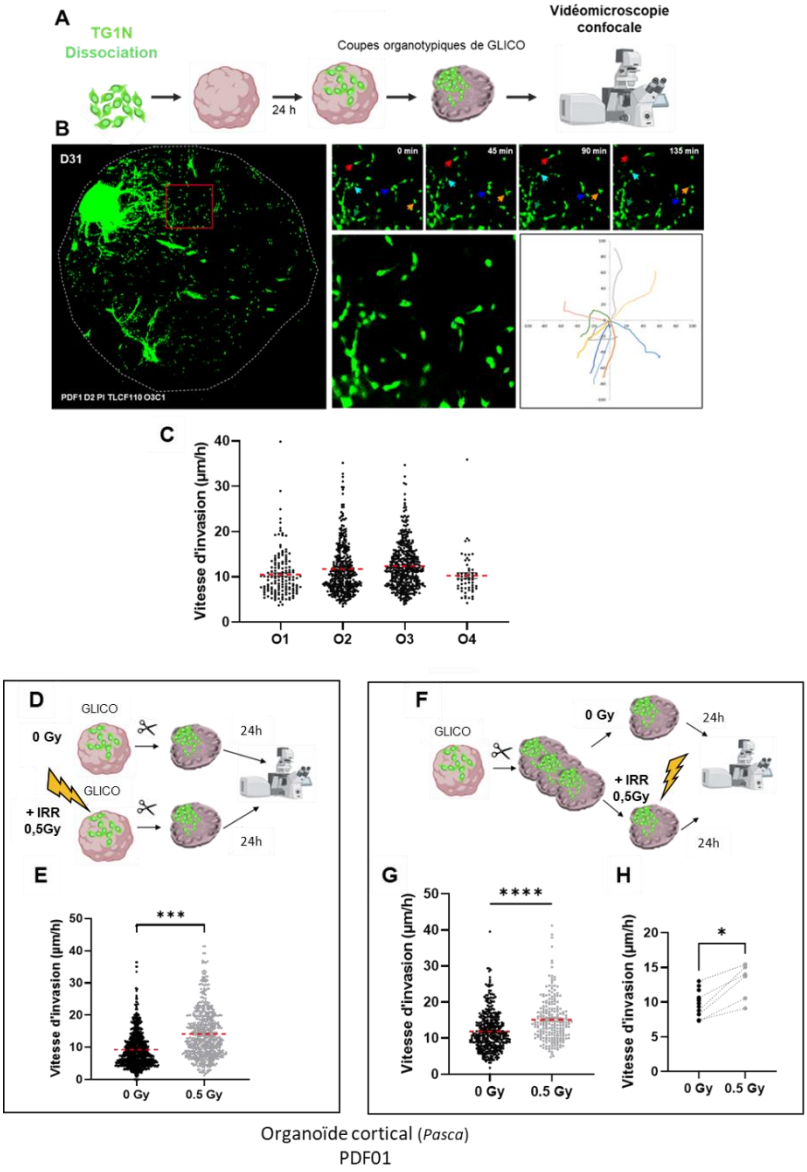


Figure 5 : L'irradiation augmente la vitesse d'invasion des cellules TG1N-eGFP dans des coupes organotypiques de GLICO.

A : Schéma expérimental du suivi en temps réel de l'invasion des cellules TG1N-eGFP dans des coupes organotypiques de GLICO. Vingt mille cellules TG1N-eGFP sont dissociées puis mises en co-culture avec des organoïdes corticaux dérivés d'iPSC (lignée PDF01, protocole Pasca). Après 8 jours de co-culture, des coupes organotypiques de GLICO non fixées sont réalisées (300 µm), déposées sur des membranes Millicell, puis irradiées ou non à la dose de 0,5 Gy. Vingt-quatre

heures après irradiation, des acquisitions mosaïques sont effectuées à l'aide d'un microscope confocal à la fréquence d'une acquisition toutes les 15 minutes pendant 6 heures.
B : Image représentative d'une mosaïque d'images d'une coupe de GLICO. L'encadré rouge est agrandi pour illustrer la dynamique d'invasion des cellules TG1N-eGFP au sein du tissus organotypique. Les flèches de couleur représentent des cellules individuelles à différents temps d'acquisition (0, 45, 90 et 135 min). Le graphe représente des trajectoires cellulaires au cours du temps obtenues après suivi à l'aide du logiciel ImageJ/Fiji et de la macro Excel Diper (Gorelik et Gautreau, 2014).
C : Vitesse d'invasion (µm/h) des cellules TG1N-eGFP mesurée dans quatre GLICO indépendants (O1 à O4). La vitesse moyenne d'invasion est comprise entre 10 et 12 µm/h, indiquant une dynamique de migration homogène et reproductible entre les GLICO. Les lignes rouges indiquent la moyenne d'invasion des cellules tumorales.
D : Schéma expérimental du protocole dans lequel des GLICO de 8 jours sont irradiés ou non, puis coupé au vibratome avant d'être imagés 24 h plus tard pendant 6 heures.
E : Vitesse d'invasion (µm/h) des cellules TG1N-eGFP mesurée dans des coupes organotypiques issues de GLICO non irradiées et irradiées (0 Gy, n = 4 et 0.5 Gy, n = 3). Les lignes rouges pointillées indiquent la moyenne de vitesse d'invasion (*** $p < 0,001$).
F : Schéma expérimental du protocole dans lequel, après 8 jours de co-culture, des coupes organotypiques de GLICO non fixées (300 µm) sont réalisées, déposées sur Millicell, puis irradiées ou non à 0,5 Gy. Dans ce protocole, les coupes irradiées sont comparées à des coupes contrôles issues du même organoïde, limitant ainsi les biais liés à l'hétérogénéité inter-GLICO.
G : Vitesse d'invasion (µm/h) des cellules TG1N-eGFP mesurée dans des coupes organotypiques non irradiées et irradiées provenant d'un même GLICO (0 Gy, n = 2 et 0,5 Gy, n = 2). Les lignes rouges pointillées indiquent la moyenne de vitesse d'invasion (**** $p < 0,001$).
H : Analyse appariée de la vitesse moyenne d'invasion des cellules TG1N-eGFP dans des coupes organotypiques non irradiées et irradiées issues d'un même GLICO (0 Gy, n = 12 et 0,5 Gy, n = 6). Les valeurs provenant d'un même GLICO sont reliées par une ligne grise (* $p < 0,05$).

Nous avons ensuite cherché à identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette plasticité radio-induite, en nous focalisant sur la protéine JMY, connue pour ses fonctions à l'interface entre réponse au stress génotoxique et dynamique du cytosquelette d'actine.

III.4. L'invasion radio-induite des cellules souches de glioblastome est dépendante de la protéine JMY

Afin d'évaluer l'implication de JMY dans l'invasion radio-induite, des cellules TG1N-eGFP contrôle (scramble) et des cellules TG1N-eGFP invalidées pour JMY (TG1N-eGFP KO-JMY), issues de trois lignées clonales indépendantes générées par CRISPR-Cas9, ont été analysées dans le modèle GLICO (Table 1). L'invalidation de JMY dans chacun de ces lignées clonales a été confirmée par Western Blot (Figure Supp 2).

Après 24 h de coculture avec des organoïdes cérébraux dérivés d'iPS GM25256 (protocole Lancaster), les GLICO ont été irradiées ou non à la dose de 0,5 Gy, puis fixés quatre jours plus tard, immunomarqués et transparisés afin d'effectuer des acquisitions tridimensionnelles en microscopie confocale spining disk (Figure 6A). Comme précédemment, l'analyse sous Imaris a permis de quantifier la profondeur moyenne d'invasion des CSG.

En condition contrôle (scramble), l'irradiation augmente significativement la distance moyenne d'invasion, passant de 35,5 ± 2,4 µm dans la condition non irradiée à 53,1 ± 5,9 µm après irradiation (Fig. 4B-4C). Ces données sont en accord avec nos précédentes expériences sur des TG1N non transduites (Figure 2D).

En revanche, dans les trois clones TG1N-eGFP JMY-KO testés, aucune augmentation significative n'est observée après irradiation, et les distances restent comparables entre les conditions irradiées et non irradiés (Figure 6B, 6C).

Ces observations ont été confirmées dans le modèle complémentaire de gliosphères, imposant une entrée localisée des cellules tumorales dans l'organoïde (Figure 6D). Dans les GLICO contrôles, l'irradiation entraîne une augmentation marquée de la distance moyenne d'invasion des CSG dans le tissus cérébral organoïde, passant de 69,3 ± 1,0 µm dans la condition non irradiée à 128,1 ± 0,9 µm après irradiation. A l'inverse, dans les GLICO composés de cellules déficientes pour JMY, l'irradiation n'induit aucune augmentation significative de l'invasion en comparaison au GLICO avec les TG1N KO-JMY non irradiés (Figure 6E et 6F).

L'ensemble de ces résultats, obtenus dans deux systèmes expérimentaux indépendants, démontre que JMY est nécessaire à l'invasion radio-induite des CSG dans les organoïdes cérébraux.

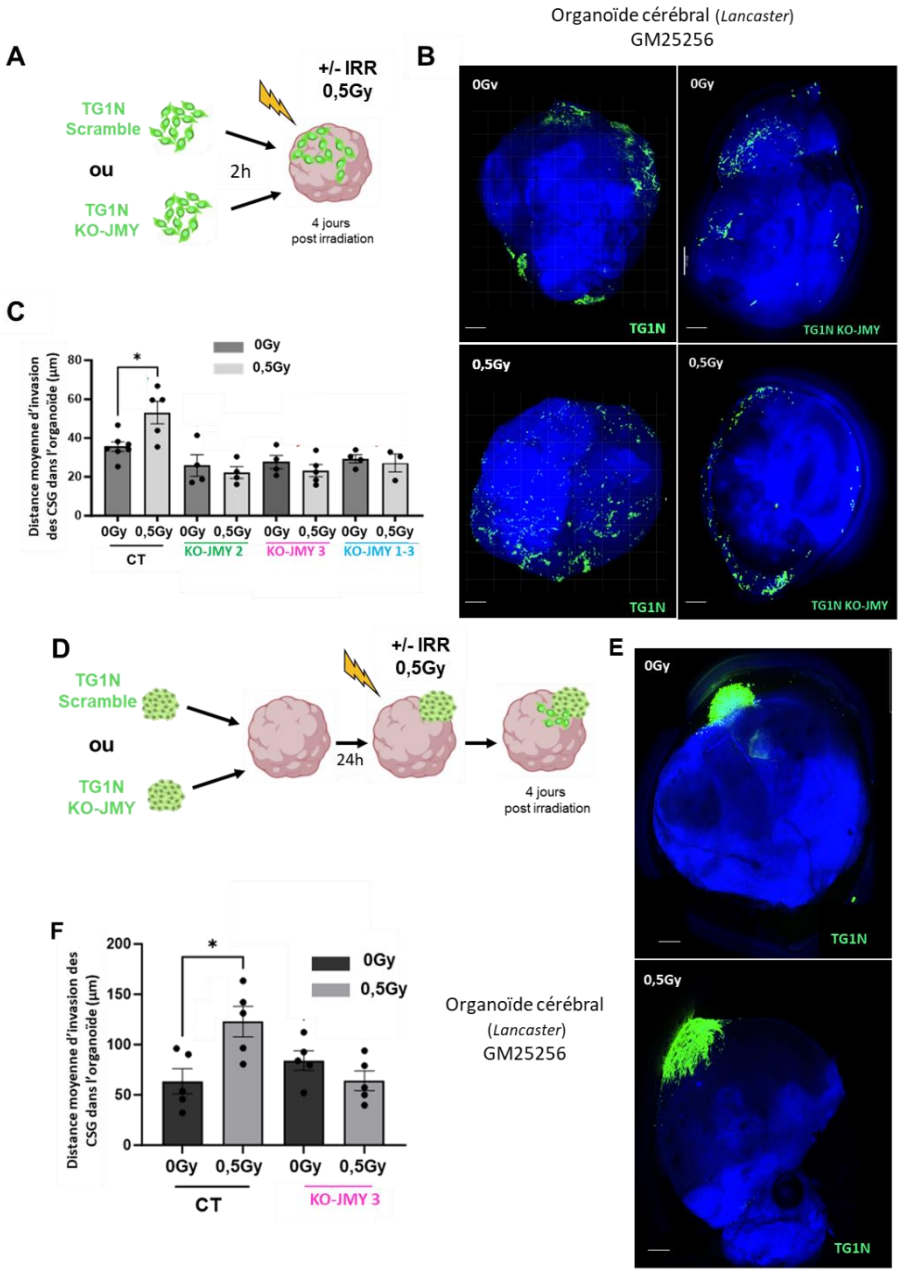


Figure 6 : L'invalidation de JMY réduit l'augmentation radio-induite de l'invasion des cellules TG1N-eGFP dans les organoïdes cérébraux.

A : Schéma expérimental du modèle GLICO. Les cellules tumorales TG1N control (CT) ou invalidées pour JMY (KO-JMY) sont dissociées puis mises en co-culture avec des organoïdes cérébraux dérivés d'iPSC (lGM25256, protocole Lancaster). L'irradiation est appliquée à l'ensemble du système (organoïde et cellules tumorales) à une dose de 0,5 Gy. L'invasion tumorale est analysée sur des GLICO fixés, immunomarqués et transparisés, 4 jours après irradiation.

B : Images représentatives de projections maximales de reconstructions tridimensionnelles d'organoïdes cérébraux (GM25256, protocole Lancaster) illustrant la distribution des cellules TG1N-eGFP (colonne de gauche) et des cellules TG1N JMY-KO (colonne de droite), non irradiées (ligne supérieure) ou irradiées (ligne inférieure). Echelle : 200 µm

C : Quantification de la distance moyenne d'invasion (µm) des CSG contrôle (CT) ou déficient pour JMY, sans ou 24H après irradiation (0.5Gy). Chaque point représente une valeur moyenne pour un GLICO. Le nombre de GLICO inclus dans cette analyse est compris entre 3 et 7 par condition. (*p < 0,05).
D : Schéma expérimental du modèle GLICO associé à une gliosphère de CSG. Une gliosphère composée de 20 000 cellules TG1N control (CT) ou invalidées pour JMY (KO-JMY) est mise en co-culture avec un organoïde cérébral humain pendant 24 h (GM25256, protocole Lancaster). Le système (organoïde et cellules tumorales) est ensuite irradié à 0,5 Gy, puis fixé 4 jours après irradiation pour analyse de l'invasion tumorale.
E : Image représentative d'un organoïde cérébral infiltré par des cellules TG1N-eGFP déficient pour JMY issues d'une gliosphère (vert) en condition non irradiée et irradiée. Les noyaux cellulaires sont contre-colorés au DAPI (bleu). Echelle : 200 µm
F : Quantification de la distance moyenne d'invasion (µm) des CSG contrôle (CT) ou déficient pour JMY, sans ou 24H après irradiation (0.5Gy). Chaque point représente une valeur moyenne pour un GLICO. Le nombre de GLICO inclus dans cette analyse est de 5 par condition. (*p < 0,05).

Afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents à cette dépendance, nous avons examiné si JMY participait à la reprogrammation structurale radio-induite des cellules tumorales, en particulier au niveau des microtubes tumoraux (MT), structures dépendantes du cytosquelette d'actine impliquées dans la communication et l'invasion des gliomes (Osswald et al., 2015).

III.5. JMY contrôle l'extension radio-induite des microtubes tumoraux (MT)

L'invasion des cellules de gliomes repose en partie sur leur capacité à remodeler leur cytosquelette. Parmi ces phénomènes de remodelage, l'établissement de prolongements membranaires spécialisés appelés Microtubes Tumoraux (MT) ont été démontré comme jouant un rôle important dans la résistance de cellules de GBM (Osswald, 2015 ; Venkataramani et al., 2022). Ces structures, riches en filaments d'actine, participent à la communication intercellulaire et à l'infiltration du tissu cérébral. Compte tenu du rôle central de JMY dans la dynamique des filaments actine, nous avons examiné si cette protéine ne pouvait pas intervenir dans la formation et l'extension radio-induite des MT dans les cellules souches de glioblastome.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au niveau d'expression de l'actine et de la tubuline, deux protéines structurales majeurs du cytosquelette qui permettent de donner à la cellule sa forme et sa structure dynamique (Tang et al., 2017). Comme illustré dans la Figure 7A et sa quantification en figure 7B, l'irradiation induit une augmentation significative de l'intensité du

signal d'actine dans les cellules contrôles, visible sur les images d'immunofluorescence et confirmée par la quantification (Figure 7A, 7B). Parallèlement, l'expression de la tubuline reste stable après irradiation suggérant que l'effet radio-induit est spécifique à l'actine (figure 7C). Le même type d'analyse a été effectuée dans des TG1N-eGFP KO-JMY préalablement irradiées ou non. Dans ces conditions, l'irradiation n'est plus capable de stimuler la formation des microtubules d'actine lorsque JMY est déficient (Figure 7A et 7B), suggérant que JMY est bien requis pour le remodelage radio-induit du cytosquelette d'actine.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à déterminer si la plasticité radio-induite des MT mis précédemment en évidence est dépendante de JMY. Pour ce faire, nous avons mesuré le nombre de MT par cellule ainsi que leur longueur dans des TG1N-eGFPscramble et des TG1N-eGFP KO-JMY 24 heures après une irradiation à 0,5 Gy dans des cultures adhérentes cultivées sur un substrat laminine. Dans ces expériences, nous avons montré que l'irradiation des TG1N-eGFP est capable d'augmenter significativement le pourcentage de MT de 19,9 ± 0,5 % alors qu'il est 13,1 ± 0,5 % dans les cellules contrôle non irradiées (Figure 5C). La réponse des TG1N-eGFP transduit avec un gRNA scramble répond de manière comparable puisque le niveau basal des MT de 11,2 ± 0,8 % augmente significativement après irradiation à 15,8 ± 0,6 %. En revanche, aucune augmentation n'est détectée dans les deux clones TG1N KO-JMY testés, bien que le nombre de MT par cellules en condition non irradiée soit identique aux TG1N non transduit et scramble (Figure 5C).

De la même manière, l'analyse de la longueur des MT révèle une plasticité morphologique fortement induite par l'irradiation dans les cellules TG1N-eGFP et TG1N-eGFP scramble puisque leur longueur moyenne augmente significativement de 49,6 ± 3,4 µm à 70,4 ± 3,7 µm après irradiation dans les TG1N-eGFP, et de 58,9 ± 5,0 µm à 97,7 ± 2,4 µm dans les TG1N-eGFP scramble (Figure 7E). En revanche, aucune augmentation n'est observée dans les cellules TG1N-eGFP KO-JMY, confirmant que l'allongement radio-induit des MT dépend de JMY.

L'identification de structures de type MT-like entre les CSG TG1N-eGFP au sein du tissu cérébral d'organoïdes générés à partir d'iPSC PDF01 ou GM25256 (protocole Lancaster/Pasca, figure 7F-G et 7H-I) nous a amené à mesurer leur longueur moyenne directement au sein de ces organoïdes. Après 2 jours d'invasion, la longueur moyenne des MT est de 40,7 ± 1,5 µm dans les organoïdes dérivés de

la lignée GM25256 alors qu'elle est estimée à 34,9 ± 1,9 µm dans les organoïdes dérivés de la lignée PDF01 envahis depuis 4 jours.

Comme précédemment rapporté dans des cultures adhérentes, une irradiation de 0.5 Gy est capable d'induire une augmentation significative de la longueur des MT-like à deux et quatre jours post-irradiation (62,5 ± 5,2 µm pour les organoïdes dérivés de GM25256 et 51,7 ± 2,9 µm pour les organoïdes dérivés de PDF01, respectivement ; Figures 7E, 7F, 7G et 7H).

Ces analyses réalisées dans des organoïdes générés à partir de deux lignées d'iPSC distinctes, suggèrent que l'allongement radio-induit des MT constitue un phénomène robuste, observable dans des environnements tissulaires 3D et non limité aux seules conditions de culture 2D sur laminine. L'ensemble de ces résultats démontrent que JMY apparait comme un déterminant central du remodelage actinique radio-induite des CSG, en particulier dans la formation des MT.

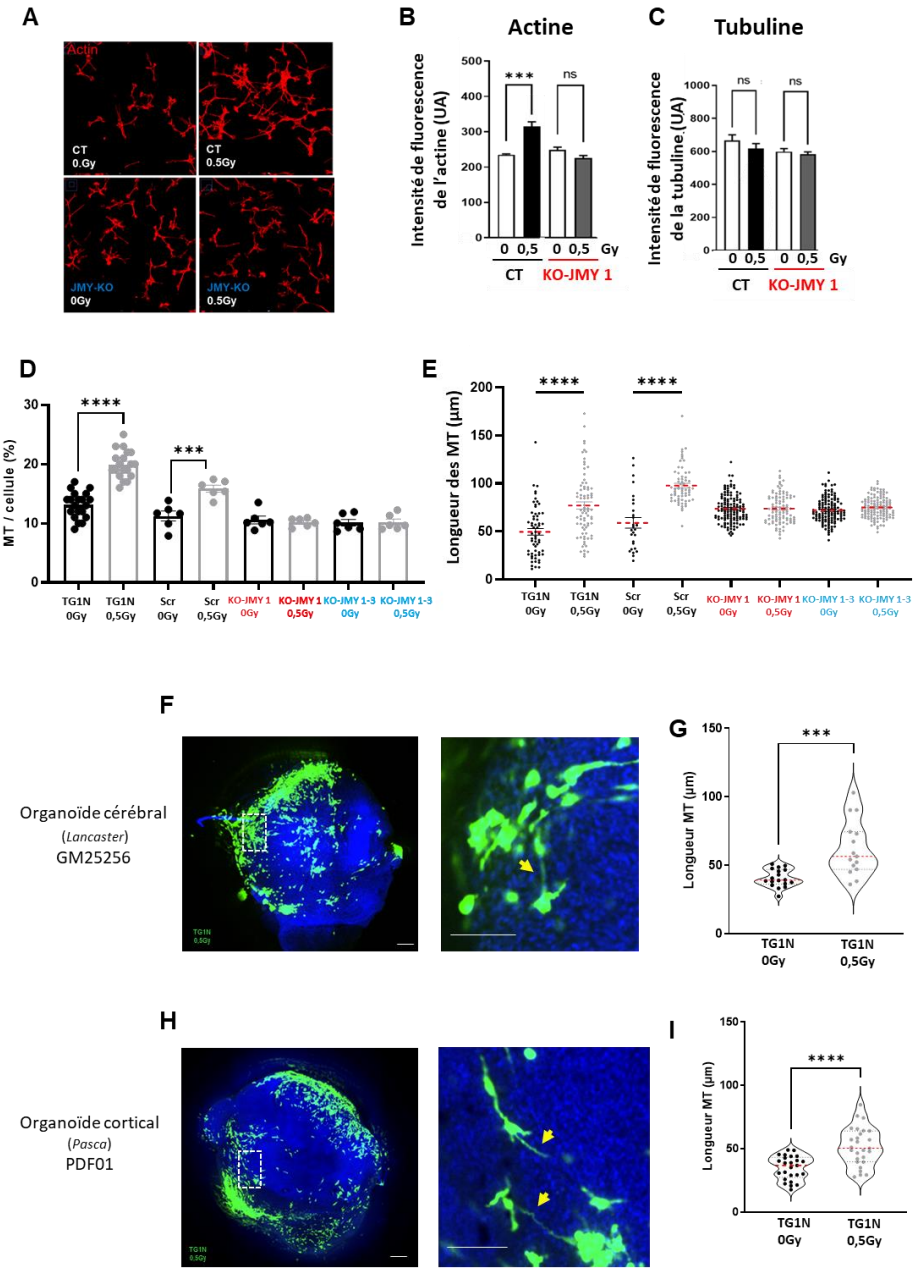


Figure 7 : JMY régule la polymérisation de l'actine et la formation de MT dans les cellules TG1N et dans les organoïdes cérébraux et corticaux.

A : Marquage en immunofluorescence de l'actine (phalloïdine, rouge) dans les cellules TG1N contrôle (CT) et JMY-KO, en conditions non irradiées (0 Gy) ou irradiées (0,5 Gy). L'irradiation induit une augmentation du niveau d'actine dans les cellules contrôle, effet absent dans les cellules déficientes pour JMY.

B : Quantification de l'intensité de fluorescence de l'actine (unités arbitraires, UA) dans les cellules TG1N contrôle (CT) et déficiente pour JMY (JMY-KO), sans irradiation (0 Gy) ou après irradiation (0,5 Gy). L'irradiation augmente significativement l'intensité de fluorescence de l'actine dans les cellules contrôle, tandis que cette qu'aucune augmentation n'est observée dans les cellules JMY-KO (***$p < 0.001$).

C : Quantification de l'intensité de fluorescence de la tubuline (unités arbitraires, UA) dans les cellules TG1N contrôle (CT) et déficiente pour JMY (JMY-KO), sans irradiation (0 Gy) ou après irradiation (0,5 Gy). L'irradiation n'affecte pas le niveau de tubuline dans les deux conditions.

D : Quantification du nombre moyen de microtubes tumoraux (MT) par cellule dans les cellules TG1N contrôle (CT) et déficientes pour JMY (JMY-KO), sans irradiation (0 Gy) ou après irradiation (0,5 Gy). (***$p < 0,001$).

E : Distribution de la longueur des MT dans les cellules TG1N contrôle (CT) et JMY-KO, en conditions non irradiées (0 Gy) ou irradiées (0.5 Gy) ou non. L'irradiation induit un allongement des MT dans les cellules contrôle, effet absent dans les cellules JMY-KO. Les lignes rouges pointillées indiquent la longueur moyenne des MT (**** $p < 0,001$).
F : Image représentative d'un organoïde cérébral dérivé d'iPSC (lignée GM25256, protocole Lancaster) et infiltré par des cellules TG1N-eGFP (vert) après 2 jours d'invasion. Les noyaux cellulaires sont contre-colorés au DAPI (bleu). L'encadré en pointillé blanc montre des structures de type MT reliant les cellules tumorales entre elles au sein du tissu organoïde (flèches jaunes). Echelle : 100 µm.
G : Distribution de la longueur des MT de cellules TG1N-eGFP dans des organoïdes cérébraux (GM25256, protocole Lancaster) après 2 jours d'invasion. Les lignes rouges pointillées indiquent la longueur moyenne des MT (0 Gy, n = 17 MT, 2 GLICO et 0.5 Gy, n = 15 MT, 2 GLICO ; ***$p < 0,001$).
H : Image représentative d'un organoïde cortical dérivé d'iPSC (lignée PDF01, protocole Pasca) et infiltré par des cellules TG1N-eGFP (vert) après 4 jours d'invasion. Les noyaux cellulaires sont contre-colorés au DAPI (bleu). L'encadré en pointillé blanc montre des structures de type MT reliant les cellules tumorales entre elles au sein du tissu organoïde (flèches jaunes). Echelle : 100 µm.
I : Distribution de la longueur des MT de cellules TG1N-eGFP dans des organoïdes corticaux (PDF01, protocole Pasca) après 4 jours d'invasion. Les lignes rouges pointillées indiquent la longueur moyenne des MT (0 Gy, n = 25 MT, 5 GLICO et 0.5 Gy, n = 19 MT, 6 GLICO ; ****$p < 0,001$).

Nous avons ensuite cherché à déterminer si l'augmentation de l'activité de JMY en absence d'irradiation pouvait être suffisante pour induire ce phénotype morphologique, en analysant les conséquences de la surexpression de JMY dans les CSG.

III.6. La surexpression de JMY induit un allongement des Microtubes Tumoraux

Des expériences de surexpression d'une JMY pleine longueur fusionnée à la protéine fluorescente eGFP nous a permis d'évaluer son impact sur la formation des MT et sur la migration cellulaire des CSG TG1N. Deux constructions de JMY pleine longueur ont été générées avec une fusion à l'eGFP soit en position C-terminale, soit en position N-terminale (Figure 8A). Une transduction à l'aide d'une eGFP seule a également été effectuée comme témoin.

Des marquages par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps spécifiquement dirigé contre JMY ont été effectués sur des CSG TG1N exprimant soit la eGFP seule, soit l'une ou l'autre des deux constructions de JMY fusionnée à l'eGFP. Les images montrent une augmentation nette du signal JMY dans les cellules surexprimant les constructions fusionnées (Figure 8B). Bien que les niveaux d'expression des JMY fusionnées à l'eGFP sont significativement plus important que celui de la JMY endogène (confirmé par l'intensité de fluorescence, le niveau d'expression des ARNm de JMY par

qRT-PCR et Western blot ; respectivement Figure 8B, 8C, 8D), leur localisations subcellulaires restent comparables à celle de la JMY endogène, à savoir principalement cytoplasmique (Figure 8D) alors que la surexpression de l'eGFP seule conduit à une distribution homogène de la fluorescence dans le cytoplasme et le noyau, sans altérer la localisation cytoplasmique de JMY endogène (Figure 8D).

La quantification de l'intensité de l'actine révélée par un marquage à la phalloïdine montre que les cellules TG1N surexprimant l'eGFP-JMY présentent une augmentation du niveau d'actine comparable à celle retrouvée dans des cellules TG1N non transduites mais irradiées (Figure 8E). En revanche, l'irradiation des cellules TG1N surexprimant l'eGFP-JMY n'entraîne pas d'augmentation supplémentaire du signal d'actine après irradiation (Figure 8E). Ces résultats indiquent que la surexpression de JMY est suffisante pour induire une augmentation du niveau d'actine comparable à celle observée après irradiation. Ils suggèrent également que cette augmentation correspond à un plateau maximal puisque l'irradiation n'entraîne pas d'effet additionnel dans les cellules surexprimant la JMY contrairement à ce qui est observé dans les TG1N non transduites associées à un niveau endogène de JMY.

Concernant les MT, nous avons confirmé que le nombre de MT par cellules augmente après irradiation, passant de 13,1 ± 0,5 % en condition contrôle à 19,9 ± 0,5 % après irradiation. Une augmentation comparable est observée après surexpression de JMY en l'absence d'irradiation (20,2 ± 0,6 % ; Figure 8F) alors que l'irradiation de ces cellules surexprimant JMY n'induit pas d'effet additif puisque le pourcentage de MT reste stable (20,5 ± 0,6 % ; Figure 8F).

De manière similaire, la surexpression de JMY (eGFP-JMY) en l'absence d'irradiation est suffisante pour induire un allongement des MT par rapport aux cellules non transduites (88,1 ± 1,6 µm *versus* CT non irradié, Figure 8G). Cet allongement est comparable à celui observé après irradiation seule (87,5 ± 1,5 µm ; Figure 8G). Enfin, l'irradiation des cellules surexprimant JMY n'entraîne pas d'augmentation supplémentaire de la longueur des MT, suggérant que la surexpression de JMY permet, comme rapporté pour le nombre de MT par cellule, d'atteindre un plateau maximal d'extension de ces structures (Figure 8G).

L'ensemble de ces résultats démontre que la surexpression de JMY est suffisante pour reproduire les effets de l'irradiation sur la formation et l'extension des MT, mettant en lumière que JMY joue un rôle clé dans la plasticité radio-induite des TM.

Puisque les MT sont décrits comme jouant un rôle important dans la progression et l'invasion tumorales, nous avons ensuite étudié l'impact de la surexpression de JMY sur la vitesse de migration des CSG TG1N dans un modèle de migration 2D sur un substrat laminine déjà établi au laboratoire. De manière cohérente avec l'augmentation du nombre et de l'extension des MT induits par la surexpression de JMY, les CSG TG1N surexprimant JMY présentent une vitesse moyenne de migration significativement plus importante que celle des cellules contrôles non irradiées (42.2 ± 1.1 µm/h versus 32.3 ± 0.8 µm/h), atteignant une valeur comparable à celle retrouvée dans les CSG TG1N irradiées (43.1 ± 1.2 µm/h ; Figure 8H).

Enfin, nous nous sommes intéressés à étudier l'impact de l'irradiation et de la surexpression de l'eGFP-JMY dans une seconde lignée de CSG, TG16 (Figure 8I), caractérisée par un faible niveau basal de MT de l'ordre de 0,25 MT / cellule (Figure 8J) en comparaison avec la lignée TG1N (13,1 ± 0,5 % Figure 8F). Dans cette lignée TG16, l'irradiation seule n'induit pas une augmentation significative du pourcentage de MT (0,7 % ± 0,1 % ; Figure 8J). En revanche, la surexpression de JMY augmente significativement ce pourcentage, aussi bien en condition non irradiée qu'après irradiation (1,2 ± 0,1 % et 1,3 ± 0,2 %, respectivement), indiquant que la surexpression de JMY est suffisante pour induire la formation de MT dans un contexte peu permissif (Figure 8J).

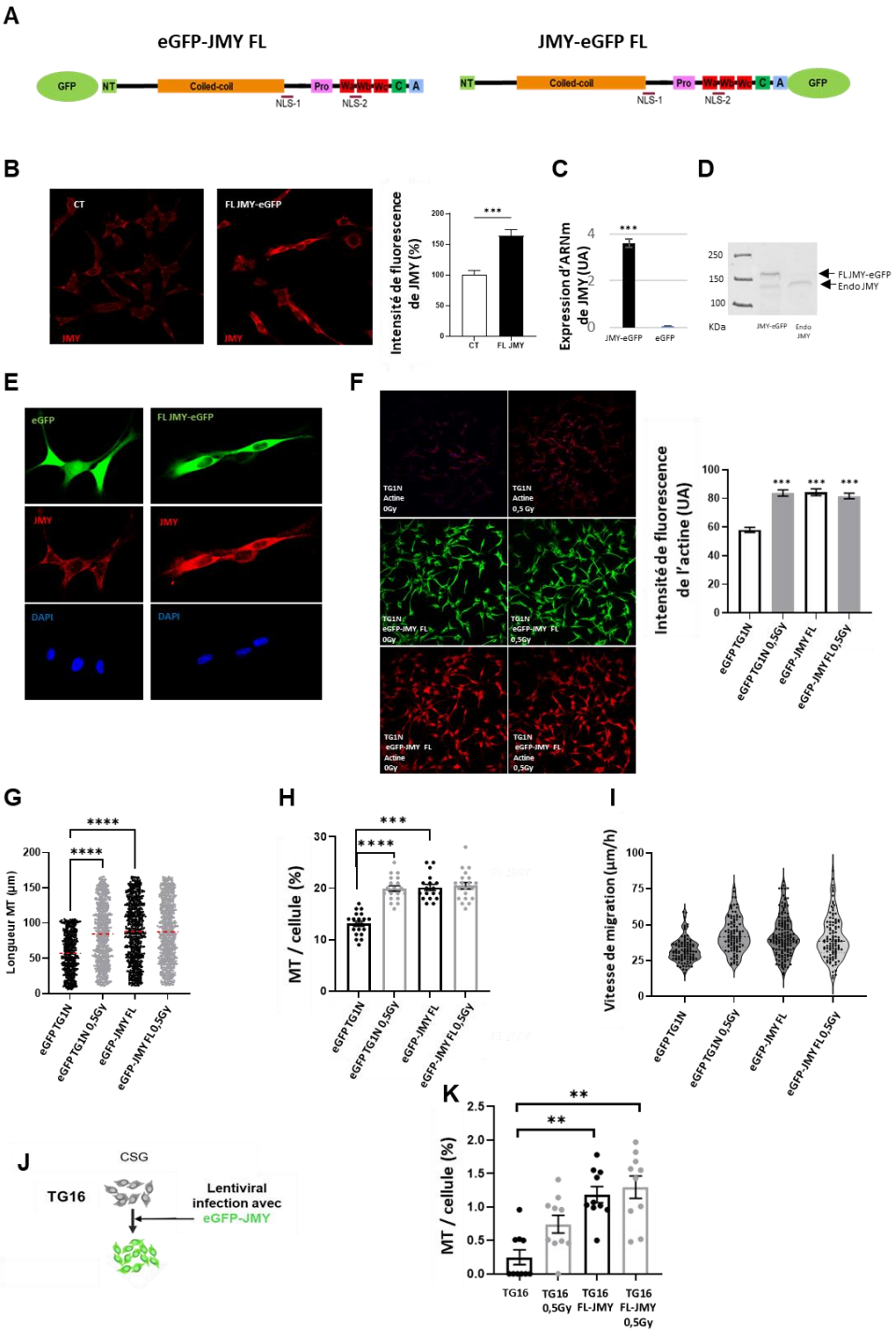


Figure 8 : La surexpression de JMY module la dynamique de l'actine, la formation des MT et la migration des cellules souches de glioblastome.

A : Schéma des constructions de JMY pleine longueur fusionnées à l'eGFP. A gauchen eGFP-JMY FL : la protéine fluorescente eGFP est fusionnée en N-terminal de JMY pleine longueur (FL). A droite, JMY-eGFP FL : l'eGFP est fusionnée en C-terminal de JMY. Les principaux domaines fonctionnels de JMY sont indiqués, incluant la région N-terminale (NT,vert), le domaine coiled-coil (orange), la région riche en proline (Pro, violet), les motifs WH2 (rouge), le domaine C et A ainsi que les signaux de localisation nucléaire (NLS1 et NLS2).

B : Immunofluorescence de JMY dans des cellules TG1N non transduites (Ct) ou exprimant le JMY-eGFP pleine longueur (FLJMY-eGFP). Le graphique de droite présente la quantification de l'intensité de fluorescence de JMY dans les cellules

TG1N témoins (Ct) comparés aux cellules TG1N surexpriment JMY-eGFP pleine longueur, montrant une augmentation significative du signal (*** p < 0,001).
C : Quantification par RT-qPCR du niveau d'expression de l'ARNm de JMY dans des cellules TG1N non transduites (Ct) ou exprimant le JMY-eGFP pleine longueur (eGFP). Les cellules exprimant la construction JMY-eGFP présentent une augmentation significative de l'expression de JMY (*** p < 0,001).
D : Validation de la surexpression de JMY par Western blot. La bande à environ 110 KDa correspond à la JMY endogène, tandis que la bande à environ 140 kDa correspond à la protéine JMY-eGFP pleine longueur surexprimée.
E : Images représentatives d'immunofluorescence dans des cellules TG1N transduites avec un eGFP seul (colonne gauche) ou surexprimant la JMY-eGFP pleine longueur (FL JMY-eGFP, colonne droite). La protéine surexprimée présente une localisation principalement cytoplasmique et est bien reconnue par l'anticorps dirigé contre JMY. Les noyaux sont contre-colorés au DAPI (bleu).
F : Images représentatives d'immunofluorescence de l'actine (phalloïdine, rouge) dans des cellules TG1N exprimant eGFP seul ou surexprimant eGFP-JMY pleine longueur (FL-eGFP-JMY), en conditions non irradiées (0 Gy) ou irradiées (0,5 Gy). Le graphique à droite représente la quantification de l'intensité de fluorescence de l'actine (unités arbitraires) dans les cellules TG1N contrôle (non transduites ou eGFP ??) et dans les cellules surexprimant FL-eGFP-JMY. La surexpression de JMY, en l'absence d'irradiation, induit une augmentation significative du signal d'actine comparable à celle observée après irradiation dans les cellules contrôle (**** p < 0,001).
G : Distribution de la longueur des MT dans les cellules TG1N contrôle et surexpriment eGFP-JMY plein longueur (eGFP-JMY-FL), en conditions non irradiées (0 Gy) ou irradiées (0,5 Gy). Chaque point correspond à une longueur de MT mesurée. Les lignes rouges pointillées indiquent la longueur moyenne des MT. Une différence significative est observée entre la condition contrôle et l'ensemble des autres conditions (**** p < 0,001).
H : Quantification du nombre moyen de MT par cellule (%) dans des cellules TG1N contrôle et surexprimant eGFP-JMY pleine longueur en conditions non irradiées (0 Gy) et irradiées (0,5 Gy). Chaque point correspond à une mesure de pourcentage pour un champ donnée. Une différence significative est observée entre la condition contrôle et l'ensemble des autres conditions (*** p < 0,001).
I : Distribution des vitesses de migration pour les cellules TG1N contrôle (GFP) et surexprimant eGFP-JMY plein longueur, en conditions non irradiées et irradiées. Chaque point correspond à vitesse moyenne de migration d'une cellule. Les lignes rouges pointillées indiquent la vitesse moyenne de migration pour chaque condition. Une différence significative est observée entre la condition contrôle et les autres conditions (*** p < 0,001)
J : Schéma expérimental de l'infection lentivirale des cellules souches de glioblastome TG16 avec la construction eGFP-JMY pleine longueur, visant à évaluer l'effet de la surexpression de JMY dans un second modèle de CSG ne formant pas spontanément de MT.
K : Quantification du nombre moyen de MT par cellule (%) dans des cellules TG16 contrôle et surexprimant eGFP-MY plein longueur. La surexpression de JMY est associée à une augmentation significative du nombre de MT (*** p < 0,001).

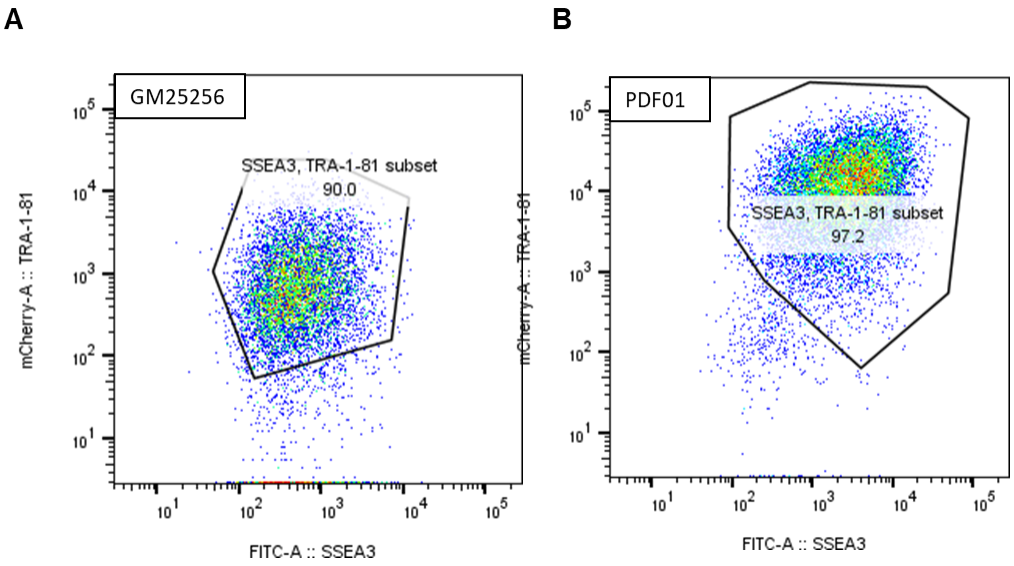


Figure Supplémentaire 1 : Validation du phénotype pluripotent des lignées iPSC GM25256 et PDF01 par cytométrie en flux

Analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs de pluripotence SSEA-3 (Stage-Specific Embryonic Antigen-3) et TRA-1-81 dans les lignées d'iPSC GM25256 (A) et PDF01 (B). Les dot plots montrent que 90 % des cellules GM25256 et 97,2 % des cellules PDF01 co-expriment SSEA-3 et TRA-1681, indiquant que la majorité de la population cellulaire conserve un phénotype pluripotent non différencié.

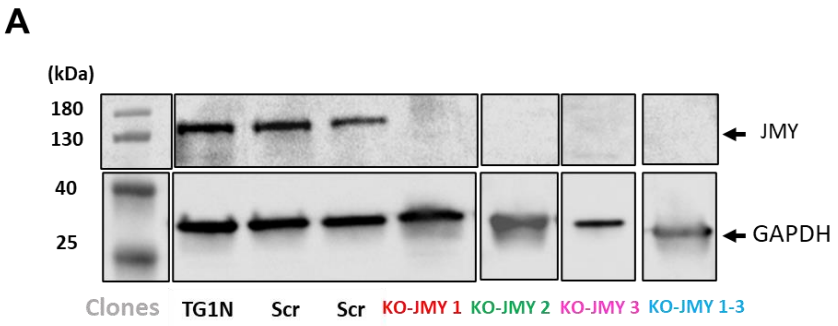


Figure Supplémentaire 2 : Validation par Western Blot de l'invalidation de JMY dans des clones générés par CRISPR-Cas9

À partir d'une population de cellules TG1N préalablement transduites avec un lentivirus codant pour la Cas9 et trois guides ARN ciblant spécifiquement JMY, une étape de clonage a permis d'isoler des lignées clonales indépendants (3 à 8 clones par construction). Les clones ont ensuite été analysés par Western Blot afin d'évaluer l'expression de JMY. Ici, est représenté uniquement les clones utilisés dans cette étude.

Dans les cellules TG1N non transduites ainsi que dans deux clones contrôles exprimant un gRNA scramble, JMY est détectée. En revanche, l'invalidation de JMY est confirmée dans les lignées clonales 282-2, 283-7, 284-14 et 285-11, pour lesquelles aucune expression de n'est observée.

Cette extinction est maintenue plus de 100 jours après la transduction, indiquant une perte stable et durable de l'expression de JMY au cours du temps.

Constructions	N° associé à la construction
TG1N-eGFP Scramble	281-6 et 281-11
TG1N-eGFP KO JMY 1	282-2
TG1N-eGFP KO JMY 2	283-7
TG1N-eGFP KO JMY 3	284 -14
TG1N-eGFP KO JMY 1+2+3	285-11

Tableau 1 : Quatre stratégies d'invalidation pour JMY ont été développées l'aide de lentivirus codant pour la CRISPR-Cas9 : la construction 1 (282), 2 (283) et 3 cible l'exon 1 de JMY à trois niveau différents tandis que la construction 4 (285) correspond à la combinaison des trois précédentes constructions. Une construction contrôle scramble (281) a été utilisé en parallèle. L'efficacité de l'invalidation de JMY a été évaluée par différentes approches incluant la RT-qPCR, l'immunofluorescence et le Western blot (cf Figure Supplémentaire 2).

IV. DISCUSSION

Le glioblastome est une tumeur hautement infiltrante, limitant l'efficacité des traitements et la résection complète. Malgré les traitements (Stupp et al., 2005 ; Stupp et al., 2009), la majorité des patients présentent une récidive locale (Langhans et al., 2023) suggérant des réponses adaptatives favorisant la dissémination tumorale (Karabacak et al., 2024). Cette dissémination cellulaire pourrait être d'autant plus délétère pour le patient qu'elle implique des cellules radiorésistantes en particulier les CSG. Ces cellules pourraient ainsi échapper progressivement au champ d'irradiation en activant des programmes migratoires, leur permettant de se disperser au-delà des volumes traités et de recoloniser les zones tumorales proche des bords de la résection. Dans ce contexte, l'irradiation ne se limiterait pas à un effet cytotoxique, mais pourrait également favoriser une redistribution spatiale des cellules tumorales, notamment au niveau du front d'invasion (Wang et al., 2013).

Dès lors, identifier les mécanismes sous-jacents à cette dynamique est essentiel pour améliorer les stratégies thérapeutiques et la compréhension des processus d'invasion constitue un préalable indispensable à l'étude de l'invasion radio-induite.

IV.1. Modèle d'organoïdes cérébraux et pertinence pour l'étude de l'invasion des CSG

Dans cette étude, nous avons utilisé des organoïdes cérébraux dérivés d'iPSC pour étudier l'invasion des CSG. Générés selon le protocole de Lancaster (2013), ils présentent une organisation neuroépithéliale structurée avec des rosettes de progéniteurs neuraux (SOX2+, Pax6+, Nestine+) et des neurones à différents stades de maturation (βIII-tubuline, DCX, MAP2, TBR1), cohérente avec des stades précoces du développement cérebral humain (Lancaster et al., 2014 ; Tidball et al., 2023).

La présence de niches prolifératives (Ki-67, PH3) associées à des neurones différenciés souligne l'hétérogénéité des organoïdes. La localisation des cellules Ki-67+ au sein des rosettes indique des niches prolifératives actives, tandis que les cellules PH3+ témoignent de divisions mitotiques en cours. Cette organisation, rappelant le cerveau en développement (Englund et al., 2005 ; Zhang et Jiao, 2015), est également décrite dans les organoïdes corticaux humains (Qian et al., 2016 ; Cho et al., 2021) et confère à ces modèles une forte pertinence pour l'étude du glioblastome et de ses interactions avec le microenvironnement (Hubert et al., 2016 ; Linkous et al., 2019 ; Jacob et al., 2020).

L'intégration des CSG dans ces organoïdes permet de modéliser une infiltration tumorale dans un tissu cérébral humain 3D, incluant l'invasion diffuse et les interactions neuronales observées chez les patients (Linkous et al., 2019 ; Goranci-Buzhala et al., 2020). Contrairement aux modèles 2D ou aux sphéroïdes tumoraux, les organoïdes offrent un environnement humain physiologique plus pertinent que les modèles murins qui sont basés sur des greffes intracérébrales de cellules tumorales issues de patients et qui restent limités, ne serait-ce que par des différences inter-espèces. Nous avons ainsi développé un modèle GLICO permettant d'étudier l'invasion des cellules souches de glioblastome dans un environnement cérébral humain tridimensionnel.

IV.2. L'irradiation induit une plasticité invasive radio-induite des CSG

L'un des résultats majeurs de cette étude est qu'une irradiation sublétale unique de 0,5 Gy augmente significativement l'invasion des CSG dans un tissu cérébral 3D humain. Dans ce modèle GLICO, les cellules TG1N irradiées avant la coculture ou une fois en contact avec l'organoïde

infiltrent plus profondément les organoïdes, quel que soit le mode d'invasion (individuelle ou gliosphère), la lignée d'iPSC utilisée pour générer les organoïdes (GM25256 ou PDF01) ou le contexte tissulaire (cérébral ou corticale). Cette augmentation s'accompagne d'une élévation significative de la vitesse d'invasion des CSG, révélant une plasticité invasive radio-induite des CSG dans un environnement cérébral 3D.

L'augmentation de l'invasion après irradiation est cohérente avec des travaux montrant que l'irradiation peut favoriser la migration et l'invasion tumorales (Moncharmont 2014). Dans le glioblastome, l'irradiation stimule la motilité et l'infiltration cellulaire de nombreuses lignées tumorale de glioblastome humain et de rongeurs (Wild-Bode et al., 2001 ; Park et al., 2006 ; Moncharmont 2014), un effet également décrit dans d'autres tumeurs solides, notamment les cancers du sein, du poumon, du foie et du pancréas, suggérant un mécanisme adaptatif au stress génotoxique (Moncharmont et al., 2014 ; Vilalta et al., 2016).

L'implication de nombreux mécanismes ou voies moléculaires peuvent expliquer l'augmentation de la migration tumorale après irradiation (Gupta et al., 2018). Elles sont d'autant plus nombreuses qu'elles peuvent dépendre du type cellulaire et/ou de la dose d'irradiation reçues.

L'irradiation induit la production d'espèce réactive d'oxygène (ROS), qui peuvent activer de nombreuses voies de signalisation (MAPK, NF-κB, PI3K/AKT, …) modulant l'expression de gènes impliqués dans la dynamique du cytosquelette, l'adhésion et la dégradation de la matrice (MMP-2, MMP-9). Dans différents modèles tumoraux, ces réponses favorisent la migration et l'invasion après irradiation, suggérant que le stress oxydatif contribue à un phénotype tumoral plus invasif (Wild-Bode et al., 2001 ; Park et al., 2006 ; Cheng et al., 2006, Perillo et al., 2020 ; Weinberg et Chandel, 2009).

En réponse à l'irradiation, les cascades MAPK (p38, ERK) et PI3K/AKT/mTOR, convergent vers l'activation de programmes favorisant la migration tumorale. L'activation des voies MAPK contribue à la stabilisation et à l'activation transcriptionnelle de HIF-1α, notamment via la déstabilisation de pVHL/PHD2 et la phosphorylation de cofacteurs tels que p300/CBP (Sofia Vala et al., 2010 ; Asuthkar et al., 2012 ; Kim et al., 2014), tandis que la voie PI3K/AKT/mTOR en augmente la traduction via l'activation de mTOR et de ses effecteurs, en particulier p70S6K (Conrad et al., 1999 ; Déry et al.,

2005 ; Gingras et al., 2001). Cette régulation suggère que HIF-1α pourrait agir en amont de JMY, contribuant à son induction. Dès lors, l'irradiation pourrait favoriser, *via* ces axes de signalisation, une activation de JMY conduisant à une reprogrammation du cytosquelette d'actine et à une augmentation de la motilité cellulaire. Un tel mécanisme permettrait de relier les voies de réponse au stress à l'émergence d'un phénotype invasif radio-induit, en particulier dans les CSG, dont la plasticité et la radiorésistance pourraient amplifier ces effets.

Au niveau effecteur, les métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 jouent un rôle central en facilitant la dégradation de la matrice extracellulaire et la progression des cellules dans le parenchyme cérébral (Badiga et al., 2011 ; Kegelman et al., 2017). Leur induction après irradiation, notamment *via* l'axe MDA-9/Syntenin, est directement associée à une augmentation de l'invasion, tandis que son inhibition limite significativement cette réponse (Kegelman et al., 2017). Parallèlement, des modifications des interactions cellule/cellule contribuent également à cette plasticité invasive. Les cadhérines, en particulier l'E- et la N-cadhérine, régulent l'adhésion cellulaire et leur déséquilibre est associé à un phénotype plus migratoire (D'Souza-Schorey, 2005 ; Jeanes et al., 2008). Dans ce contexte, Coutts et al. (2009) ont d'ailleurs mont que JMY module l'expression de ces cadhérines en lien avec la motilité cellulaire : son inhibition augmente leur expression et s'accompagne d'une diminution de la migration, tandis que sa surexpression favorise un phénotype plus migratoire (Coutts et al., 2009). Dès lors, il est possible que l'irradiation, *via* l'induction de stress oxydatif et l'activation de voies telles que HIF1α/JMY, favorise l'expression ou l'activité de JMY. Une telle régulation pourrait conduire à une reprogrammation coordonnée de l'actine et des interactions cellule/cellule, intégrant remodelage matriciel, perte d'adhésion et augmentation de la motilité.

De manière intéressante, la réponse aux dommages à l'ADN induits par l'irradiation peut également contribuer à cette réponse invasive. Les cassures double brin activent la DDR (DNA Damage Response), notamment la voie NHEJ dépendante de DNA-PK (Pannunzio et al., 2018 ; Chang et al., 2017). Au-delà de la réparation de l'ADN, l'activation de DNA-PK a été démontré comme capable de réguler des facteurs impliqués dans l'organisation de l'actine, l'adhésion cellulaire et les interactions avec la matrice extracellulaire, favorisant un phénotype plus migratoire et invasif après irradiation (Goodwin et al., 2016).

Dans ce contexte, JMY apparaît comme un acteur intéressant, en raison de sa double fonction dans la régulation de l'actine et dans la réponse aux dommages à l'ADN. En conditions basales ou en réponse à des doses modérées d'irradiation, JMY est majoritairement cytoplasmique et contribue à la dynamique du cytosquelette et à la motilité cellulaire. En revanche, en présence d'un stress génotoxique plus important, JMY transloque vers le noyau, où il agit comme cofacteur de p53 et participe à la réparation des cassures double brin (Rodriguez-Pastrana et al., 2023). Cette relocalisation suggère l'existence d'un switch fonctionnel dépendant de l'intensité du stress : à dose sublétal, JMY pourrait favoriser un programme pro-migratoire, tandis qu'à dose plus élevée, son accumulation nucléaire participerait prioritairement à la réponse de réparation. En cohérence avec cette hypothèse, il a été montré que l'effet pro-migratoire radio-induit observé à dose modérée disparaît à des doses plus élevées, notamment autour de 3 Gy (Gauthier et al., 2020). Ainsi, JMY pourrait constituer un point de bascule entre réponse adaptative invasive et réponse de réparation, reliant directement la DDR à la régulation de la migration radio-induite.

L'activation de voies de signalisation influençant le remodelage du cytosquelette est bien décrit dans la littérature (Ridley et al., 2003). L'irradiation induit une réorganisation de l'actine et des structures migratoires (lamellipodes, filopodes), favorisant la motilité cellulaire (Moncharmont et al., 2014). Dans le glioblastome, ces effets impliquent l'activation des voies intégrines/FAK et des GTPases Rho (RhoA, Rac1, Cdc42), qui contrôlent la dynamique de l'actine et l'invasion des cellules de glioblastomes (Zohrabian et al., 2009).

Nos données indiquent que l'irradiation induit un phénotype pro-invasif qui est porté par les cellules tumorales elles-mêmes, puisqu'il persiste lorsque les TG1N sont irradiées avant leur mise en co-culture. Cette observation suggère l'activation d'un programme adaptatif favorisant leur motilité et leur capacité d'infiltration. Pour autant, cette reprogrammation ne peut être pleinement appréhendée indépendamment du contexte tissulaire dans lequel elle s'exprime. En ce sens, l'utilisation d'organoïdes cérébraux permet d'évaluer comment ces propriétés intrinsèques se traduisent au contact d'un microenvironnement cérébral structuré.

Ces résultats montrent qu'une irradiation modérée induit une réponse adaptative favorisant l'invasion tumorale dans un modèle cérébral 3D. Cette plasticité pourrait contribuer à la progression du glioblastome après traitement et souligne l'importance d'en identifier les mécanismes,

notamment le rôle de JMY à l'interface entre réponse aux dommages à l'ADN et dynamique de l'actine.

IV.3. JMY comme régulateur de l'invasion radio-induite des CSG

Nos résultats montrent que l'invalidation de JMY abolit l'invasion radio-induite des CSG dans le modèle GLICO irradié. L'irradiation augmente la profondeur d'invasion des cellules TG1N contrôle, alors que cet effet disparaît dans les clones KO-JMY, dans deux systèmes indépendants (cellules dissociées et gliosphères). Ces données obtenues dans un microenvironnement cérébral 3D humain sont par ailleurs en accord avec les résultats obtenus précédemment au laboratoire dans des modèles de culture 2D (Gauthier et al., 2020).

En effet, les travaux antérieurs à mon arrivée au laboratoire montrent que l'irradiation stimule la migration des cellules TG1N et TG16 *via* une voie HIF1α-dépendante induisant l'expression de JMY. L'augmentation de JMY favorise son accumulation cytoplasmique et la polymérisation de l'actine, conduisant à une hausse de la motilité, avec une augmentation de F-actine également dépendante de JMY. Nos résultats s'inscrivent dans cette continuité et les étendent à un modèle plus physiologique : l'absence de JMY abolit l'invasion radio-induite dans un tissu cérébral 3D humain, suggérant que l'axe HIF1α/JMY/actine constitue un mécanisme central de la réponse invasive des CSG après irradiation.

L'utilisation d'organoïdes cérébraux humains constitue un atout majeur pour étudier ces mécanismes dans un environnement plus physiologique, en intégrant les interactions entre cellules tumorales et microenvironnement. Dans ce cadre, Ge et al. (2026) montrent que la perturbation de PTPRZ1, une phosphatase impliquée dans les interactions cellule/matrice, favorise des programmes invasifs. Leur approche repose sur une double invalidation, à la fois dans les cellules tumorales et dans des iPSC utilisées pour générer les organoïdes, mettant en évidence un rôle actif du microenvironnement dans la régulation de la migration. Bien que cette étude ne prenne pas en compte l'effet de l'irradiation, elle souligne l'importance du contexte tissulaire dans la modulation des comportements invasifs. À l'inverse, nos données suggèrent que la migration radio-induite des CSG repose principalement sur des mécanismes intrinsèques. En effet, l'augmentation de la migration est comparable lorsque les CSG sont irradiées avant leur intégration dans les organoïdes

ou lorsque l'irradiation est appliquée à l'ensemble du modèle GLICO, indiquant un effet largement indépendant du microenvironnement. Ces résultats doivent néanmoins être interprétés avec les limites du modèle utilisé, qui ne recapitule pas la complexité du microenvironnement tumoral, en particulier en l'absence de composantes vasculaires et immunitaires.

Dans ce contexte, nos observations mettent en évidence un rôle central de JMY dans cette réponse adaptative. L'invalidation de JMY dans les CSG diminue la migration et la formation de structures invasives, et abolit l'augmentation de la migration induite par l'irradiation. Ces résultats indiquent que JMY est un déterminant clé de la plasticité migratoire radio-induite, principalement *via* des mécanismes intrinsèques aux CSG.

IV.4. JMY contrôle la plasticité morphologique des CSG via la dynamique de l'actine et les microtubes tumoraux (MT)

Nos résultats montrent que l'irradiation induit un remodelage marqué de l'actine dans les CSG, caractérisé par une augmentation du signal d'actine, du pourcentage de cellules formant des MT et de leur longueur. Ces effets, observés dans les cellules TG1N témoins, disparaissent dans les clones KO-JMY, alors que le signal de tubuline reste inchangé, indiquant un remodelage spécifique de l'actine dépendant de JMY. En cohérence avec ses propriétés moléculaires (notamment sa capacité à activer le complexe Arp2/3 et à promouvoir la polymérisation de l'actine (Zuchero et al., 2009 ; Rottner et al., 2010) JMY apparaît comme un relais entre signaux intracellulaires et reprogrammation cytosquelettique.

Ces observations s'inscrivent dans le prolongement des travaux d'Osswald et al. (2015), qui ont identifié les MT comme des structures clés de l'invasion et de l'interconnexion des cellules de gliome. Alors que ces études ont principalement mis en évidence des déterminants structuraux tels que GAP43, nos résultats apportent un éclairage mécanistique complémentaire en identifiant JMY comme un régulateur nécessaire à leur induction en contexte d'irradiation.

Cette interprétation est cohérente avec des travaux récents montrant que les MT reposent sur une organisation coordonnée du cytosquelette, impliquant à la fois microtubules et actine (Wang et al., 2022). Dans ce cadre, l'absence de modification du signal de tubuline dans nos conditions

expérimentales suggère que JMY agit sur la composante actinique des MT. Il pourrait ainsi intervenir à un stade précoce de leur formation, en contrôlant la génération et l'extension de protrusions membranaires, tandis que d'autres facteurs contribueraient à leur stabilisation et à leur fonctionnalité.

Par ailleurs, Joseph et al. (2022) ont montré que la voie TGF-β régule l'induction des MT et leur association à un phénotype invasif, soulignant que leur formation repose sur des programmes de signalisation actifs (Joseph et al., 2022). Nos données suggèrent que JMY pourrait agir en aval de ces signaux en convertissant ces programmes de signalisation en modifications du cytosquelette d'actine nécessaires à la formation des MT.

Ainsi, l'irradiation n'apparaît pas uniquement comme un facteur de sélection de réseaux tumoraux préexistants, mais comme un inducteur actif de leur formation ou de leur extension. Dans ce modèle, la formation des MT repose sur une organisation hiérarchique associant voies de signalisation amont et effecteurs cytosquelettiques, positionnant JMY comme un acteur central reliant stress radiatif, dynamique de l'actine et plasticité invasive.

La surexpression de JMY suffit à reproduire ces phénotypes radio-induits, augmentant le signal d'actine, la formation et la longueur des MT à des niveaux comparables à l'irradiation, sans effet additif. Cette observation s'inscrit dans la continuité des travaux montrant que l'irradiation active l'axe HIF1α/JMY, conduisant à une augmentation de la migration et de la polymérisation de l'actine (Gauthier et al., 2020), et étend ce cadre à une reprogrammation morphologique impliquant les MT.

Enfin, dans la lignée TG16, qui ne forme pas spontanément de MT à l'état basal, l'irradiation seule est inefficace, alors que la surexpression de JMY suffit à induire ces structures, confirmant son rôle central.

Un point de référence important est fourni par Gauthier et al. 2020, qui montre qu'une irradiation de 0,5 Gy augmente la migration et l'invasion dans TG1N et TG16, avec un effet plus marqué dans TG1N *via* l'activation de l'axe ROS/HIF1α/JMY et le remodelage de l'actine F. Il existe donc bien un effet de l'irradiation dans TG16. Cependant, ces analyses sont réalisées sur une sous-population mésenchymateuse, alors que notre étude repose sur un bulk TG16 probablement hétérogène, combinant des états migratoires distincts (amiboïde et mésenchymateux). Cette différence de

composition peut expliquer l'absence d'effet global de l'irradiation sur la longueur des MT dans nos conditions. Dans ce contexte, le fait que l'irradiation seule n'induise pas d'allongement des MT, alors que la surexpression de JMY le permet, suggère que le signal radio-induit est insuffisant pour imposer ce programme à l'ensemble de la population cellulaire des TG16. En revanche, l'augmentation forcée de JMY dépasse ce seuil et révèle la capacité intrinsèque des cellules TG16 à former ces structures, indiquant que JMY constitue ici un effecteur plus puissant que l'irradiation. Cette observation s'interprète selon des modes migratoires distincts. La migration mésenchymateuse, dépendante des protrusions d'actine et des voies Rac1/Cdc42, est compatible avec l'activation de l'axe HIF1α/JMY, tandis que la migration amiboïde, reposant sur la contractilité RhoA/ROCK/myosine II, mobilise moins ce type d'organisation cytosquelettique (Zhong et al., 2010 ; Oppel et al., 2011 ; Alfonso et al., 2017). Dès lors, seule la fraction mésenchymateuse du bulk serait réceptive au signal radio-induit, alors que la fraction amiboïde y répondrait peu, conduisant à un effet moyen atténué.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats indique que JMY contrôle la plasticité morphologique radio-induite des CSG en reliant la réponse au stress à la dynamique de l'actine et à la formation des MT. En favorisant l'établissement de réseaux tumoraux interconnectés, JMY pourrait contribuer à l'invasion diffuse et à la résistance aux traitements, et apparaît comme un régulateur clé de la progression infiltrante après irradiation.

IV.5. Limites de l'étude

Malgré son intérêt, le modèle organoïde utilisé présente certaines limites. S'il permet de reproduire une organisation neuroépithéliale 3D et d'étudier les interactions entre cellules tumorales et tissu cérébral humain dans un contexte plus physiologique que les cultures 2D, il ne recapitule pas l'ensemble de la complexité du microenvironnement cérébral retrouvé dans un cerveau adulte.

Les organoïdes utilisés dans cette étude correspondent à un stade relativement précoce de développement (J30) et reproduisent principalement une organisation neuroépithéliale caractérisée par la présence de progéniteurs neuraux et de neurones encore immatures. À l'inverse,

des cultures prolongées au-delà de 100-300 jours acquièrent une diversité cellulaire plus importante, avec une augmentation des neurones matures, l'apparition d'astrocytes et, plus tardivement, de cellules oligodendrogliales, ainsi qu'un degré plus avancé de maturation synaptique (Lancaster et al., 2013 ; Velasco et al., 2019 ; Gordon et al., 2021 ; Matsui et al., 2018). Dès lors, les organoïdes utilisés ici modélisent un tissu cérébral en développement plutôt qu'un tissu adulte. Toutefois, même à des stades tardifs, les organoïdes cérébraux standards restent incomplets (Kim et al., 2025). En particulier, l'absence de vascularisation fonctionnelle et la représentation limitée ou variable de la microglie restreignent leur capacité à reproduire pleinement le microenvironnement cérébral adulte (Ormel et al., 2018 ; Cakir et al., 2019). De plus, la maturation prolongée s'accompagne de contraintes intrinsèques, notamment l'apparition de zones hypoxiques et nécrotiques au centre des organoïdes (Navarro et al. 2025).

Les organoïdes générés selon le protocole de Lancaster ne contiennent ni microglie ni vascularisation fonctionnelle, deux composantes clés impliquées dans la progression des gliomes (Lancaster et al., 2013). Contrairement aux modèles *in vivo* de gliomes dans lesquels ces composantes du microenvironnement, notamment la microglie et la niche vasculaire jouent un rôle central dans la progression tumorale et le maintien des cellules souches (Hambardzumyan et al., 2016 ; Calabrese et al., 2007). La microglie et les macrophages associés aux tumeurs peuvent en effet moduler l'invasion des cellules tumorales et contribuer à l'établissement d'un microenvironnement immunosuppresseur favorable à la progression. En effet, les limites des organoïdes cérébraux conventionnels ont conduit au développement de modèles vascularisés visant à réduire l'hypoxie et la nécrose centrale, qui limitent leur maturation tumorale (Ormel et al., 2018 ; Cakir et al., 2019 ; Raguin et al., 2024). Une revue générale souligne que la vascularisation est essentielle pour assurer l'apport en oxygène et nutriments ainsi que l'élimination des déchets, et repose sur des approches telles que la co-culture, les facteurs pro-angiogéniques, la microfluidique ou les systèmes organ-on-chip (Zhao et al., 2021). Dans les organoïdes cérébraux, l'absence de vascularisation fonctionnelle reste une limitation majeure, affectant les interactions neurovasculaires et la formation de structures de type barrière hémato-encéphalique (BHE) (Kistemaker et al., 2025 ; Rizzuti et al., 2024). Différentes stratégies ont ainsi été développées, incluant la co-culture avec des cellules endothéliales, la programmation transcriptionnelle *via* ETV2,

la fusion d'organoïdes ou encore des approches de bioingénierie (Song et al., 2026). Sur le plan expérimental, l'induction endothéliale *via* ETV2 permet la formation de réseaux vasculaires associés à une meilleure maturation et à des propriétés de type BHE (Cakir et al., 2019). La fusion d'organoïdes cérébraux et vasculaires génère des structures intégrées incluant progéniteurs neuraux, microglie et caractéristiques neurovasculaires (Sun et al., 2022), tandis que des organoïdes corticaux vascularisés peuvent être maintenus à long terme (Shi et al., 2020). Des modèles récents dérivés d'iPSC confirment l'intérêt de cette vascularisation pour l'étude de la BHE et des pathologies (Sun et al., 2022). Le développement d'un modèle d'organoïde complexe incluant une composante vasculaire et une composante immunitaire décrit par Raguin et al., (sous presse, Annexe) auquel je suis associée, constitue une avancée majeure en intégrant vascularisation, microglie et niche tumorale. Toutefois, ces systèmes restent limités par une vascularisation partiellement fonctionnelle, notamment en l'absence de perfusion complète.

Une seconde limite de nos modèles GLICO concerne l'utilisation de lignées primaires de CSG (TG1N, TG16), qui bien que conservant des propriétés moléculaires des tumeurs d'origine (Silvestre et al., 2011), ne permettent pas à elles seules de refléter l'hétérogénéité des glioblastomes puisqu'une sélection a certainement eu lieu au cours de leur mise en culture mais également au cours de leur culture *in vitro*. En effet, une tumeur présente une forte diversité génétique et phénotypique (Patel et al., 2014 ; Neftel et al., 2019). C'est pourquoi, l'utilisation d'un plus large panel de lignées dérivées de patients permettrait de mieux prendre en compte cette variabilité et de valider la généralité des mécanismes observés. Il serait par ailleurs intéressant de générer des GLICO à partir de cellules issues directement de tumeur en minimisant le temps de culture entre la biopsie et la coculture avec les organoïdes.

Une autre limite à prendre en compte concerne les conditions d'irradiation, limitées ici à une dose unique de 0,5 Gy pour étudier des réponses précoces sans forte cytotoxicité. En effet, la radiothérapie du glioblastome repose sur des schémas fractionnés (2 Gy par fraction, dose totale de 60 Gy) (Stupp et al., 2005), et plusieurs études ont montré que la réponse des cellules de gliome dépend fortement de la dose et du mode d'exposition, avec notamment une augmentation de la motilité après irradiation sublétale (Wild-Bode et al., 2001 ; Moncharmont et al., 2014). Il sera donc important d'évaluer si les mécanismes identifiés, notamment impliquant JMY et les MT, se

retrouvent dans des conditions plus proches du contexte thérapeutique. Des expériences comparant irradiation unique et fractionnée (par exemple 2 Gy répétés) permettraient d'évaluer si l'augmentation de la migration, de la formation des MT et de la connectivité cellulaire observée ici est maintenue ou amplifiée au cours du temps. Une analyse cinétique, à différentes échelles temporelles après irradiation, permettrait de distinguer des réponses précoces d'une reprogrammation plus stable des cellules tumorales. L'intégration de conditions contrôle et d'invalidation de JMY dans ces schémas expérimentaux serait essentielle pour déterminer si JMY constitue un médiateur général de la plasticité radio-induite des CSG, au-delà des doses modérées utilisées dans ce travail. Par ailleurs, l'ajout de données fonctionnelles telles que la survie clonogénique, la dynamique des dommages à l'ADN (γH2AX) ou encore l'activation de l'apoptose permettrait de relier directement les modifications de migration et de réseaux MT à la capacité de survie post-irradiation. Cette approche est particulièrement pertinente dans la mesure où les réseaux de cellules tumorales interconnectées par des MT ont été associés à la résistance thérapeutique et à la persistance tumorale (Osswald et al., 2015). Enfin, l'intégration du témozolomide dans ces schémas expérimentaux permettrait de se rapprocher encore davantage du contexte clinique et d'évaluer si l'axe JMY contribue spécifiquement à la réponse à l'irradiation ou plus largement à l'adaptation au traitement combiné. Dans ce contexte, plusieurs travaux récents indiquent que la réponse à l'irradiation dépend du stade de maturation des organoïdes cérébraux. Les organoïdes jeunes (J14) apparaissent plus sensibles à l'irradiation, avec une réponse aux dommages de l'ADN et une altération de la croissance plus marquées, tandis que les organoïdes plus âgés (J56) présentent une réponse plus atténuée (Ribeiro et al., 2025). Dans ces modèles tardifs, l'irradiation induit principalement des effets de toxicité tissulaire, incluant des dommages à l'ADN et une perte de cellules neuronales et gliales, plutôt qu'un remaniement global de l'organisation du tissu (Lundberg et al., 2025). Par ailleurs, l'interprétation de ces effets est compliquée par la présence de phénomènes intrinsèques aux organoïdes âgés, tels que la nécrose centrale liée aux limitations de diffusion, mais également par l'induction directe de dommages à l'ADN, d'apoptose et de pertes cellulaires après irradiation, comme rapporté dans des organoïdes cérébraux matures (Qian et al., 2016). À cela s'ajoutent les effets directs de l'irradiation, incluant l'induction de dommages à l'ADN, l'activation de l'apoptose et des pertes cellulaires, observés dans plusieurs modèles d'organoïdes cérébraux irradiés (Shimada et al., 2025 ; Bender et al., 2026). Dans

ces conditions, il devient difficile de dissocier les altérations liées à la maturation intrinsèque du modèle de celles spécifiquement induites par l'irradiation. Cependant, plusieurs études montrent que les organoïdes âgés irradiés présentent des altérations spécifiques qui ne peuvent être attribuées à la seule maturation du modèle. Ainsi, l'irradiation d'organoïdes à des stades tardifs (J80) induit la formation de structures aberrantes, associées à l'expression de marqueurs épithéliaux spécifiques (AQP1, CLDN3) et à une diminution des marqueurs neuronaux tels que MAP2, traduisant une reprogrammation cellulaire plutôt qu'un simple effet dégénératif lié à l'âge (Bender et al., 2026). De manière complémentaire, l'irradiation d'organoïdes dérivés d'iPSC entraîne une réduction de la croissance, une augmentation de l'apoptose et des défauts de développement cortical, effets en partie réversibles par des antioxydants, suggérant l'implication de mécanismes spécifiques liés au stress oxydatif radio-induit (Shimada et al., 2025).

Dès lors, l'utilisation d'organoïdes plus matures dans notre modèle, y compris après invasion par des CSG, n'aurait pas nécessairement conduit à des modifications plus marquées. Néanmoins, la réponse reste fortement dépendante de la dose : à 0,5 Gy, les dommages à l'ADN sont détectables mais transitoires, tandis qu'à 2 Gy et au-delà, ils persistent et s'accompagnent d'effets cellulaires plus marqués (Ribeiro et al., 2025 ; Oyefeso et al., 2023). Plus largement, l'augmentation de la dose renforce l'accumulation de cassures double brin, l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN et l'induction de l'apoptose, en particulier dans les cellules en division (Moncharmont et al., 2014). Ainsi, les effets limités observés à 0,5 Gy dans notre modèle pourraient refléter un seuil insuffisant plutôt qu'un effet lié à la maturation des organoïdes. L'utilisation de doses plus élevées ou de schémas fractionnés, plus proches des conditions cliniques (Stupp et al., 2005), apparaît donc nécessaire pour mieux caractériser les mécanismes impliqués, notamment ceux dépendants de JMY et de la dynamique des MT.

Ainsi, si des organoïdes plus matures permettent théoriquement de mieux se rapprocher de la complexité du tissu cérébral, ils introduisent également des biais liés à leur vieillissement *in vitro*. En particulier, à mesure que les organoïdes dépassent plusieurs semaines à mois de culture (J60-J80), des limitations de diffusion en oxygène et en nutriments conduisent à l'apparition de régions centrales hypoxiques, voire nécrotiques, en l'absence de vascularisation fonctionnelle (Qian et al., 2016 ; Giandomenico et al., 2019 ; Cakir et al., 2019). Ces phénomènes contribuent à une

hétérogénéité structurelle et fonctionnelle accrue, susceptible d'interférer avec l'interprétation des réponses cellulaires. À l'inverse, l'utilisation d'organoïdes plus précoces constitue un bon compromis expérimental permettant d'étudier de manière plus contrôlée les interactions entre CSG, tissu neural humain et irradiation, tout en limitant ces effets confondants.

Néanmoins, ce choix doit être interprété avec prudence dans le contexte du glioblastome, qui est une tumeur de l'adulte (Ostrom et al., 2023). Les organoïdes précoces reproduisent principalement des états développementaux immatures, caractérisés par une forte proportion de progéniteurs neuraux et une organisation tissulaire encore incomplète (Lancaster et al., 2013 ; Velasco et al., 2019). À l'inverse, des organoïdes plus matures présentent une diversification cellulaire accrue, incluant notamment des astrocytes plus abondants et des réseaux neuronaux plus organisés, se rapprochant davantage du tissu cérébral adulte (Velasco et al., 2019 ; Gordon et al., 2021).

Ainsi, le choix d'un stade de maturation intermédiaire apparaît comme un compromis entre contrôle expérimental et pertinence physiopathologique. Il permet de limiter les artefacts liés à la nécrose centrale tout en conservant une complexité suffisante pour modéliser les interactions tumorales, bien que certaines composantes clés du microenvironnement adulte, telles que la vascularisation ou les cellules immunitaires, restent absentes.

Enfin, bien que JMY soit identifié comme un régulateur clé de la plasticité radio-induite des CSG, ses mécanismes d'action en aval restent à préciser. Nos résultats suggèrent un rôle dans le remodelage de l'actine et l'extension des MT, mais les voies reliant irradiation et activation de JMY restent à définir. Les ROS, impliquées dans la réponse aux radiations et la dynamique du cytosquelette (Spitz et al., 2004 ; Azzam et al., 2012), pourraient jouer un rôle central. Dans les cellules souches neurales, le statut redox régule quiescence, prolifération et différenciation (Le Belle et al., 2011 ; Paik et al., 2009), suggérant qu'après irradiation, les ROS pourraient réactiver dans les CSG des programmes de plasticité favorisant motilité et connectivité tumorale. JMY pourrait ainsi agir comme un point d'intégration entre stress génotoxique et remodelage cytosquelettique, contribuant à l'extension des MT et à l'organisation en réseaux tumoraux (Osswald et al., 2015 ; Weil et al., 2017). Par ailleurs, cette fonction ne semble pas limitée au seul contrôle de l'actine. Des données antérieures, notamment issues du travail de Coutts, suggèrent que JMY pourrait également moduler l'expression de molécules d'adhérence telles que l'E-cadhérine et la N-cadhérine. Un tel lien est cohérent avec

l'idée que les changements de dynamique cytosquelettique s'accompagnent d'une reprogrammation des propriétés d'adhérence cellulaire. Dans le contexte des CSG, cela pourrait participer à une transition vers des états plus permissifs à la migration collective et à l'établissement de connexions intercellulaires stables. Dès lors, il serait pertinent d'explorer cette hypothèse dans le modèle GLICO, en comparant des CSG exprimant JMY WT à des CSG déficientes pour JMY, en conditions basales et après irradiation. L'analyse conjointe de l'expression et de la localisation des cadhérines permettrait de déterminer si JMY contribue, au-delà du remodelage de l'actine, à une réorganisation coordonnée des systèmes d'adhérence soutenant l'extension des MT et l'organisation en réseaux tumoraux.

Dans ce contexte, nos résultats obtenus dans les NPC apportent un éclairage mécanistique direct en faveur de l'implication de l'axe ROS/HIF1α/JMY dans la réponse à l'irradiation. Nous montrons qu'une irradiation à dose modérée (0,5 Gy) induit une augmentation des ROS, nécessaire à l'activation de la migration, et associée à une stabilisation de HIF1α et à une induction transcriptionnelle de JMY. L'accumulation cytoplasmique de JMY, notamment au front de migration et dans les protrusions, favorise le remodelage de l'actine. L'inhibition des ROS (NAC) bloque l'induction de JMY et la migration, tandis que l'extinction de HIF1α empêche l'augmentation de JMY, indiquant que les ROS agissent en amont de HIF1α, lui-même en amont de JMY. De plus, la déplétion de JMY supprime spécifiquement la migration et l'invasion induites par l'irradiation, sans affecter la migration basale. Ces résultats définissent un modèle dans lequel les ROS agissent comme signal initial, HIF1α comme relais transcriptionnel, et JMY comme effecteur cytosquelettique contrôlant la motilité. Cette organisation est cohérente avec les données montrant que les ROS stabilisent HIF1α (Spitz et al., 2004 ; Azzam et al., 2012) et que JMY régule la nucléation de l'actine. Appliqué aux CSG, ce mécanisme suggère que l'irradiation réactive des programmes de plasticité issus des cellules souches neurales, favorisant le remodelage de l'actine, l'extension des MT et leur organisation en réseaux.

Dès lors, cibler l'axe ROS/HIF1α/JMY pourrait représenter une stratégie thérapeutique pertinente pour limiter la connectivité des CSG induites par la radiothérapie, et ainsi réduire les mécanismes de résistance et de récidive. Bien que cette étude identifie JMY comme un régulateur central de la plasticité radio-induite des CSG, l'utilisation de modèles plus complexes, de cellules dérivées de

patients et l'identification de ses voies seront essentielles pour mieux comprendre l'adaptation du glioblastome et sa récidive.

IV.6. Conclusion

Le glioblastome se caractérise par une forte capacité d'invasion du parenchyme cérébral et par une récidive quasi systématique après traitement. Dès lors, comprendre les mécanismes d'adaptation des cellules souches de glioblastome (CSG) aux thérapies constitue un enjeu central. Dans ce travail, nous avons développé un modèle 3D d'organoïdes cérébraux dérivés d'iPSC, permettant d'étudier l'invasion des CSG dans un environnement tissulaire humain pertinent. Ce modèle GLICO reproduit une organisation compatible avec des stades du développement cérébral et offre un cadre adapté à l'analyse des interactions entre cellules tumorales et tissu neural. L'utilisation de ce modèle montre qu'une irradiation sublétale induit une plasticité invasive des CSG, caractérisée par une augmentation conjointe de la profondeur d'infiltration et de la vitesse de migration au sein du tissu cérébral. Cette réponse adaptative s'accompagne d'un remodelage du cytosquelette d'actine et d'une augmentation de la formation ainsi que de l'extension des microtubes tumoraux (MT), structures impliquées dans la connectivité et la résistance des gliomes.

Nos résultats identifient JMY comme un régulateur central de cette plasticité radio-induite. Son invalidation abolit l'augmentation de l'invasion et l'extension des MT observées après irradiation, tandis que sa surexpression est suffisante pour reproduire ces phénotypes en l'absence d'irradiation. Ces données indiquent que JMY agit comme une interface entre la réponse au stress génotoxique et la dynamique du cytosquelette d'actine, permettant aux CSG d'adopter un phénotype plus migratoire et plus connecté.

Ainsi, ce travail met en évidence un programme adaptatif radio-induit dans lequel JMY contrôle à la fois la migration, l'invasion et la plasticité morphologique des cellules tumorales. Dans le contexte du glioblastome, où l'infiltration diffuse du tissu cérébral limite fortement l'efficacité des traitements, ces résultats suggèrent que cibler JMY, ou les voies qu'elle régule, pourrait constituer une stratégie pertinente pour restreindre l'adaptation invasive des cellules tumorales après radiothérapie.

IV.7. Perspectives

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives notamment pour mieux comprendre l'adaptation des CSG au stress radiatif et évaluer JMY comme cible thérapeutique.

Les interactions protéine/protéine impliquant JMY restent encore peu caractérisées, en particulier dans le compartiment cytoplasmique. Une approche de purification d'affinité couplée à la spectrométrie de masse a permis d'identifier un nombre limité de partenaires potentiels, incluant notamment VAP-A (Vesicle-associated membrane protein-associated protein A), SERCA2 (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase 2) et RHEB (Ras homolog enriched in brain) (Schlüter et al., 2014). Ces protéines sont majoritairement associées aux membranes du réticulum endoplasmique et du Golgi, suggérant une implication de JMY dans des processus liés au trafic vésiculaire. Ces données reposent essentiellement sur une approche protéomique identifiant des complexes multiprotéiques, sans démontrer des interactions directes. À ce jour, seule l'interaction avec VAP-A a été validée expérimentalement (Schlüter et al., 2014). Dans ce cadre, une meilleure caractérisation des partenaires directs de JMY apparaît essentielle pour comprendre comment cette protéine couple remodelage de l'actine, organisation membranaire et, potentiellement, plasticité cellulaire dans des contextes physiopathologiques tels que le glioblastome.

Une autre perspective concerne l'identification des mécanismes d'activation de JMY après irradiation. Des approches transcriptomiques ou protéomiques permettraient d'identifier les voies aussi bien en aval qu'en amont de JMY et de préciser son rôle dans la réponse au stress radiatif. Dans ce but, nous avons initié au laboratoire, deux approches transcriptomiques complémentaires qui devraient permettre de préciser ces mécanismes. D'une part, des CSG TG1N ont été mises en co-culture dans des organoïdes cérébraux pendant 6 jours, avant d'être irradiés ou non. Après un total de 10 jours d'invasion (soit 4 jours post-irradiation ou non), les GLICO ont été dissociés, et les cellules TG1N-eGFP ont été triées en cytométrie en flux afin d'étudier leurs signatures transcriptomiques dans les différentes conditions. A ce jour, nous sommes dans l'attente des données nécessaires à l'analyse. Cette approche devrait permettre d'identifier les programmes transcriptionnels activés dans les CSG et de déterminer comment l'irradiation module ces réponses dans un contexte d'invasion dans des organoïdes cérébraux.

En parallèle, nous avons menés une seconde étude sur des CSG TG1N cultivées *in vitro*. Différents cellules TG1N ont été inclus dans cette étude : des cellules TG1N contrôles, des TG1N KO-JMY et des cellules TG1N surexprimant JMY. Ces différents groupes de cellules ont ensuite été irradiées (0.5 Gy) ou non, puis collectées pour analyser et comparer leur transcriptome. Notre objectif est ici de comparer les signatures induites par la perte ou le gain de fonction de JMY sans et après irradiation. L'analyse de ces données pourraient permettre d'identifier des voies spécifiques à l'irradiation impliquant JMY mais également indépendantes de JMY. Ces approches devraient aussi permettre de mieux positionner JMY au sein du réseau de signalisation activé après irradiation, et de préciser s'il agit comme effecteur central, comme modulateur partiel, ou comme point de convergence entre plusieurs voies.

Dans les CSG, le mécanisme de polymérisation de l'actine *via* le complexe Arp2/3, activé notamment par JMY pourrait être détourné pour soutenir l'extension des MT, suggérant que ces structures reposent sur une organisation spécifique des réseaux d'actine branchés dépendante d'Arp2/3. Cette hypothèse est renforcée par des travaux récents montrant que des MT assurant la connectivité entre cellules cancéreuses reposent sur une dynamique actine dépendante contrôlée par le complexe Arp2/3 (Latario et al., 2020). Dès lors, l'irradiation pourrait activer un programme cytosquelettique dans lequel JMY agit comme un nœud entre les signaux de stress et la polymérisation de l'actine. En aval, l'activation d'Arp2/3 permettrait non seulement la génération de forces protrusives, mais aussi l'organisation spatiale des réseaux d'actine nécessaires à la stabilisation de structures membranaires, contribuant à la connectivité cellulaire et à l'invasion, comme suggéré dans ces réseaux tumoraux interconnectés (Latario et al., 2020). Ainsi, JMY ne se limiterait pas à un rôle d'effecteur de la motilité, mais participerait à une organisation coordonnée du cytosquelette, intégrant polarité, dynamique et architecture des réseaux d'actine. Dans cette perspective, cibler l'axe JMY/Arp2/3 pourrait permettre de perturber spécifiquement les architectures cytosquelettiques associées à la plasticité invasive des CSG.

Bien que les organoïdes cérébraux dérivés d'iPSC constituent des modèles pertinents pour étudier l'invasion tumorale dans un contexte humain tridimensionnel (Lancaster et Knoblich, 2014 ; Jacob et al., 2020 ; Raguin et al., 2025), il sera nécessaire d'évaluer ce phénomène d'invasion radio induit des CSG dans des organoïdes cérébraux plus complexes dans lequel une composante vasculaire et

une composante immunitaire pourraient être présent. Comme déjà évoqué, j'ai pu, au cours de ma thèse, aider au développement d'un modèle organoïde complexe ayant ces deux composantes cellulaires vasculaire et immunitaire qui a donné lieu à une publication Raguin et al. (in press, Annexe) et présentée en annexe. Ce nouveau type d'organoïdes complexes offrent une perspective pertinente pour étudier la migration des CSG dans un environnement plus physiologique. En effet, les cellules de glioblastome présentent un mode d'invasion, caractérisée par une migration vers les vaisseaux puis le long de ceux-ci (Seano et al., 2020 ; Baker et al., 2014 ; Alieva et al., 2019). Ce processus est soutenu par des interactions avec l'endothélium, des signaux chimiotactiques tels que l'axe CXCR4/SDF-1α et des remaniements dynamiques du cytosquelette d'actine (Winkler et al., 2009 ; Seano et al., 2020 ; Tata et al., 2015). Par ailleurs, la composante inflammatoire pourrait moduler les propriétés migratoires des CSG. Ainsi, la microglie et les macrophages sécrètent des cytokines activant STAT3 induisant un état mésenchymateux pro-invasif (Hara et al., 2021 ; Yuan et al., 2023). Dans des organoïdes complexes tels que ceux développés par Raguin et al. (in press, 2026), ces interactions permettent de former une niche neurovasculaire inflammatoire pouvant favoriser la dispersion tumorale. Dès lors, il sera pertinent d'explorer la migration des CSG dans ces systèmes intégrés, afin de déterminer si les mécanismes que nous avons décrits dans des modèles simplifiés sont maintenus ou modulés dans un contexte multicellulaire plus proche de la physiopathologie du glioblastome

En identifiant JMY comme un régulateur central du remodelage de l'actine, de la formation des MT et de l'invasion, notre étude suggère que son inhibition pourrait dissocier les effets cytotoxiques de la radiothérapie de ses effets pro-invasifs. Cibler la dynamique de l'actine constitue ainsi une stratégie prometteuse, plusieurs études montrant une réduction de la migration tumorale après son inhibition (Ilatovskaya et al., 2013 ; Ge et al., 2026).

Dans l'ensemble, ces perspectives soulignent que JMY, à l'interface entre stress génotoxique et plasticité cytosquelettique, pourrait éclairer les mécanismes d'adaptation du glioblastome aux traitements. Leur compréhension pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies visant à limiter l'invasion tumorale et la récidive après radiothérapie.

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce travail de thèse, je me suis attachée à comprendre comment une irradiation sublétale reprogramme la dynamique de migration cellulaire, à la fois dans un contexte physiologique et tumoral. J'ai ainsi analysé l'impact d'une irradiation modérée sur les propriétés migratoires et invasives des progéniteurs neuraux (NPC) humains et murins, en identifiant les mécanismes moléculaires impliqués, en particulier l'axe ROS/HIF1α/JMY. Cette approche a été étendue au glioblastome, en étudiant la plasticité invasive des cellules souches de glioblastome (CSG) dans des modèles tridimensionnels de coculture (GLICO) reproduisant un environnement cérébral humain.

Nos résultats montrent qu'une irradiation sublétale induit une augmentation significative de la migration et de l'invasion des NPC, sans affecter la différenciation, le cycle cellulaire ou l'apoptose à dose modérée. Cette réponse est dépendante de la dose : des doses modérées favorisent la motilité cellulaire, tandis que des doses plus élevées (3 Gy) altèrent le potentiel clonogénique, suggérant un basculement entre adaptation migratoire et réponse cytotoxique. Sur le plan mécanistique, nos données mettent en évidence une cascade initiée par les ROS. Leur production après irradiation, et leur inhibition par le NAC, conditionnent l'induction de JMY, positionnant les ROS en amont du processus. En aval, ils stabilisent HIF1-α, qui induit l'expression de JMY. Cette dernière s'accumule au front migratoire et stimule la polymérisation de l'actine F, conduisant à une augmentation de la motilité. Une migration aberrante des NPC induite par l'irradiation pourrait favoriser leur sortie des niches neurogéniques et leur localisation ectopique, contribuant à une désorganisation de l'architecture corticale, en cohérence avec certaines pathologies du développement telles que la lissencéphalie ou la microcéphalie (Barkovich, 2012).

Dans la deuxième partie de ce travail, j'ai pu observer des mécanismes analogues dans les CSG. Dans le modèle GLICO, l'irradiation sublétale induit une augmentation de la profondeur et de la vitesse d'invasion, indépendamment du modèle d'invasion ou de la lignée d'organoïdes utilisés ainsi qu'une augmentation de la formation et de l'extension des microtubes tumoraux. Ces effets disparaissent en absence de JMY, tandis que sa surexpression est suffisante pour reproduire les phénotypes radio-induits. Dans le glioblastome, tumeur hautement infiltrante, la dissémination des CSG après irradiation pourrait contribuer aux récidives locales en permettant aux cellules survivantes de s'éloigner des volumes irradiés et de recoloniser les zones résiduelles (Giese et al., 2003 ; Friedl and

Alexander, 2011). L'irradiation exercerait ainsi un double effet, cytotoxique mais aussi pro-migratoire.

La convergence des réponses observées entre NPC et CSG constitue un résultat particulièrement marquant. Dans les deux contextes, une irradiation sublétale induit une augmentation de la migration et de l'invasion (Bergiers et al., en révision ; Gauthier et al., 2020), reposant sur des mécanismes impliquant l'axe ROS/HIF-1α/JMY. Cette similarité est cohérente avec l'hypothèse d'une continuité biologique entre NPC et CSG. Plusieurs travaux indiquent en effet que les CSG peuvent dériver de progéniteurs neuraux transformés (Llaguno et al., 2016 ; Lee et al., 2018) ou, plus largement, que les cellules neurales immatures constituent des cellules d'origine privilégiées du glioblastome (Llaguno et al., 2019 ; Loras et al., 2023). Dans ce cadre, les CSG conserveraient des programmes fonctionnels propres aux cellules neurales immatures, notamment ceux impliqués dans la migration et l'adaptation au microenvironnement (Yabut and Pleasure, 2016).

Ainsi, l'activation de la voie HIF-1α/JMY après irradiation correspondrait à la réactivation de programmes développementaux préexistants. Cette hypothèse est renforcée par l'absence d'induction de JMY dans les cellules différenciées après irradiation (Gauthier et al., 2020), indiquant que cette réponse migratoire est strictement dépendante de l'état souche et progressivement réprimée au cours de la différenciation. Enfin, dans les deux contextes, les conséquences de cette motilité dépendent du microenvironnement. Dans le cerveau en développement, elle peut perturber l'organisation tissulaire, tandis que dans le glioblastome, elle favorise l'infiltration tumorale et la récidive (Giese et al., 2003 ; Friedl and Alexander, 2011). Un même programme moléculaire est ainsi mobilisé dans des contextes biologiques distincts, où ses effets diffèrent selon l'état physiologique ou pathologique du tissu. Dans cette perspective, le ciblage de l'axe HIF-1α/JMY pourrait représenter une stratégie thérapeutique pertinente pour limiter la migration radio-induite. Toutefois, l'inhibition directe de HIF-1α reste délicate en raison de son rôle ubiquitaire. JMY, en tant qu'effecteur en aval impliqué dans le remodelage de l'actine, la formation des MT et l'invasion, apparaît comme une cible plus spécifique.

Néanmoins, certaines limites doivent être considérées. Le modèle GLICO, bien que pertinent, ne recapitule pas l'ensemble de la complexité du microenvironnement tumoral adulte, notamment en

l'absence de vascularisation et de composante immunitaire. De plus, l'utilisation de lignées de CSG ne reflète pas pleinement l'hétérogénéité des glioblastomes, et les conditions d'irradiation reposent sur une dose unique, éloignée des schémas cliniques fractionnés. Plusieurs perspectives émergent de ces travaux. Il sera notamment important de déterminer comment JMY s'intègre dans les réseaux de signalisation régulant la migration, en interaction avec les voies Wnt, Notch, les intégrines ou les Rho-GTPases. L'identification de ses cibles transcriptionnelles et de ses partenaires moléculaires, notamment via des approches transcriptomiques, permettra de mieux caractériser les programmes associés à cet état migratoire et son rôle dans l'adaptation tumorale au stress radiatif.

En conclusion, l'utilisation conjointe de modèles expérimentaux complémentaires (GLICO et NPC) m'a permis de mettre en évidence qu'une irradiation à doses sublétales induit un programme de réponse cellulaire caractérisé par une augmentation de la migration et de l'invasion. Dans un contexte physiologique, ceci pourrait ainsi contribuer aux altérations du développement cérébral observées après irradiation, en perturbant la dynamique de positionnement des progéniteurs, tout en suggérant un rôle potentiel dans les processus de réparation via le recrutement des NPC vers les zones lésées. L'étude des CSG révèle que ce même programme adaptatif est détourné dans un contexte tumoral pour favoriser une invasivité accrue. Au cœur de ces deux contextes, JMY apparaît comme un régulateur central de la réponse radio-induite, constituant ainsi un point de convergence entre processus physiologique et adaptation tumorale. Sur le plan translationnel, JMY constitue une cible d'intérêt, dont la modulation pourrait permettre soit de limiter l'invasion des cellules tumorales après radiothérapie, soit, à l'inverse, de favoriser des processus de réparation dans le cerveau lésé.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. Neurobiology of Disease. janv 2010;37(1):13-25. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030

Abdissa D, Hamba N, Gerbi A. Review Article on adult neurogenesis in humans. Translational Research in Anatomy. sept 2020;20:100074. doi:10.1016/j.tria.2020.100074

Ables JL, DeCarolis NA, Johnson MA, Rivera PD, Gao Z, Cooper DC, et al. Notch1 Is Required for Maintenance of the Reservoir of Adult Hippocampal Stem Cells. J Neurosci. 4 août 2010;30(31):10484-92. doi:10.1523/JNEUROSCI.4721-09.2010

Acharya MM, Lan ML, Kan VH, Patel NH, Giedzinski E, Tseng BP, et al. Consequences of ionizing radiation-induced damage in human neural stem cells. Free Radic Biol Med. 2010;49:1846–55. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.021

Adams CJ, Pike ACW, Maniam S, Sharpe TD, Coutts AS, Knapp S, et al. The p53 cofactor Strap exhibits an unexpected TPR motif and oligonucleotide-binding (OB)–fold structure. Proc Natl Acad Sci USA. 6 mars 2012;109(10):3778-83. doi:10.1073/pnas.1113731109

Adighibe O, Pezzella F. The Role of JMY in p53 Regulation. Cancers. 31 mai 2018;10(6):173. doi:10.3390/cancers10060173

Adighibe O, Turley H, Leek R, Harris A, Coutts AS, La Thangue N, et al. JMY protein, a regulator of P53 and cytoplasmic actin filaments, is expressed in normal and neoplastic tissues. Virchows Arch. déc 2014;465(6):715-22. doi:10.1007/s00428-014-1660-0

Aftab Q, Mesnil M, Ojefua E, Poole A, Noordenbos J, Strale PO, et al. Cx43-Associated Secretome and Interactome Reveal Synergistic Mechanisms for Glioma Migration and MMP3 Activation. Front Neurosci. 19 mars 2019;13:143. doi:10.3389/fnins.2019.00143

Aftab Q, Sin WC, Naus CC. Reduction in gap junction intercellular communication promotes glioma migration. Oncotarget. 10 mai 2015;6(13):11447-64. doi:10.18632/oncotarget.3407

Agosti E, Antonietti S, Ius T, Fontanella MM, Zeppieri M, Panciani PP. Glioma Stem Cells as Promoter of Glioma Progression: A Systematic Review of Molecular Pathways and Targeted Therapies. IJMS. 22 juill 2024;25(14):7979. doi:10.3390/ijms25147979

Aguirre A, Rubio ME, Gallo V. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. Nature. sept 2010;467(7313):323-7. doi:10.1038/nature09347

Ahmed AU, Auffinger B, Lesniak MS. Understanding glioma stem cells: rationale, clinical relevance and therapeutic strategies. Expert Review of Neurotherapeutics. mai 2013;13(5):545-55. doi:10.1586/ern.13.42

Ahmed M, Bicher S, Combs SE, Lindner R, Raulefs S, Schmid TE, et al. In Vivo Microbeam Radiation Therapy at a Conventional Small Animal Irradiator. Cancers. 30 janv 2024;16(3):581. doi:10.3390/cancers16030581

Ahmed SU, Carruthers R, Gilmour L, Yildirim S, Watts C, Chalmers AJ. Selective Inhibition of Parallel DNA Damage Response Pathways Optimizes Radiosensitization of Glioblastoma Stem-like Cells. Cancer Research. 15 oct 2015;75(20):4416-28. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3790

Ahmed SI, Javed G, Laghari AA, Bareeqa SB, Farrukh S, Zahid S, et al. CD133 Expression in Glioblastoma Multiforme: A Literature Review. Cureus. 11 oct 2018. doi:10.7759/cureus.3439

Aisenbrey EA, Murphy WL. Synthetic alternatives to Matrigel. Nat Rev Mater. 27 mai 2020;5(7):539-51. doi:10.1038/s41578-020-0199-8

Aitchison EE, Dimesa AM, Shoari A. Matrix Metalloproteinases in Glioma: Drivers of Invasion and Therapeutic Targets. BioTech. 15 avr 2025;14(2):28. doi:10.3390/biotech14020028

Akbarali HI, Muchhala KH, Jessup DK, Cheatham S. Chemotherapy induced gastrointestinal toxicities. Adv Cancer Res. 2022;155:131-66. doi:10.1016/bs.acr.2022.02.007 PubMed PMID: 35779873; PubMed Central PMCID: PMC10033220.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA. avr 2003;100(7):3983-8. doi:10.1073/pnas.0530291100

Al-Koussa H, Atat OE, Jaafar L, Tashjian H, El-Sibai M. The Role of Rho GTPases in Motility and Invasion of Glioblastoma Cells. Analytical Cellular Pathology. 31 janv 2020;2020:1-9. doi:10.1155/2020/9274016

Albert R, Jeong H, Barabási AL. Error and attack tolerance of complex networks. Nature. 27 juill 2000;406(6794):378-82. doi:10.1038/35019019

Alcantara Llaguno SR, Xie X, Parada LF. Cell of Origin and Cancer Stem Cells in Tumor Suppressor Mouse Models of Glioblastoma. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2016;81:31-6. doi:10.1101/sqb.2016.81.030973

Alcantara Llaguno S, Sun D, Pedraza AM, Vera E, Wang Z, Burns DK, et al. Cell-of-origin susceptibility to glioblastoma formation declines with neural lineage restriction. Nat Neurosci. avr 2019;22(4):545-55. doi:10.1038/s41593-018-0333-8

Alekhina O, Burstein E, Billadeau DD. Cellular functions of WASP family proteins at a glance. Journal of Cell Science. 15 juill 2017;130(14):2235-41. doi:10.1242/jcs.199570

Alfonso JCL, Talkenberger K, Seifert M, Klink B, Hawkins-Daarud A, Swanson KR, et al. The biology and mathematical modelling of glioma invasion: a review. J R Soc Interface. nov 2017;14(136):20170490. doi:10.1098/rsif.2017.0490

Alieva M, Leidgens V, Riemenschneider MJ, Klein CA, Hau P, Van Rheenen J. Intravital imaging of glioma border morphology reveals distinctive cellular dynamics and contribution to tumor cell invasion. Sci Rep. 14 févr 2019;9(1):2054. doi:10.1038/s41598-019-38625-4

Alizadeh AA, Aranda V, Bardelli A, Blanpain C, Bock C, Borowski C, et al. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. Nat Med. août 2015;21(8):846-53. doi:10.1038/nm.3915

Allen M, Bjerke M, Edlund H, Nelander S, Westermark B. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. Sci Transl Med. 31 août 2016;8(354). doi:10.1126/scitranslmed.aaf6853

Almengló C, Caamaño P, Fraga M, Devesa J, Costoya JA, Arce VM. From neural stem cells to glioblastoma: A natural history of GBM recapitulated in vitro. Journal Cellular Physiology. nov 2021;236(11):7390-404. doi:10.1002/jcp.30409

Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J of Comparative Neurology. juin 1965;124(3):319-35. doi:10.1002/cne.901240303

Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. J Neurosci. 1 févr 2002;22(3):629-34. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-03-00629.2002

Amjad MT, Chidharla A, Kasi A. Cancer Chemotherapy. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026 [cité 6 mai 2026]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/ PubMed PMID: 33232037.

Andersen J, Revah O, Miura Y, Thom N, Amin ND, Kelley KW, et al. Generation of Functional Human 3D Cortico-Motor Assembloids. Cell. déc 2020;183(7):1913-1929.e26. doi:10.1016/j.cell.2020.11.017

Arbatskiy M, Balandin D, Churov A, Varachev V, Nikolaeva E, Mitrofanov A, et al. Intratumoral Cell Heterogeneity in Patient-Derived Glioblastoma Cell Lines Revealed by Single-Cell RNA-Sequencing. IJMS. 2 août 2024;25(15):8472. doi:10.3390/ijms25158472

Arce VM, González-Rendo L, Porres-Ventín L, González-Álvarez V, Caamaño-Teixeira S, Almengló C, et al. Neural stem cells and glioblastoma stem cells: Redefining concepts. Critical Reviews in Oncology/Hematology. avr 2026;220:105187. doi:10.1016/j.critrevonc.2026.105187

Arrieta-Viana LF, García AJ. Spatiotemporally-patterned biomaterials for organoid culture. Current Opinion in Biomedical Engineering. sept 2025;35:100594. doi:10.1016/j.cobme.2025.100594

Assou S, Bouckenheimer J, De Vos J. Concise Review: Assessing the Genome Integrity of Human Induced Pluripotent Stem Cells: What Quality Control Metrics? Stem Cells. 1 juin 2018;36(6):814-21. doi:10.1002/stem.2797

Asuthkar S, Velpula KK, Chetty C, Gorantla B, Rao JS. Epigenetic Regulation of miRNA-211 by MMP-9 Governs Glioma Cell Apoptosis, Chemosensitivity and Radiosensitivity. Oncotarget. 30 nov 2012;3(11):1439-54. doi:10.18632/oncotarget.683

Ayala R, Shu T, Tsai LH. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. Cell. 2007;128:29–43. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.021

Azevedo MM, Domingues HS, Cordelières FP, Sampaio P, Seixas AI, Relvas JB. Jmy regulates oligodendrocyte differentiation via modulation of actin cytoskeleton dynamics. Glia. sept 2018;66(9):1826-44. doi:10.1002/glia.23342

Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer Letters. déc 2012;327(1-2):48-60. doi:10.1016/j.canlet.2011.12.012

Azzarelli R. Organoid Models of Glioblastoma to Study Brain Tumor Stem Cells. Front Cell Dev Biol. 16 avr 2020;8:220. doi:10.3389/fcell.2020.00220

Badiga AV, Chetty C, Kesanakurti D, Are D, Gujrati M, Klopfenstein JD, et al. MMP-2 siRNA Inhibits Radiation-Enhanced Invasiveness in Glioma Cells. Lesniak MS, éditeur. PLoS ONE. 16 juin 2011;6(6):e20614. doi:10.1371/journal.pone.0020614

Bagri A, Cheng HJ, Yaron A, Pleasure SJ, Tessier-Lavigne M. Stereotyped Pruning of Long Hippocampal Axon Branches Triggered by Retraction Inducers of the Semaphorin Family. Cell. mai 2003;113(3):285-99. doi:10.1016/S0092-8674(03)00267-8

Baker GJ, Yadav VN, Motsch S, Koschmann C, Calinescu AA, Mineharu Y, et al. Mechanisms of Glioma Formation: Iterative Perivascular Glioma Growth and Invasion Leads to Tumor Progression, VEGF-Independent Vascularization, and Resistance to Antiangiogenic Therapy. Neoplasia. juill 2014;16(7):543-61. doi:10.1016/j.neo.2014.06.003

Bakhshinyan D, Savage N, Salim SK, Venugopal C, Singh SK. The Strange Case of Jekyll and Hyde: Parallels Between Neural Stem Cells and Glioblastoma-Initiating Cells. Front Oncol. 2020;10:603738. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.603738

Ballato M, Germanà E, Ricciardi G, Giordano WG, Tralongo P, Buccarelli M, et al. Understanding Neovascularization in Glioblastoma: Insights from the Current Literature. IJMS. 19 mars 2025;26(6):2763. doi:10.3390/ijms26062763

Balu DT, Lucki I. Adult hippocampal neurogenesis: Regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. mars 2009;33(3):232-52. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.08.007

Bangasser BL, Shamsan GA, Chan CE, Opoku KN, Tüzel E, Schlichtmann BW, et al. Shifting the optimal stiffness for cell migration. Nat Commun. 22 mai 2017;8(1):15313. doi:10.1038/ncomms15313

Banks D, Kapshtica E, Ali J, Raja S, Raja M, Ali M, et al. X-Ray Interaction and the Electronic, Atomic Cross-Sections and Compton Mass-Attenuation Coefficients of Human Blood, Breasts, Eye Lens, Ovaries, and Testis. Radiation. 31 août 2025;5(3):24. doi:10.3390/radiation5030024

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature. déc 2006;444(7120):756-60. doi:10.1038/nature05236

Barbhuiya S, Das BB, Norman P, Qureshi T. A comprehensive review of radiation shielding concrete: Properties, design, evaluation, and applications. Structural Concrete. avr 2025;26(2):1809-55. doi:10.1002/suco.202400519

Barcelona-Estaje E, Oliva MAG, Cunniffe F, Rodrigo-Navarro A, Genever P, Dalby MJ, et al. N-cadherin crosstalk with integrin weakens the molecular clutch in response to surface viscosity. Nat Commun. 12 oct 2024;15(1):8824. doi:10.1038/s41467-024-53107-6

Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. Brain. mai 2012;135(5):1348-69. doi:10.1093/brain/aws019

Barrie KR, Rebowski G, Dominguez R. Mechanism of actin filament severing and capping by gelsolin. Nat Struct Mol Biol. févr 2025;32(2):237-42. doi:10.1038/s41594-024-01412-5

Barthel L, Hadamitzky M, Dammann P, Schedlowski M, Sure U, Thakur BK, et al. Glioma: molecular signature and crossroads with tumor microenvironment. Cancer Metastasis Rev. mars 2022;41(1):53-75. doi:10.1007/s10555-021-09997-9

Bayin NS. Glioblastoma stem cells: Molecular characteristics and therapeutic implications. WJSC. 2014;6(2):230. doi:10.4252/wjsc.v6.i2.230

Becker KN, Pettee KM, Sugrue A, Reinard KA, Schroeder JL, Eisenmann KM. The Cytoskeleton Effectors Rho-Kinase (ROCK) and Mammalian Diaphanous-Related (mDia) Formin Have Dynamic Roles in Tumor Microtube Formation in Invasive Glioblastoma Cells. Cells. 5 mai 2022;11(9):1559. doi:10.3390/cells11091559

Beckham TH, Rooney MK, McAleer MF, Ghia AJ, Tom MC, Perni S, et al. Hypofractionated radiotherapy for glioblastoma: A large institutional retrospective assessment of 2 approaches. Neuro-Oncology Practice. 10 mai 2024;11(3):266-74. doi:10.1093/nop/npae004

Bellion A. Nucleokinesis in Tangentially Migrating Neurons Comprises Two Alternating Phases: Forward Migration of the Golgi/Centrosome Associated with Centrosome Splitting and Myosin Contraction at the Rear. Journal of Neuroscience. 15 juin 2005;25(24):5691-9. doi:10.1523/JNEUROSCI.1030-05.2005

Belman JP, Meng W, Wang HY, Li J, Strauser HT, Rosenfeld AM, et al. Dramatic increase in gene mutational burden after transformation of follicular lymphoma into TdT+ B-lymphoblastic leukemia/lymphoma. Cold Spring Harb Mol Case Stud. févr 2020;6(1):a004614. doi:10.1101/mcs.a004614

Belvindrah R, Hankel S, Walker J, Patton BL, Müller U. β1 Integrins Control the Formation of Cell Chains in the Adult Rostral Migratory Stream. J Neurosci. 7 mars 2007;27(10):2704-17. doi:10.1523/JNEUROSCI.2991-06.2007

Bender T, Durante M, Schroeder IS. Relative biological effectiveness and neural stem cell fate in carbon ion–irradiated human brain organoids. Radiotherapy and Oncology. janv 2026;214:111224. doi:10.1016/j.radonc.2025.111224

Benelli D, Barbato C, Cogoni C. Ribosome plasticity in glioblastoma: a multi-omics framework for future investigation. Front Genet. 12 janv 2026;16:1756452. doi:10.3389/fgene.2025.1756452

Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Koblinski J. Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. Advanced Drug Delivery Reviews. déc 2014;79-80:3-18. doi:10.1016/j.addr.2014.06.005

Bernstock JD, Gary SE, Klinger N, Valdes PA, Ibn Essayed W, Olsen HE, et al. Standard clinical approaches and emerging modalities for glioblastoma imaging. Neuro-Oncology Advances. 1 janv 2022;4(1):vdac080. doi:10.1093/noajnl/vdac080

Bhaduri A, Di Lullo E, Jung D, Müller S, Crouch EE, Espinosa CS, et al. Outer Radial Glia-like Cancer Stem Cells Contribute to Heterogeneity of Glioblastoma. Cell Stem Cell. janv 2020;26(1):48-63.e6. doi:10.1016/j.stem.2019.11.015

Bhat KPL, Balasubramaniyan V, Vaillant B, Ezhilarasan R, Hummelink K, Hollingsworth F, et al. Mesenchymal Differentiation Mediated by NF-κB Promotes Radiation Resistance in Glioblastoma. Cancer Cell. sept 2013;24(3):331-46. doi:10.1016/j.ccr.2013.08.001

Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. Nat Biotechnol. août 2014;32(8):760-72. doi:10.1038/nbt.2989

Bian S, Repic M, Guo Z, Kavirayani A, Burkard T, Bagley JA, et al. Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation. Nat Methods. août 2018;15(8):631-9. doi:10.1038/s41592-018-0070-7

Bieling P, Hansen SD, Akin O, Li T, Hayden CC, Fletcher DA, et al. WH2 and proline-rich domains of WASP-family proteins collaborate to accelerate actin filament elongation. The EMBO Journal. 4 janv 2018;37(1):102-21. doi:10.15252/embj.201797039

Bilgen N, Çınar Kul B, Akkurt MY, Bakıcı C, Buckley RM, Lyons LA, et al. Cardiomyopathy associated 5 (CMYA5) implicated as a genetic risk factor for radial hemimelia in Siamese cats. Journal of Feline Medicine and Surgery. oct 2023;25(10):1098612X231193557. doi:10.1177/1098612X231193557

Biserova K, Jakovlevs A, Uljanovs R, Strumfa I. Cancer Stem Cells: Significance in Origin, Pathogenesis and Treatment of Glioblastoma. Cells. 11 mars 2021;10(3):621. doi:10.3390/cells10030621

Bonafina A, Paratcha G, Ledda F. Deciphering New Players in the Neurogenic Adult Hippocampal Niche. Front Cell Dev Biol. 2 juill 2020;8:548. doi:10.3389/fcell.2020.00548

Bou-Gharios J, Noël G, Burckel H. The neglected burden of chronic hypoxia on the resistance of glioblastoma multiforme to first-line therapies. BMC Biol. 28 nov 2024;22(1):278. doi:10.1186/s12915-024-02075-w

Bovetti S, Hsieh YC, Bovolin P, Perroteau I, Kazunori T, Puche AC. Blood Vessels Form a Scaffold for Neuroblast Migration in the Adult Olfactory Bulb. J Neurosci. 30 mai 2007;27(22):5976-80. doi:10.1523/JNEUROSCI.0678-07.2007

Brandao M, Simon T, Critchley G, Giamas G. Astrocytes, the rising stars of the glioblastoma microenvironment. Glia. mai 2019;67(5):779-90. doi:10.1002/glia.23520

Brat DJ, Van Meir EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. Laboratory Investigation. avr 2004;84(4):397-405. doi:10.1038/labinvest.3700070

Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, et al. Pseudopalisades in Glioblastoma Are Hypoxic, Express Extracellular Matrix Proteases, and Are Formed by an Actively Migrating Cell Population. Cancer Research. 1 févr 2004;64(3):920-7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2073

Bredenoord AL, Clevers H, Knoblich JA. Human tissues in a dish: The research and ethical implications of organoid technology. Science. 20 janv 2017;355(6322):eaaf9414. doi:10.1126/science.aaf9414

Bremmer F, Schallenberg S, Jarry H, Küffer S, Kaulfuss S, Burfeind P, et al. Role of N-cadherin in proliferation, migration, and invasion of germ cell tumours. Oncotarget. 20 oct 2015;6(32):33426-37. doi:10.18632/oncotarget.5288

Brenner AV, Sugiyama H, Preston DL, Sakata R, French B, Sadakane A, et al. Radiation risk of central nervous system tumors in the Life Span Study of atomic bomb survivors, 1958–2009. Eur J Epidemiol. juin 2020;35(6):591-600. doi:10.1007/s10654-019-00599-y

Brinkmann K, Winterhoff M, Önel SF, Schultz J, Faix J, Bogdan S. WHAMY is a novel actin polymerase promoting myoblast fusion, macrophage cell motility and sensory organ development in Drosophila. Journal of Cell Science. 1 févr 2016;129(3):604-20. doi:10.1242/jcs.179325

Brouland JP, Hottinger AF. Nouvelle classification OMS 2016 des gliomes : quels changements ? Revue Médicale Suisse. 2017;13(579):1805-9. doi:10.53738/REVMED.2017.13.579.1805

Brown DV, Daniel PM, D'Abaco GM, Gogos A, Ng W, Morokoff AP, et al. Coexpression analysis of CD133 and CD44 identifies Proneural and Mesenchymal subtypes of glioblastoma multiforme. Oncotarget. 20 mars 2015;6(8):6267-80. doi:10.18632/oncotarget.3365

Bugia L, Affolter A, Kern J, Sohn E, Jungbauer F, Fleckenstein J, et al. Irradiation-induced cellular senescence is linked to pro-survival signaling and checkpoint regulation in a 2D and 3D model for head and neck cancer. Oncol Rep. 9 sept 2025;54(5):1-11. doi:10.3892/or.2025.8984

Buruiana A, Florian SI, Florian AI, Soritau O, Susman S. Endothelial transdifferentiation of glioma stem cells: a literature review. acta neuropathol commun. 21 août 2025;13(1):181. doi:10.1186/s40478-025-02031-x

Cairncross G, Wang M, Shaw E, Jenkins R, Brachman D, Buckner J, et al. Phase III Trial of Chemoradiotherapy for Anaplastic Oligodendroglioma: Long-Term Results of RTOG 9402. JCO. 20 janv 2013;31(3):337-43. doi:10.1200/JCO.2012.43.2674

Caja L, Bellomo C, Moustakas A. Transforming growth factor β and bone morphogenetic protein actions in brain tumors. FEBS Letters. 22 juin 2015;589(14):1588-97. doi:10.1016/j.febslet.2015.04.058

Cakir B, Xiang Y, Tanaka Y, Kural MH, Parent M, Kang YJ, et al. Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. Nat Methods. nov 2019;16(11):1169-75. doi:10.1038/s41592-019-0586-5

Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, et al. A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. Cancer Cell. janv 2007;11(1):69-82. doi:10.1016/j.ccr.2006.11.020

Campellone KG, Lebek NM, King VL. Branching out in different directions: Emerging cellular functions for the Arp2/3 complex and WASP-family actin nucleation factors. European Journal of Cell Biology. juin 2023;102(2):151301. doi:10.1016/j.ejcb.2023.151301

Campellone KG, Welch MD. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. Nat Rev Mol Cell Biol. avr 2010;11(4):237-51. doi:10.1038/nrm2867

Cappellesso F, Mazzone M, Virga F. Acid affairs in anti-tumour immunity. Cancer Cell Int. 27 oct 2024;24(1):354. doi:10.1186/s12935-024-03520-0

Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. Microbiol Mol Biol Rev. mars 2011;75(1):50-83. doi:10.1128/MMBR.00031-10

Carlén M, Cassidy RM, Brismar H, Smith GA, Enquist LW, Frisén J. Functional Integration of Adult-Born Neurons. Current Biology. avr 2002;12(7):606-8. doi:10.1016/S0960-9822(02)00771-6

Carney KR, Sondaz R, Sturgess W, Sakthivel K, Kim J, Swaminathan V, et al. Stabilization of adhesions controls F-actin architecture in mechanotransduction. Commun Mater. 11 déc 2025;6(1):288. doi:10.1038/s43246-025-01006-8

Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY, et al. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. Nature. janv 2010;463(7279):318-25. doi:10.1038/nature08712

Carruthers RD, Ahmed SU, Ramachandran S, Strathdee K, Kurian KM, Hedley A, et al. Replication Stress Drives Constitutive Activation of the DNA Damage Response and Radioresistance in Glioblastoma Stem-like Cells. Cancer Research. 1 sept 2018;78(17):5060-71. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0569

Casciari JJ, Sotirchos SV, Sutherland RM. Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular pH. Journal Cellular Physiology. mai 1992;151(2):386-94. doi:10.1002/jcp.1041510220

Casey DL, Vogelius IR, Brodin NP, Roberts KB, Avanzo M, Moni J, et al. Risk of Subsequent Neoplasms in Childhood Cancer Survivors After Radiation Therapy: A PENTEC Comprehensive Review. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics. juin 2024;119(2):640-54. doi:10.1016/j.ijrobp.2023.07.025

Catacuzzeno L, Caramia M, Sforna L, Belia S, Guglielmi L, D'Adamo MC, et al. Reconciling the discrepancies on the involvement of large-conductance Ca2+-activated K channels in glioblastoma cell migration. Front Cell Neurosci. 20 avr 2015;9. doi:10.3389/fncel.2015.00152

Ceccaldi R, Cejka P. Mechanisms and regulation of DNA end resection in the maintenance of genome stability. Nat Rev Mol Cell Biol. août 2025;26(8):586-99. doi:10.1038/s41580-025-00841-4

Cepeda S, Esteban-Sinovas O, Luppino LT, Kuttner S, Wodzinski M, Solheim O, et al. Radiomics-based quantification of tumor infiltration in the non-enhancing peritumoral region on postoperative MRI is associated with survival in glioblastoma. Sci Rep. 16 déc 2025;15(1):43932. doi:10.1038/s41598-025-27711-5

Cepeda S, Romero R, Luque L, García-Pérez D, Blasco G, Luppino LT, et al. Deep learning-based postoperative glioblastoma segmentation and extent of resection evaluation: Development, external validation, and model comparison. Neuro-Oncology Advances. 1 janv 2024;6(1):vdae199. doi:10.1093/noajnl/vdae199

Cha J, Ding EA, Carvalho EM, Fowler A, Aghi MK, Kumar S. Collagen VI deposition primes the glioblastoma microenvironment for invasion through mechanostimulation of β-catenin signaling. Zhang C, éditeur. PNAS Nexus. 2 sept 2024;3(9):pgae355. doi:10.1093/pnasnexus/pgae355

Chai W, Lian Z, Chen C, Liu J, Shi LL, Wang Y. JMY Polymorphism Is Related to Severity of Ankylosing Spondylitis in Chinese Han Patients. Genetic Testing and Molecular Biomarkers. 1 août 2013;17(8):637-40. doi:10.1089/gtmb.2013.0112

Chai W, Lian Z, Chen C, Liu J, Shi LL, Wang Y. JARID1A, JMY, and PTGER4 Polymorphisms Are Related to Ankylosing Spondylitis in Chinese Han Patients: A Case-Control Study. Wallace GR, éditeur. PLoS ONE. 19 sept 2013;8(9):e74794. doi:10.1371/journal.pone.0074794

Chamkouri H, Motlagh Mohavi S. Microglia and Macrophages in Central Nervous System Homeostasis and Disease Progression: Guardians and Executioners. Neuroglia. 23 août 2025;6(3):31. doi:10.3390/neuroglia6030031

Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. Nat Rev Mol Cell Biol. août 2017;18(8):495-506. doi:10.1038/nrm.2017.48

Chang MC, Chen CT, Chiang PF, Chiang YC. The Role of Chitinase-3-like Protein-1 (YKL40) in the Therapy of Cancer and Other Chronic-Inflammation-Related Diseases. Pharmaceuticals. 27 févr 2024;17(3):307. doi:10.3390/ph17030307

Chen JWE, Pedron S, Shyu P, Hu Y, Sarkaria JN, Harley BAC. Influence of Hyaluronic Acid Transitions in Tumor Microenvironment on Glioblastoma Malignancy and Invasive Behavior. Front Mater. 26 juin 2018;5:39. doi:10.3389/fmats.2018.00039

Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. Nature. août 2012;488(7412):522-6. doi:10.1038/nature11287

Chen J, Wu Q, Berglund AE, Macaulay RJ, Mulé JJ, Etame AB. Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma: Mechanisms of Tumor Progression and Therapeutic Strategies. Cells. 18 sept 2025;14(18):1458. doi:10.3390/cells14181458

Chen X ren, Chen Z yi, Qi S ya, Huang Q yun, Wei L hang, Chen M yue, et al. Junction-mediating and regulatory protein (JMY) is a promoting protein for radial migration of cortical neurons. Cell Death Discov. 26 févr 2026;12(1):123. doi:10.1038/s41420-026-02974-7

Chen Y, Ren P, He X, Yan F, Gu R, Bai J, et al. Olfactory bulb neurogenesis depending on signaling in the subventricular zone. Cerebral Cortex. 4 nov 2023;33(22):11102-11. doi:10.1093/cercor/bhad349

Cheng JCH, Chou CH, Kuo ML, Hsieh CY. Radiation-enhanced hepatocellular carcinoma cell invasion with MMP-9 expression through PI3K/Akt/NF-kappaB signal transduction pathway. Oncogene. 9 nov 2006;25(53):7009-18. doi:10.1038/sj.onc.1209706 PubMed PMID: 16732316.

Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, et al. Glioblastoma Stem Cells Generate Vascular Pericytes to Support Vessel Function and Tumor Growth. Cell. mars 2013;153(1):139-52. doi:10.1016/j.cell.2013.02.021

Cheng VWT, Vaughn-Beaucaire P, Shaw GC, Kriegs M, Droop A, Psakis G, et al. ARHGAP12 and ARHGAP29 exert distinct regulatory effects on switching between two cell morphological states through GSK-3 activity. Cell Reports. mars 2025;44(3):115361. doi:10.1016/j.celrep.2025.115361

Cheung KJ, Horne-Badovinac S. Collective cell migration modes in development, tissue repair and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol. oct 2025;26(10):741-58. doi:10.1038/s41580-025-00858-9

Cho AN, Jin Y, An Y, Kim J, Choi YS, Lee JS, et al. Microfluidic device with brain extracellular matrix promotes structural and functional maturation of human brain organoids. Nat Commun. 5 août 2021;12(1):4730. doi:10.1038/s41467-021-24775-5

Chowdhury P, Dey P, De D, Ghosh U. Gamma ray-induced in vitro cell migration via EGFR/ERK/Akt/p38 activation is prevented by olaparib pretreatment. International Journal of Radiation Biology. 3 mai 2020;96(5):651-60. doi:10.1080/09553002.2020.1711461

Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids. Cell. juin 2016;165(7):1586-97. doi:10.1016/j.cell.2016.05.082

Coelho-Rato LS, Parvanian S, Andrs Salajkova S, Medalia O, Eriksson JE. Intermediate filaments at a glance. Journal of Cell Science. 15 août 2024;137(16):jcs261386. doi:10.1242/jcs.261386

Colwell N, Larion M, Giles AJ, Seldomridge AN, Sizdahkhani S, Gilbert MR, et al. Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells. Neuro-Oncology. juill 2017;19(7):887-96. doi:10.1093/neuonc/now258

Conrad PW, Rust RT, Han J, Millhorn DE, Beitner-Johnson D. Selective Activation of p38α and p38γ by Hypoxia. Journal of Biological Chemistry. août 1999;274(33):23570-6. doi:10.1074/jbc.274.33.23570

Coutts AS, Pires IM, Weston L, Buffa FM, Milani M, Li JL, et al. Hypoxia-driven cell motility reflects the interplay between JMY and HIF-1α. Oncogene. 1 déc 2011;30(48):4835-42. doi:10.1038/onc.2011.188

Coutts AS, Boulahbel H, Graham A, La Thangue NB. Mdm2 targets the p53 transcription cofactor JMY for degradation. EMBO Reports. janv 2007;8(1):84-90. doi:10.1038/sj.embor.7400855

Coutts AS, La Thangue NB. The p53 response: Emerging levels of co-factor complexity. Biochemical and Biophysical Research Communications. juin 2005;331(3):778-85. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.150

Coutts AS, La Thangue NB. Mdm2 Widens Its Repertoire. Cell Cycle. avr 2007;6(7):827-9. doi:10.4161/cc.6.7.4086

Coutts AS, La Thangue NB. Actin nucleation by WH2 domains at the autophagosome. Nat Commun. 30 juill 2015;6(1):7888. doi:10.1038/ncomms8888

Coutts AS, La Thangue NB. Regulation of actin nucleation and autophagosome formation. Cell Mol Life Sci. sept 2016;73(17):3249-63. doi:10.1007/s00018-016-2224-z

Coutts AS, Weston L, La Thangue NB. A transcription co-factor integrates cell adhesion and motility with the p53 response. Proc Natl Acad Sci USA. 24 nov 2009;106(47):19872-7. doi:10.1073/pnas.0906785106

Coutts AS, Weston L, La Thangue NB. Actin nucleation by a transcription co-factor that links cytoskeletal events with the p53 response. Cell Cycle. 15 avr 2010;9(8):1511-5. doi:10.4161/cc.9.8.11258

Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, et al. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. Nature. févr 1994;367(6462):455-9. doi:10.1038/367455a0

Cruz-Nova P, Trujillo-Nolasco M, Aranda-Lara L, Ferro-Flores G, Ocampo-García B. Radiobiological effect of alpha particles. The scientific basis of targeted alpha-particle therapy. Nuclear Medicine and Biology. juill 2025;146-147:109044. doi:10.1016/j.nucmedbio.2025.109044

Cueto-Ureña C, Ramírez-Expósito MJ, Martínez-Martos JM. Neuron–Glioma Synapses in Tumor Progression. Biomedicines. 29 déc 2025;14(1):72. doi:10.3390/biomedicines14010072

Cui C, Zhang Y, Liu G, Zhang S, Zhang J, Wang X. Advances in the study of cancer metastasis and calcium signaling as potential therapeutic targets. Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy. 20 juin 2021. doi:10.37349/etat.2021.00046

Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelso C, et al. Human Neuroblasts Migrate to the Olfactory Bulb via a Lateral Ventricular Extension. Science. 2 mars 2007;315(5816):1243-9. doi:10.1126/science.1136281

Curtis MA, Low VF, Faull RLM. Neurogenesis and progenitor cells in the adult human brain: A comparison between hippocampal and subventricular progenitor proliferation. Developmental Neurobiology. juill 2012;72(7):990-1005. doi:10.1002/dneu.22028

D'Souza-Schorey C. Disassembling adherens junctions: breaking up is hard to do. Trends in Cell Biology. janv 2005;15(1):19-26. doi:10.1016/j.tcb.2004.11.002

Da Hora CC, Schweiger MW, Wurdinger T, Tannous BA. Patient-Derived Glioma Models: From Patients to Dish to Animals. Cells. 30 sept 2019;8(10):1177. doi:10.3390/cells8101177

Da Silva B, Mathew RK, Polson ES, Williams J, Wurdak H. Spontaneous Glioblastoma Spheroid Infiltration of Early-Stage Cerebral Organoids Models Brain Tumor Invasion. SLAS Discovery. sept 2018;23(8):862-8. doi:10.1177/2472555218764623

Davis M. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. CJON. 1 oct 2016;20(5):S2-8. doi:10.1188/16.CJON.S1.2-8

De Domenico P, Gagliardi F, Roncelli F, Snider S, Barzaghi LR, Mortini P. Gamma Knife radiosurgery for primary and recurrent glioblastoma: Systematic review and meta-analysis with target- and protocol-based stratification. Critical Reviews in Oncology/Hematology. déc 2025;216:104988. doi:10.1016/j.critrevonc.2025.104988

De Ridder LI, Laerum OD, Mørk SJ, Bigner DD. Invasiveness of human glioma cell lines in vitro: Relation to tumorigenicity in athymic mice. Acta Neuropathol. sept 1987;72(3):207-13. doi:10.1007/BF00691091

Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. Nat Rev Cancer. 1 avr 2005;5(4):275-84. doi:10.1038/nrc1590

Demmings MD, Da Silva Chagas L, Traetta ME, Rodrigues RS, Acutain MF, Barykin E, et al. (Re)building the nervous system: A review of neuron–glia interactions from development to disease. Journal of Neurochemistry. janv 2025;169(1):e16258. doi:10.1111/jnc.16258

Demonacos C, Krstic-Demonacos M, La Thangue NB. A TPR Motif Cofactor Contributes to p300 Activity in the p53 Response. Molecular Cell. juill 2001;8(1):71-84. doi:10.1016/S1097-2765(01)00277-5

Department of Neurosurgery, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium, De Vleeschouwer S, éditeurs. Glioblastoma [Internet]. Codon Publications; 2017 [cité 7 avr 2026]. Disponible sur: https://exonpublications.com/index.php/exon/issue/view/6 doi:10.15586/codon.glioblastoma.2017

Déry MAC, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. mars 2005;37(3):535-40. doi:10.1016/j.biocel.2004.08.012

Devesa P, Agasse F, Xapelli S, Almengló C, Devesa J, Malva JO, et al. Growth hormone pathways signaling for cell proliferation and survival in hippocampal neural precursors from postnatal mice. BMC Neurosci. déc 2014;15(1):100. doi:10.1186/1471-2202-15-100

Dibus M, Joshi O, Ivaska J. Novel tools to study cell-ECM interactions, cell adhesion dynamics and migration. Current Opinion in Cell Biology. juin 2024;88:102355. doi:10.1016/j.ceb.2024.102355

Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. Nature. avr 2009;458(7239):780-3. doi:10.1038/nature07733

Dirkse A, Golebiewska A, Buder T, Nazarov PV, Muller A, Poovathingal S, et al. Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. Nat Commun. 16 avr 2019;10(1):1787. doi:10.1038/s41467-019-09853-z

Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. Cell. juin 1999;97(6):703-16. doi:10.1016/S0092-8674(00)80783-7

Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. J Neurosci. 1 juill 1997;17(13):5046-61. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-13-05046.1997

Doyle AD, Carvajal N, Jin A, Matsumoto K, Yamada KM. Local 3D matrix microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions. Nat Commun. 9 nov 2015;6(1):8720. doi:10.1038/ncomms9720

Drew Y, Zenke FT, Curtin NJ. DNA damage response inhibitors in cancer therapy: lessons from the past, current status and future implications. Nat Rev Drug Discov. janv 2025;24(1):19-39. doi:10.1038/s41573-024-01060-w

Driscoll MK, Welf ES, Weems A, Sapoznik E, Zhou F, Murali VS, et al. Proteolysis-free amoeboid migration of melanoma cells through crowded environments via bleb-driven worrying. Developmental Cell. sept 2024;59(18):2414-2428.e8. doi:10.1016/j.devcel.2024.05.024

Driscoll RK, Lyne SB, Voce DJ, Maraka S, Gondi V, Chmura SJ, et al. A multi-institutional phase I study of acetazolamide with temozolomide in adults with newly diagnosed MGMT -methylated malignant glioma. Neuro-Oncology Advances. 1 janv 2024;6(1):vdae014. doi:10.1093/noajnl/vdae014

Drost J, Clevers H. Translational applications of adult stem cell-derived organoids. Development. 15 mars 2017;144(6):968-75. doi:10.1242/dev.140566

Duan C, He B, Wang Y, Liu W, Bao W, Yu L, et al. Stanniocalcin-1 promotes temozolomide resistance of glioblastoma through regulation of MGMT. Sci Rep. 30 août 2024;14(1):20199. doi:10.1038/s41598-024-68902-w

Duan S, Yuan G, Liu X, Ren R, Li J, Zhang W, et al. PTEN deficiency reprogrammes human neural stem cells towards a glioblastoma stem cell-like phenotype. Nat Commun. 3 déc 2015;6(1):10068. doi:10.1038/ncomms10068

Duan X, Kang E, Liu CY, Ming G li, Song H. Development of neural stem cell in the adult brain. Current Opinion in Neurobiology. févr 2008;18(1):108-15. doi:10.1016/j.conb.2008.04.001

Duly AMP, Kao FCL, Teo WS, Kavallaris M. βIII-Tubulin Gene Regulation in Health and Disease. Front Cell Dev Biol. 28 avr 2022;10:851542. doi:10.3389/fcell.2022.851542

Durbin RP. Letter: Acid secretion by gastric mucous membrane. Am J Physiol. déc 1975;229(6):1726. doi:10.1152/ajplegacy.1975.229.6.1726 PubMed PMID: 2020.

Dutta D, Heo I, Clevers H. Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. Trends in Molecular Medicine. mai 2017;23(5):393-410. doi:10.1016/j.molmed.2017.02.007

Echavidre W, Picco V, Faraggi M, Montemagno C. Integrin-αvβ3 as a Therapeutic Target in Glioblastoma: Back to the Future? Pharmaceutics. 13 mai 2022;14(5):1053. doi:10.3390/pharmaceutics14051053

Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH , and TERT Promoter Mutations in Tumors. N Engl J Med. 25 juin 2015;372(26):2499-508. doi:10.1056/NEJMoa1407279

Ehninger D, Kempermann G. Neurogenesis in the adult hippocampus. Cell Tissue Res. janv 2008;331(1):243-50. doi:10.1007/s00441-007-0478-3

Eke I, Cordes N. Radiobiology goes 3D: How ECM and cell morphology impact on cell survival after irradiation. Radiotherapy and Oncology. juin 2011;99(3):271-8. doi:10.1016/j.radonc.2011.06.007

Eling L, Kefs S, Keshmiri S, Balosso J, Calvet S, Chamel G, et al. Neuro-Oncologic Veterinary Trial for the Clinical Transfer of Microbeam Radiation Therapy: Acute to Subacute Radiotolerance after Brain Tumor Irradiation in Pet Dogs. Cancers. 29 juill 2024;16(15):2701. doi:10.3390/cancers16152701

Emery NJ, Clayton NS. Tool use and physical cognition in birds and mammals. Current Opinion in Neurobiology. févr 2009;19(1):27-33. doi:10.1016/j.conb.2009.02.003

Encinas JM, Fitzsimons CP. Gene regulation in adult neural stem cells. Current challenges and possible applications. Advanced Drug Delivery Reviews. oct 2017;120:118-32. doi:10.1016/j.addr.2017.07.016

Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RAM, Bulfone A, et al. Pax6, Tbr2, and Tbr1 Are Expressed Sequentially by Radial Glia, Intermediate Progenitor Cells, and Postmitotic Neurons in Developing Neocortex. J Neurosci. 5 janv 2005;25(1):247-51. doi:10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005

Episkopou V. SOX2 functions in adult neural stem cells. Trends in Neurosciences. mai 2005;28(5):219-21. doi:10.1016/j.tins.2005.03.003

Espinoza H, Figueroa XF. Opening of Cx43-formed hemichannels mediates the Ca2+ signaling associated with endothelial cell migration. Biol Direct. 28 août 2023;18(1):52. doi:10.1186/s13062-023-00408-3

Esteban-Román NF, Taddei E, Castro-Velázquez E, Villafuentes-Vidal L, Velez-Herrera A, Rubio-Osornio M, et al. Redox-Regulated Pathways in Glioblastoma Stem-like Cells: Mechanistic Insights and Therapeutic Implications. Brain Sciences. 19 août 2025;15(8):884. doi:10.3390/brainsci15080884

Everard A, Versnel D, Ruijters V, Tolboom N, Philippens M, Snijders T, et al. Comparison of 18F-FET-PET- and MRI-based target definition for re-irradiation treatment of recurrent diffuse glioma. Clinical and Translational Radiation Oncology. mai 2025;52:100931. doi:10.1016/j.ctro.2025.100931

Ezzo M, Etienne-Manneville S. Microtubule-Targeting Agents: Advances in Tubulin Binding and Small Molecule Therapy for Gliomas and Neurodegenerative Diseases. IJMS. 7 août 2025;26(15):7652. doi:10.3390/ijms26157652

Fedorova V, Pospisilova V, Vanova T, Amruz Cerna K, Abaffy P, Sedmik J, et al. Glioblastoma and cerebral organoids: development and analysis of an in vitro model for glioblastoma migration. Molecular Oncology. avr 2023;17(4):647-63. doi:10.1002/1878-0261.13389

Fernández-Yagüe MA, Marquez EN, Poojari CS, Fu J, Wang Y, Del Campo A, et al. Mechanochemical waves in focal adhesions during cell migration. Sci Adv. 3 oct 2025;11(40):eadw6425. doi:10.1126/sciadv.adw6425

Ferro-Flores G, Azorín-Vega E, Ocampo-García B, Luna-Gutiérrez M, Cruz-Nova P, Meléndez-Alafort L. Effects of Targeted Radionuclide Therapy on Cancer Cells Beyond the Ablative Radiation Dose. IJMS. 20 juill 2025;26(14):6968. doi:10.3390/ijms26146968

Finkel Z, Esteban F, Rodriguez B, Fu T, Ai X, Cai L. Diversity of Adult Neural Stem and Progenitor Cells in Physiology and Disease. Cells. 10 août 2021;10(8):2045. doi:10.3390/cells10082045

Fiorenzano A, Sozzi E, Birtele M, Kajtez J, Giacomoni J, Nilsson F, et al. Single-cell transcriptomics captures features of human midbrain development and dopamine neuron diversity in brain organoids. Nat Commun. 15 déc 2021;12(1):7302. doi:10.1038/s41467-021-27464-5

Firat-Karalar EN, Hsiue PP, Welch MD. The actin nucleation factor JMY is a negative regulator of neuritogenesis. Chang F, éditeur. MBoC. déc 2011;22(23):4563-74. doi:10.1091/mbc.e11-06-0585

Flavahan WA, Drier Y, Liau BB, Gillespie SM, Venteicher AS, Stemmer-Rachamimov AO, et al. Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. Nature. janv 2016;529(7584):110-4. doi:10.1038/nature16490

Folkins C, Shaked Y, Man S, Tang T, Lee CR, Zhu Z, et al. Glioma Tumor Stem-Like Cells Promote Tumor Angiogenesis and Vasculogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor and Stromal-Derived Factor 1. Cancer Research. 15 sept 2009;69(18):7243-51. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0167

Franco MS, Raulefs S, Schilling D, Combs SE, Schmid TE. Impact of Radiation on Invasion and Migration of Glioma In Vitro and In Vivo. Cancers. 21 nov 2024;16(23):3900. doi:10.3390/cancers16233900

Friedl P, Alexander S. Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. Cell. nov 2011;147(5):992-1009. doi:10.1016/j.cell.2011.11.016

Friedl P, Sahai E, Weiss S, Yamada KM. New dimensions in cell migration. Nat Rev Mol Cell Biol. nov 2012;13(11):743-7. doi:10.1038/nrm3459

Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, et al. Dedifferentiation of Neurons and Astrocytes by Oncogenes Can Induce Gliomas in Mice. Science. 23 nov 2012;338(6110):1080-4. doi:10.1126/science.1226929

Friedmann-Morvinski D, Verma IM. Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. EMBO Reports. mars 2014;15(3):244-53. doi:10.1002/embr.201338254

Fujii M, Matano M, Toshimitsu K, Takano A, Mikami Y, Nishikori S, et al. Human Intestinal Organoids Maintain Self-Renewal Capacity and Cellular Diversity in Niche-Inspired Culture Condition. Cell Stem Cell. déc 2018;23(6):787-793.e6. doi:10.1016/j.stem.2018.11.016

Fujita M, Imadome K, Shoji Y, Isozaki T, Endo S, Yamada S, et al. Carbon-Ion Irradiation Suppresses Migration and Invasiveness of Human Pancreatic Carcinoma Cells MIAPaCa-2 via Rac1 and RhoA Degradation. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics. sept 2015;93(1):173-80. doi:10.1016/j.ijrobp.2015.05.009

Fumadó Navarro J, Crilly S, Chan WK, Browne S, Mason JO, Vallejo-Giraldo C, et al. Cerebral Organoids with Integrated Endothelial Networks Emulate the Neurovascular Unit and Mitigate Core Necrosis. Advanced Science. nov 2025;12(43):e07256. doi:10.1002/advs.202507256

Furqan M, Elliott RJR, Nagle PWK, Dawson JC, Masalmeh R, Garcia VA, et al. Drug Combinations Targeting FAK and MEK Overcomes Tumor Heterogeneity in Glioblastoma. Pharmaceutics. 23 avr 2025;17(5):549. doi:10.3390/pharmaceutics17050549

Gage FH, Temple S. Neural Stem Cells: Generating and Regenerating the Brain. Neuron. oct 2013;80(3):588-601. doi:10.1016/j.neuron.2013.10.037

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. Cancer Research. 1 oct 2004;64(19):7011-21. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1364

Gan HK, Cvrljevic AN, Johns TG. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFR v III): where wild things are altered. The FEBS Journal. nov 2013;280(21):5350-70. doi:10.1111/febs.12393

García-Arcos JM, Jha A, Waterman CM, Piel M. Blebology: principles of bleb-based migration. Trends in Cell Biology. oct 2024;34(10):838-53. doi:10.1016/j.tcb.2024.02.009

Garnier D, Renoult O, Alves-Guerra MC, Paris F, Pecqueur C. Glioblastoma Stem-Like Cells, Metabolic Strategy to Kill a Challenging Target. Front Oncol. 6 mars 2019;9:118. doi:10.3389/fonc.2019.00118

Gauthier LR, Saati M, Bensalah-Pigeon H, Ben M'Barek K, Gitton-Quent O, Bertrand R, et al. The HIF1α/JMY pathway promotes glioblastoma stem-like cell invasiveness after irradiation. Sci Rep. 30 oct 2020;10(1):18742. doi:10.1038/s41598-020-75300-5

Ge W, Kan RL, Yilgor C, Fazzari E, Nano PR, Azizad DJ, et al. Human organoid tumor transplantation identifies functional glioblastoma-microenvironment communication mediated by PTPRZ1. Cell Reports. janv 2026;45(1):116848. doi:10.1016/j.celrep.2025.116848

Geens W, Rizani G, Del Gaudio N, Buyck F, Van Gestel F, Bruneau M, et al. Extent of resection and its association with overall survival in newly diagnosed IDH wildtype glioblastoma treated with concomitant radiochemotherapy: a systematic review and meta-analysis. Brain and Spine. 2025;5:105867. doi:10.1016/j.bas.2025.105867

Gera R, Kumar R, Panchal K, Sharma V, Garg R. Targeting Oncogenic Pathways in Cancer: Therapeutic Advances, Challenges, and Future Directions. Biosci, Biotech Res Asia. 30 sept 2025;22(3). doi:10.13005/bbra/3415

Ghosh HS. Adult Neurogenesis and the Promise of Adult Neural Stem Cells. J Exp Neurosci. janv 2019;13:1179069519856876. doi:10.1177/1179069519856876

Giandomenico SL, Mierau SB, Gibbons GM, Wenger LMD, Masullo L, Sit T, et al. Cerebral organoids at the air–liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. Nat Neurosci. avr 2019;22(4):669-79. doi:10.1038/s41593-019-0350-2

Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of Migration: Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Treatment. JCO. 15 avr 2003;21(8):1624-36. doi:10.1200/JCO.2003.05.063

Giese A, Loo MA, Tran N, Haskett D, Coons SW, Berens ME. Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation. Int J Cancer. 17 juill 1996;67(2):275-82. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960717)67:2<275::AID-IJC20>3.0.CO;2-9

Gilbertson RJ, Rich JN. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. Nat Rev Cancer. oct 2007;7(10):733-6. doi:10.1038/nrc2246

Gimple RC, Bhargava S, Dixit D, Rich JN. Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. Genes Dev. 1 juin 2019;33(11-12):591-609. doi:10.1101/gad.324301.119

Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, et al. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. Genes Dev. 1 nov 2001;15(21):2852-64. doi:10.1101/gad.912401

Giunti L, Buccoliero AM, Pantaleo M, Lucchesi M, Provenzano A, Palazzo V, et al. Molecular characterization of paediatric glioneuronal tumours with neuropil-like islands: a genome-wide copy number analysis. Am J Cancer Res. 2016;6(12):2910-8. PubMed PMID: 28042510; PubMed Central PMCID: PMC5199764.

Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin Is a Microtubule-Associated Protein and Is Expressed Widely by Migrating Neurons. Neuron. juin 1999;23(2):257-71. doi:10.1016/S0896-6273(00)80778-3

Goldberg JS, Hirschi KK. Diverse Roles of the Vasculature within the Neural Stem Cell Niche. Regen Med. nov 2009;4(6):879-97. doi:10.2217/rme.09.61

Goldman-Rakic PS, Rakic P. Preface: Cerebral Cortex Has Come of Age. Cerebral Cortex. 1 janv 1991;1(1):1-1. doi:10.1093/cercor/1.1.1-a

Gómez-Oliva R, Domínguez-García S, Carrascal L, Abalos-Martínez J, Pardillo-Díaz R, Verástegui C, et al. Evolution of Experimental Models in the Study of Glioblastoma: Toward Finding Efficient Treatments. Front Oncol. 29 janv 2021;10:614295. doi:10.3389/fonc.2020.614295

Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. Cell. nov 2016;167(4):897-914. doi:10.1016/j.cell.2016.10.021

Gonzalez-Perez O. Neural stem cells in the adult human brain. Biol Biomed Rep. 2012;2(1):59-69. PubMed PMID: 23181200; PubMed Central PMCID: PMC3505091.

Gonzalez-Reyes LE, Chiang CC, Zhang M, Johnson J, Arrillaga-Tamez M, Couturier NH, et al. Sonic Hedgehog is expressed by hilar mossy cells and regulates cellular survival and neurogenesis in the adult hippocampus. Sci Rep. 22 nov 2019;9(1):17402. doi:10.1038/s41598-019-53192-4

Goodwin CR, Liang L, Abu-Bonsrah N, Hdeib A, Elder BD, Kosztowski T, et al. Extraneural Glioblastoma Multiforme Vertebral Metastasis. World Neurosurg. mai 2016;89:578-582.e3. doi:10.1016/j.wneu.2015.11.061 PubMed PMID: 26704201; PubMed Central PMCID: PMC4870129.

Goranci-Buzhala G, Mariappan A, Gabriel E, Ramani A, Ricci-Vitiani L, Buccarelli M, et al. Rapid and Efficient Invasion Assay of Glioblastoma in Human Brain Organoids. Cell Reports. juin 2020;31(10):107738. doi:10.1016/j.celrep.2020.107738

Gordon A, Yoon SJ, Tran SS, Makinson CD, Park JY, Andersen J, et al. Long-term maturation of human cortical organoids matches key early postnatal transitions. Nat Neurosci. mars 2021;24(3):331-42. doi:10.1038/s41593-021-00802-y

Gorelik R, Gautreau A. Quantitative and unbiased analysis of directional persistence in cell migration. Nat Protoc. août 2014;9(8):1931-43. doi:10.1038/nprot.2014.131

Gough R, Treffy RW, Krucoff MO, Desai R. Advances in Glioblastoma Diagnosis: Integrating Genetics, Noninvasive Sampling, and Advanced Imaging. Cancers. 2 janv 2025;17(1):124. doi:10.3390/cancers17010124

Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? Nat Rev Neurosci. juin 2007;8(6):481-8. doi:10.1038/nrn2147

Govek EE, Newey SE, Van Aelst L. The role of the Rho GTPases in neuronal development. Genes Dev. 1 janv 2005;19(1):1-49. doi:10.1101/gad.1256405

Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: Origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. Developmental Biology. juill 2006;295(1):263-77. doi:10.1016/j.ydbio.2006.03.040

Gray GK, McFarland BC, Nozell SE, Benveniste EN. NF-κB and STAT3 in glioblastoma: therapeutic targets coming of age. Expert Review of Neurotherapeutics. nov 2014;14(11):1293-306. doi:10.1586/14737175.2014.964211

Graziani V, Rodriguez-Hernandez I, Maiques O, Sanz-Moreno V. The amoeboid state as part of the epithelial-to-mesenchymal transition programme. Trends in Cell Biology. mars 2022;32(3):228-42. doi:10.1016/j.tcb.2021.10.004

Gritsch S, Batchelor TT, Gonzalez Castro LN. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. Cancer. janv 2022;128(1):47-58. doi:10.1002/cncr.33918

Gritsenko PG, Atlasy N, Dieteren CEJ, Navis AC, Venhuizen JH, Veelken C, et al. p120-catenin-dependent collective brain infiltration by glioma cell networks. Nat Cell Biol. janv 2020;22(1):97-107. doi:10.1038/s41556-019-0443-x PubMed PMID: 31907411; PubMed Central PMCID: PMC6952556.

Gu Q, He Y, Ji J, Yao Y, Shen W, Luo J, et al. Hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) and reactive oxygen species (ROS) mediates radiation-induced invasiveness through the SDF-1α/CXCR4 pathway in non-small cell lung carcinoma cells. Oncotarget. 10 mai 2015;6(13):10893-907. doi:10.18632/oncotarget.3535

Guerrero Quiles C, Fahy S, Bartak M, Gonzalez Abalos J, Powell E, Lodhi T, et al. Radiation-induced extracellular matrix remodelling drives prognosis and predicts radiotherapy response in muscle-invasive bladder cancer. Front Oncol. 28 juill 2025;15:1616943. doi:10.3389/fonc.2025.1616943

Gui Y, Qin H, Zhang X, Chen Q, Ye F, Tian G, et al. Glioma–astrocyte connexin43 confers temozolomide resistance through activation of the E2F1/ERCC1 axis. Neuro-Oncology. 7 mars 2025;27(3):711-26. doi:10.1093/neuonc/noae237

Guo X, Qiu W, Wang C, Qi Y, Li B, Wang S, et al. Neuronal Activity Promotes Glioma Progression by Inducing Proneural-to-Mesenchymal Transition in Glioma Stem Cells. Cancer Research. 1 févr 2024;84(3):372-87. doi:10.1158/0008-5472.CAN-23-0609

Gupta K, Burns TC. Radiation-Induced Alterations in the Recurrent Glioblastoma Microenvironment: Therapeutic Implications. Front Oncol. 8 nov 2018;8:503. doi:10.3389/fonc.2018.00503

Gupta K, Vuckovic I, Zhang S, Xiong Y, Carlson BL, Jacobs J, et al. Radiation Induced Metabolic Alterations Associate With Tumor Aggressiveness and Poor Outcome in Glioblastoma. Front Oncol. 5 mai 2020;10:535. doi:10.3389/fonc.2020.00535

Gupta RK, Niklasson M, Bergström T, Segerman A, Betsholtz C, Westermark B. Tumor-specific migration routes of xenotransplanted human glioblastoma cells in mouse brain. Sci Rep. 9 janv 2024;14(1):864. doi:10.1038/s41598-023-51063-7

Haake SM, Rios BL, Pozzi A, Zent R. Integrating integrins with the hallmarks of cancer. Matrix Biology. juin 2024;130:20-35. doi:10.1016/j.matbio.2024.04.003

Haghdoost S, Thariat J, Toma-Dasu I, Frey B, Rodriguez-Lafrasse C, Valable S, et al. Radiobiology Contributions and Perspectives in Hadron Therapy, With a Focus on Carbon Ions: Report From the Workshop Hadron Therapy for Life, Caen, March 2025. International Journal of Particle Therapy. mars 2026;19:101289. doi:10.1016/j.ijpt.2025.101289

Hai L, Hoffmann DC, Wagener RJ, Azorin DD, Hausmann D, Xie R, et al. A clinically applicable connectivity signature for glioblastoma includes the tumor network driver CHI3L1. Nat Commun. 6 févr 2024;15(1):968. doi:10.1038/s41467-024-45067-8

Halász H, Szatmári Z, Kovács K, Koppán M, Papp S, Szabó-Meleg E, et al. Changes of Ex Vivo Cervical Epithelial Cells Due to Electroporation with JMY. IJMS. 28 nov 2023;24(23):16863. doi:10.3390/ijms242316863

Hall A, Lalli G. Rho and Ras GTPases in Axon Growth, Guidance, and Branching. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 1 févr 2010;2(2):a001818-a001818. doi:10.1101/cshperspect.a001818

Hama Y, Sasaki T, Fukai J, Nakao N. Bevacizumab-associated intracerebral hemorrhage in patients with malignant glioma. Mol Clin Oncol. 17 avr 2025;22(6):1-6. doi:10.3892/mco.2025.2852

Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. Nat Neurosci. janv 2016;19(1):20-7. doi:10.1038/nn.4185

Han S, Zhang C, Li Q, Dong J, Liu Y, Huang Y, et al. Tumour-infiltrating CD4+ and CD8+ lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. Br J Cancer. mai 2014;110(10):2560-8. doi:10.1038/bjc.2014.162

Hanif F, Muzaffar K, Perveen kahkashan, Malhi S, Simjee S. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. APJCP. janv 2017;18(1). doi:10.22034/APJCP.2017.18.1.3

Hannoun-Lévi JM, Renard S, Pommier P, Houdou L, Mignot F, Charret J, et al. Best practice in brachytherapy: 2025 update. Cancer/Radiothérapie. nov 2025;29(7-8):104714. doi:10.1016/j.canrad.2025.104714

Hao X, Plastow G, Zhang C, Xu S, Hu Z, Yang T, et al. Genome-wide association study identifies candidate genes for piglet splay leg syndrome in different populations. BMC Genet. déc 2017;18(1):64. doi:10.1186/s12863-017-0532-4

Hara T, Chanoch-Myers R, Mathewson ND, Myskiw C, Atta L, Bussema L, et al. Interactions between cancer cells and immune cells drive transitions to mesenchymal-like states in glioblastoma. Cancer Cell. juin 2021;39(6):779-792.e11. doi:10.1016/j.ccell.2021.05.002

Hartl M, Schneider R. A Unique Family of Neuronal Signaling Proteins Implicated in Oncogenesis and Tumor Suppression. Front Oncol. 17 avr 2019;9:289. doi:10.3389/fonc.2019.00289

Harwood DSL, Artzi SB, Pedersen V, Locallo A, Lü MJS, Scheie D, et al. Genomic heterogeneity drives distinct infiltration patterns in glioblastoma. acta neuropathol commun. 29 nov 2025;14(1):5. doi:10.1186/s40478-025-02106-9

Hattermann K, Flüh C, Engel D, Mehdorn HM, Synowitz M, Mentlein R, et al. Stem cell markers in glioma progression and recurrence. International Journal of Oncology. nov 2016;49(5):1899-910. doi:10.3892/ijo.2016.3682

Hausmann D, Hoffmann DC, Venkataramani V, Jung E, Horschitz S, Tetzlaff SK, et al. Autonomous rhythmic activity in glioma networks drives brain tumour growth. Nature. 5 janv 2023;613(7942):179-86. doi:10.1038/s41586-022-05520-4

Haywood RE. Glial cells of the central and peripheral nervous systems: An overview of existing research. Journal of Applied Neurosciences. 9 juill 2024;3(1). doi:10.4102/jan.v3i1.13

He Y, Døssing KBV, Sloth AB, He X, Rossing M, Kjaer A. Quantitative Evaluation of Stem-like Markers of Human Glioblastoma Using Single-Cell RNA Sequencing Datasets. Cancers. 2 mars 2023;15(5):1557. doi:10.3390/cancers15051557

Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. Proc Natl Acad Sci USA. 9 déc 2003;100(25):15178-83. doi:10.1073/pnas.2036535100

Hencz A, Szabó-Meleg E, Dayo MY, Bilibani A, Barkó S, Nyitrai M, et al. The p53 and Calcium Regulated Actin Rearrangement in Model Cells. IJMS. 13 août 2022;23(16):9078. doi:10.3390/ijms23169078

Heo JH, Kang D, Seo SJ, Jin Y. Engineering the Extracellular Matrix for Organoid Culture. IJSC. 28 févr 2022;15(1):60-9. doi:10.15283/ijsc21190

Hershko T, Chaussepied M, Oren M, Ginsberg D. Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F. Cell Death Differ. avr 2005;12(4):377-83. doi:10.1038/sj.cdd.4401575

Hetze S, Sure U, Schedlowski M, Hadamitzky M, Barthel L. Rodent Models to Analyze the Glioma Microenvironment. ASN Neuro. janv 2021;13(1):17590914211005074. doi:10.1177/17590914211005074

Hevner RF, Shi L, Justice N, Hsueh YP, Sheng M, Smiga S, et al. Tbr1 Regulates Differentiation of the Preplate and Layer 6. Neuron. févr 2001;29(2):353-66. doi:10.1016/S0896-6273(01)00211-2

Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, et al. Patient-Derived Xenograft Models: An Emerging Platform for Translational Cancer Research. Cancer Discovery. 1 sept 2014;4(9):998-1013. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0001

Hide T, Shibahara I, Inukai M, Shigeeda R, Kumabe T. Ribosomes and Ribosomal Proteins Promote Plasticity and Stemness Induction in Glioma Cells via Reprogramming. Cells. 7 juill 2022;11(14):2142. doi:10.3390/cells11142142

Hirata E, Yukinaga H, Kamioka Y, Arakawa Y, Miyamoto S, Okada T, et al. In vivo fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion. Journal of Cell Science. 15 févr 2012;125(4):858-68. doi:10.1242/jcs.089995

Hohmann T, Dehghani F. The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. Cells. 18 avr 2019;8(4):362. doi:10.3390/cells8040362

Hohmann T, Grabiec U, Vogel C, Ghadban C, Ensminger S, Bache M, et al. The Impact of Non-Lethal Single-Dose Radiation on Tumor Invasion and Cytoskeletal Properties. IJMS. 18 sept 2017;18(9):2001. doi:10.3390/ijms18092001

Holland EN, Fernández-Yagüe MA, Zhou DW, O'Neill EB, Woodfolk AU, Mora-Boza A, et al. FAK, vinculin, and talin control mechanosensitive YAP nuclear localization. Biomaterials. juill 2024;308:122542. doi:10.1016/j.biomaterials.2024.122542

Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. Nat Rev Genet. févr 2001;2(2):120-9. doi:10.1038/35052535

Holzinger A. Jasplakinolide: An Actin-Specific Reagent that Promotes Actin Polymerization. In: Gavin RH, éditeur. Cytoskeleton Methods and Protocols [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2009 [cité 7 mai 2026]. p. 71-87. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-376-3_4 doi:10.1007/978-1-60761-376-3_4

Horgusluoglu E, Nudelman K, Nho K, Saykin AJ. Adult neurogenesis and neurodegenerative diseases: A systems biology perspective. American J of Med Genetics Pt B. janv 2017;174(1):93-112. doi:10.1002/ajmg.b.32429

Horne EA, Diaz P, Cimino PJ, Jung E, Xu C, Hamel E, et al. A brain-penetrant microtubule-targeting agent that disrupts hallmarks of glioma tumorigenesis. Neuro-Oncology Advances. 1 janv 2021;3(1):vdaa165. doi:10.1093/noajnl/vdaa165

Hu X, Mullins RD. LC3 and STRAP regulate actin filament assembly by JMY during autophagosome formation. Journal of Cell Biology. 7 janv 2019;218(1):251-66. doi:10.1083/jcb.201802157

Hu Z, Chen Y, Yang S, Diao S, Ma L, Shi C. Radiation-Induced Biological Effects: Molecular and Cellular Mechanism, and Applications to Radiation/Nuclear Emergency and Cancer Therapy. MedComm. déc 2025;6(12):e70478. doi:10.1002/mco2.70478

Huang J, Huang J, Wei J, Chen J, Chen S, Yang G. Migrasome-related long non-coding RNAs orchestrate immune microenvironment and serve as a novel prognostic model in clear cell renal cell carcinoma. Transl Androl Urol. nov 2025;14(11):3595-612. doi:10.21037/tau-2025-541

Huang M, Zhang D, Wu JY, Xing K, Yeo E, Li C, et al. Wnt-mediated endothelial transformation into mesenchymal stem cell–like cells induces chemoresistance in glioblastoma. Sci Transl Med. 26 févr 2020;12(532):eaay7522. doi:10.1126/scitranslmed.aay7522

Huang R, Dai Q, Yang R, Duan Y, Zhao Q, Haybaeck J, et al. A Review: PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway and Its Regulated Eukaryotic Translation Initiation Factors May Be a Potential Therapeutic Target in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Front Oncol. 28 avr 2022;12:817916. doi:10.3389/fonc.2022.817916

Huang ZL, Liu ZG, Lin Q, Tao YL, Li X, Baxter P, et al. Fractionated radiation therapy alters energy metabolism and induces cellular quiescence exit in patient-derived orthotopic xenograft models of high-grade glioma. Translational Oncology. juill 2024;45:101988. doi:10.1016/j.tranon.2024.101988

Hubert CG, Rivera M, Spangler LC, Wu Q, Mack SC, Prager BC, et al. A Three-Dimensional Organoid Culture System Derived from Human Glioblastomas Recapitulates the Hypoxic Gradients and Cancer Stem Cell Heterogeneity of Tumors Found In Vivo. Cancer Research. 15 avr 2016;76(8):2465-77. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2402

Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. Proteomics. mai 2010;10(9):1886-90. doi:10.1002/pmic.200900758

Hussain G, Akram R, Anwar H, Sajid F, Iman T, Han HS, et al. Adult neurogenesis: a real hope or a delusion? Neural Regeneration Research. janv 2024;19(1):6-15. doi:10.4103/1673-5374.375317

Huszthy PC, Daphu I, Niclou SP, Stieber D, Nigro JM, Sakariassen PO, et al. In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives. Neuro-Oncology. 1 août 2012;14(8):979-93. doi:10.1093/neuonc/nos135

Ibáñez B, Melero A, Montoro A, San Onofre N, Soriano JM. Molecular Insights into Radiation Effects and Protective Mechanisms: A Focus on Cellular Damage and Radioprotectors. CIMB. 9 nov 2024;46(11):12718-32. doi:10.3390/cimb46110755

Ilatovskaya DV, Chubinskiy-Nadezhdin V, Pavlov TS, Shuyskiy LS, Tomilin V, Palygin O, et al. Arp2/3 complex inhibitors adversely affect actin cytoskeleton remodeling in the cultured murine kidney collecting duct M-1 cells. Cell Tissue Res. déc 2013;354(3):783-92. doi:10.1007/s00441-013-1710-y

Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, et al. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. Proc Natl Acad Sci U A. 2004;101:18117–22. https://doi.org/10.1073/pnas.0408258102

Iwadate Y. Plasticity in Glioma Stem Cell Phenotype and Its Therapeutic Implication. Neurol Med Chir(Tokyo). 2018;58(2):61-70. doi:10.2176/nmc.ra.2017-0089

Jacob F, Salinas RD, Zhang DY, Nguyen PTT, Schnoll JG, Wong SZH, et al. A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. Cell. janv 2020;180(1):188-204.e22. doi:10.1016/j.cell.2019.11.036

Jacobs VL, Valdes PA, Hickey WF, De Leo JA. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. ASN Neuro. 2011 Aug 3;3(3):e00063. doi: 10.1042/AN20110014. PMID: 21740400; PMCID: PMC3153964.

Jaganjac M, Stojanovic Markovic A, Deiana N, Zarkovic N. Short Overview on the Involvement of Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal in Diverse Pathways of Cell Death. Front Biosci (Landmark Ed). 26 sept 2025;30(9):37139. doi:10.31083/FBL37139

Jay-Gerin JP. Fundamentals of Water Radiolysis. Encyclopedia. 7 mars 2025;5(1):38. doi:10.3390/encyclopedia5010038

Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? Oncogene. 24 nov 2008;27(55):6920-9. doi:10.1038/onc.2008.343

Ji J, Ding K, Cheng B, Zhang X, Luo T, Huang B, et al. Radiotherapy-Induced Astrocyte Senescence Promotes an Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma to Facilitate Tumor Regrowth. Advanced Science. avr 2024;11(15):2304609. doi:10.1002/advs.202304609

Jiang Y hui, Wauki K, Liu Q, Bressler J, Pan Y, Kashork CD, et al. Genomic analysis of the chromosome 15q11-q13 Prader-Willi syndrome region and characterization of transcripts for GOLGA8E and WHCD1L1 from the proximal breakpoint region. BMC Genomics. 2008;9(1):50. doi:10.1186/1471-2164-9-50

Jin K, Sun Y, Xie L, Peel A, Mao XO, Batteur S, et al. Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. Molecular and Cellular Neuroscience. sept 2003;24(1):171-89. doi:10.1016/S1044-7431(03)00159-3

Jo H, Lee S, Kim MH, Park S, Lee SY. Recapitulating Glioma Stem Cell Niches Using 3D Spheroid Models for Glioblastoma Research. Biosensors. 7 nov 2024;14(11):539. doi:10.3390/bios14110539

Johnson GV, Jope RS. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. J Neurosci Res. 1992 Dec;33(4):505-12. doi: 10.1002/jnr.490330402. PMID: 1484385.

Johnson BE, Mazor T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY, et al. Mutational Analysis Reveals the Origin and Therapy-Driven Evolution of Recurrent Glioma. Science. 10 janv 2014;343(6167):189-93. doi:10.1126/science.1239947

Joo KM, Kim J, Jin J, Kim M, Seol HJ, Muradov J, et al. Patient-Specific Orthotopic Glioblastoma Xenograft Models Recapitulate the Histopathology and Biology of Human Glioblastomas In Situ. Cell Reports. janv 2013;3(1):260-73. doi:10.1016/j.celrep.2012.12.013

Joseph JV, Magaut CR, Storevik S, Geraldo LH, Mathivet T, Latif MA, et al. TGF-β promotes microtube formation in glioblastoma through thrombospondin 1. Neuro-Oncology. 1 avr 2022;24(4):541-53. doi:10.1093/neuonc/noab212

Ju RJ, Falconer AD, Schmidt CJ, Enriquez Martinez MA, Dean KM, Fiolka RP, et al. Compression-dependent microtubule reinforcement enables cells to navigate confined environments. Nat Cell Biol. sept 2024;26(9):1520-34. doi:10.1038/s41556-024-01476-x

Jung E, Osswald M, Blaes J, Wiestler B, Sahm F, Schmenger T, et al. Tweety-Homolog 1 Drives Brain Colonization of Gliomas. J Neurosci. 19 juill 2017;37(29):6837-50. doi:10.1523/JNEUROSCI.3532-16.2017

Jung E, Osswald M, Ratliff M, Dogan H, Xie R, Weil S, et al. Tumor cell plasticity, heterogeneity, and resistance in crucial microenvironmental niches in glioma. Nat Commun. 12 févr 2021;12(1):1014. doi:10.1038/s41467-021-21117-3

Jung SN, Yang WK, Kim J, Kim HS, Kim EJ, Yun H, et al. Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells. Carcinogenesis. avr 2008;29(4):713-21. doi:10.1093/carcin/bgn032

Jurkowski MP, Bettio L, K. Woo E, Patten A, Yau SY, Gil-Mohapel J. Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. Front Cell Neurosci. 29 sept 2020;14:576444. doi:10.3389/fncel.2020.576444

Kabrawala S, Zimmer MD, Campellone KG. WHIMP links the actin nucleation machinery to Src-family kinase signaling during protrusion and motility. Fritz-Laylin L, éditeur. PLoS Genet. 20 mars 2020;16(3):e1008694. doi:10.1371/journal.pgen.1008694

Kahlert UD, Joseph JV, Kruyt FAE. EMT- and MET-related processes in nonepithelial tumors: importance for disease progression, prognosis, and therapeutic opportunities. Molecular Oncology. juill 2017;11(7):860-77. doi:10.1002/1878-0261.12085

Kamran N, Alghamri MS, Nunez FJ, Shah D, Asad AS, Candolfi M, et al. Current State and Future Prospects of Immunotherapy for Glioma. Immunotherapy. mars 2018;10(4):317-39. doi:10.2217/imt-2017-0122

Kaneko N, Sawada M, Sawamoto K. Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. Journal of Neurochemistry. juin 2017;141(6):835-47. doi:10.1111/jnc.14002

Kaneko N, Sawamoto K. Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions. Neuroscience Research. mars 2009;63(3):155-64. doi:10.1016/j.neures.2008.12.001

Kaplan HS, Murphy ED. The effect of local roentgen irradiation on the biological behavior of a transplantable mouse carcinoma; increased frequency of pulmonary metastasis. J Natl Cancer Inst. 1949;9(5-6):407-13. PubMed PMID: 18153815.

Karabacak M, Patil S, Gersey ZC, Komotar RJ, Margetis K. Radiomics-Based Machine Learning with Natural Gradient Boosting for Continuous Survival Prediction in Glioblastoma. Cancers. 26 oct 2024;16(21):3614. doi:10.3390/cancers16213614

Kast DJ, Zajac AL, Holzbaur ELF, Ostap EM, Dominguez R. WHAMM Directs the Arp2/3 Complex to the ER for Autophagosome Biogenesis through an Actin Comet Tail Mechanism. Current Biology. juin 2015;25(13):1791-7. doi:10.1016/j.cub.2015.05.042

Katoh K. Mechanostimulation-Induced Cell Adhesion and Interaction with the Extracellular Matrix. Biomolecules. 30 déc 2025;16(1):60. doi:10.3390/biom16010060

Kazanis I, ffrench-Constant C. Extracellular matrix and the neural stem cell niche. Developmental Neurobiology. nov 2011;71(11):1006-17. doi:10.1002/dneu.20970

Kciuk M, Wanke K, Marciniak B, Kołat D, Aleksandrowicz M, Mujwar S, et al. Targeting ATR-CHK1 and ATM-CHK2 Axes in Pancreatic Cancer—A Comprehensive Review of Literature. IJMS. 23 janv 2026;27(3):1152. doi:10.3390/ijms27031152

Ke X, Yang R, Wu F, Wang X, Liang J, Hu X, et al. Exosomal miR-218-5p/miR-363-3p from Endothelial Progenitor Cells Ameliorate Myocardial Infarction by Targeting the p53/JMY Signaling Pathway. Pagliaro P, éditeur. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. janv 2021;2021(1):5529430. doi:10.1155/2021/5529430

Kegelman TP, Wu B, Das SK, Talukdar S, Beckta JM, Hu B, et al. Inhibition of radiation-induced glioblastoma invasion by genetic and pharmacological targeting of MDA-9/Syntenin. Proc Natl Acad Sci USA. 10 janv 2017;114(2):370-5. doi:10.1073/pnas.1616100114

Keijzer KAE, Tsingos E, Merks RMH. How cells align to structured collagen fibrils: a hybrid cellular Potts and molecular dynamics model with dynamic mechanosensitive focal adhesions. Front Cell Dev Biol. 6 janv 2025;12:1462277. doi:10.3389/fcell.2024.1462277

Kempermann G. What Is Adult Hippocampal Neurogenesis Good for? Front Neurosci. 15 avr 2022;16:852680. doi:10.3389/fnins.2022.852680

Kenney-Herbert E, Al-Mayhani T, Piccirillo SGM, Fowler J, Spiteri I, Jones P, et al. CD15 Expression Does Not Identify a Phenotypically or Genetically Distinct Glioblastoma Population. Stem Cells Translational Medicine. 1 juill 2015;4(7):822-31. doi:10.5966/sctm.2014-0047

Kernbach JM, Schroeder U, Hakvoort K, Ort J, Hamou H, Bzdok D, et al. Enhancing decision-making in glioblastoma surgery through an explainable human-AI collaboration: an international multicenter model development and external validation study. npj Precis Onc. 27 nov 2025;9(1):387. doi:10.1038/s41698-025-01183-2

Kersten K, De Visser KE, Van Miltenburg MH, Jonkers J. Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. EMBO Mol Med. févr 2017;9(2):137-53. doi:10.15252/emmm.201606857

Khabibov M, Garifullin A, Boumber Y, Khaddour K, Fernandez M, Khamitov F, et al. Signaling pathways and therapeutic approaches in glioblastoma multiforme (Review). Int J Oncol. 19 avr 2022;60(6):69. doi:10.3892/ijo.2022.5359

Kibbey MC. Maintenance of the EHS sarcoma and Matrigel preparation. Journal of Tissue Culture Methods. sept 1994;16(3-4):227-30. doi:10.1007/BF01540656

Kidder GW, Montgomery CW. Oxygenation of frog gastric mucosa in vitro. Am J Physiol. déc 1975;229(6):1510-3. doi:10.1152/ajplegacy.1975.229.6.1510 PubMed PMID: 2018.

Kim D, Olson JM, Cooper JA. N-cadherin dynamically regulates pediatric glioma cell migration in complex environments.

Kim HJ, Jeon HM, Batara DC, Lee S, Lee SJ, Yin J, et al. CREB5 promotes the proliferation and self-renewal ability of glioma stem cells. Cell Death Discov. 28 févr 2024;10(1):103. doi:10.1038/s41420-024-01873-z

Kim J, Kim R, Lee W, Kim GH, Jeon S, Lee YJ, et al. Assembly of glioblastoma tumoroids and cerebral organoids: a 3D in vitro model for tumor cell invasion. Molecular Oncology. mars 2025;19(3):698-715. doi:10.1002/1878-0261.13740

Kim KH, Seol HJ, Kim EH, Rheey J, Jin HJ, Lee Y, et al. Wnt/β-catenin signaling is a key downstream mediator of MET signaling in glioblastoma stem cells. Neuro-Oncology. févr 2013;15(2):161-71. doi:10.1093/neuonc/nos299

Kim YH, Yoo KC, Cui YH, Uddin N, Lim EJ, Kim MJ, et al. Radiation promotes malignant progression of glioma cells through HIF-1alpha stabilization. Cancer Letters. nov 2014;354(1):132-41. doi:10.1016/j.canlet.2014.07.048

King VL, Campellone KG. F-actin–rich territories coordinate apoptosome assembly and caspase activation during DNA damage–induced intrinsic apoptosis. Pollard T, éditeur. MBoC. 1 mai 2023;34(5):ar41. doi:10.1091/mbc.E22-04-0119

King VL, Leclair NK, Coulter AM, Campellone KG. The actin nucleation factors JMY and WHAMM enable a rapid Arp2/3 complex-mediated intrinsic pathway of apoptosis. Chiolo I, éditeur. PLoS Genet. 19 avr 2021;17(4):e1009512. doi:10.1371/journal.pgen.1009512

Kistemaker L, Van Bodegraven EJ, De Vries HE, Hol EM. Vascularized human brain organoids: current possibilities and prospects. Trends in Biotechnology. juin 2025;43(6):1275-85. doi:10.1016/j.tibtech.2024.11.021

Kitagawa Y, Kobayashi A, Cahill DP, Wakimoto H, Tanaka S. Molecular biology and novel therapeutics for IDH mutant gliomas: The new era of IDH inhibitors. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer. mai 2024;1879(3):189102. doi:10.1016/j.bbcan.2024.189102

Kitamura H, Ozono E, Iwanaga R, Bradford AP, Okuno J, Shimizu E, et al. Identification of novel target genes specifically activated by deregulated E2F in human normal fibroblasts. Genes to Cells. sept 2015;20(9):739-57. doi:10.1111/gtc.12268

Kluge F, Weissbach J, Weber A, Stradal T, Posern G. Regulation of MRTF-A by JMY via a nucleation-independent mechanism. Cell Commun Signal. déc 2018;16(1):86. doi:10.1186/s12964-018-0299-x

Knoblich JA. Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. Cell. févr 2008;132(4):583-97. doi:10.1016/j.cell.2008.02.007

Knox EG, Aburto MR, Clarke G, Cryan JF, O'Driscoll CM. The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration. Mol Psychiatry. juin 2022;27(6):2659-73. doi:10.1038/s41380-022-01511-z

Kokovay E, Goderie S, Wang Y, Lotz S, Lin G, Sun Y, et al. Adult SVZ Lineage Cells Home to and Leave the Vascular Niche via Differential Responses to SDF1/CXCR4 Signaling. Cell Stem Cell. août 2010;7(2):163-73. doi:10.1016/j.stem.2010.05.019

Konstantinou E, Varveris A, Solomou G, Antoniadis C, Tolia M, Mazonakis M. Radiation Dose to Critical Cardiac Structures from Three-Dimensional Conformal Radiation Therapy (3D-CRT), Intensity-Modulated Radiation Therapy (IMRT) and Volumetric Modulated Arc Therapy (VMAT) Techniques for Left-Sided Breast Cancer. JPM. 3 janv 2024;14(1):63. doi:10.3390/jpm14010063

Koosha F, Ahmadikamalabadi M, Mohammadi M. Review of Recent Improvements in Carbon Ion Radiation Therapy in the Treatment of Glioblastoma. Advances in Radiation Oncology. mai 2024;9(5):101465. doi:10.1016/j.adro.2024.101465

Kozareva DA, Cryan JF, Nolan YM. Born this way: Hippocampal neurogenesis across the lifespan. Aging Cell. oct 2019;18(5):e13007. doi:10.1111/acel.13007

Kramer DA, Piper HK, Chen B. WASP family proteins: Molecular mechanisms and implications in human disease. European Journal of Cell Biology. juin 2022;101(3):151244. doi:10.1016/j.ejcb.2022.151244

Kreso A, Dick JE. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. Cell Stem Cell. mars 2014;14(3):275-91. doi:10.1016/j.stem.2014.02.006

Krieger TG, Tirier SM, Park J, Jechow K, Eisemann T, Peterziel H, et al. Modeling glioblastoma invasion using human brain organoids and single-cell transcriptomics. Neuro-Oncology. 17 août 2020;22(8):1138-49. doi:10.1093/neuonc/noaa091

Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. Annu Rev Neurosci. 1 juin 2009;32(1):149-84. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135600

Królikowska K, Błaszczak K, Ławicki S, Zajkowska M, Gudowska-Sawczuk M. Glioblastoma—A Contemporary Overview of Epidemiology, Classification, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment: A Review Article. IJMS. 18 déc 2025;26(24):12162. doi:10.3390/ijms262412162

Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, et al. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. J of Comparative Neurology. 22 déc 2003;467(4):455-63. doi:10.1002/cne.10945

Krusche B, Ottone C, Clements MP, Johnstone ER, Goetsch K, Lieven H, et al. EphrinB2 drives perivascular invasion and proliferation of glioblastoma stem-like cells. eLife. 28 juin 2016;5:e14845. doi:10.7554/eLife.14845

Kuhn J, Banerjee P, Haye A, Robinson DN, Iglesias PA, Devreotes PN. Complementary cytoskeletal feedback loops control signal transduction excitability and cell polarity. Nat Commun. 12 août 2025;16(1):7482. doi:10.1038/s41467-025-62799-3

Kühne M, Zepernick AL, Qualmann B, Kessels MM, Izadi-Seitz M. JMY powers dendritogenesis and is regulated by CaM revealing a general, critical principle in neuromorphogenesis. Commun Biol. 22 mai 2025;8(1):784. doi:10.1038/s42003-025-08208-3

Kuranaga Y, Yu B, Osuka S, Zhang H, Devi NS, Bae S, et al. Targeting Integrin α3 Blocks β1 Maturation, Triggers Endoplasmic Reticulum Stress, and Sensitizes Glioblastoma Cells to TRAIL-Mediated Apoptosis. Cells. 26 avr 2024;13(9):753. doi:10.3390/cells13090753

Kwiatkowska-Miernik A, Mruk B, Sklinda K, Zaczyński A, Walecki J. Radiomics in the diagnosis of glioblastoma. Pol J Radiol. 6 oct 2023;88:461-6. doi:10.5114/pjr.2023.132168

Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. Science. 18 juill 2014;345(6194):1247125. doi:10.1126/science.1247125

Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. Nature. 19 sept 2013;501(7467):373-9. doi:10.1038/nature12517

Langhans M, Popp I, Grosu AL, Shusharina N, Binder H, Baltas D, et al. Recurrence analysis of glioblastoma cases based on distance and dose information. Radiotherapy and Oncology. juin 2023;183:109600. doi:10.1016/j.radonc.2023.109600

Latario CJ, Schoenfeld LW, Howarth CL, Pickrell LE, Begum F, Fischer DA, et al. Tumor microtubes connect pancreatic cancer cells in an Arp2/3 complex-dependent manner. Blanchoin L, éditeur. MBoC. 1 juin 2020;31(12):1259-72. doi:10.1091/mbc.E19-11-0605

Lathia JD, Liu H. Overview of Cancer Stem Cells and Stemness for Community Oncologists. Targ Oncol. août 2017;12(4):387-99. doi:10.1007/s11523-017-0508-3

Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CLL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. Genes Dev. 15 juin 2015;29(12):1203-17. doi:10.1101/gad.261982.115

Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. Cell. févr 1996;84(3):359-69. doi:10.1016/S0092-8674(00)81280-5

Lawrence T. The Nuclear Factor NF- B Pathway in Inflammation. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 1 déc 2009;1(6):a001651-a001651. doi:10.1101/cshperspect.a001651

Lawson CD, Ridley AJ. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. Journal of Cell Biology. 5 févr 2018;217(2):447-57. doi:10.1083/jcb.201612069

Le Belle JE, Orozco NM, Paucar AA, Saxe JP, Mottahedeh J, Pyle AD, et al. Proliferative Neural Stem Cells Have High Endogenous ROS Levels that Regulate Self-Renewal and Neurogenesis in a PI3K/Akt-Dependant Manner. Cell Stem Cell. janv 2011;8(1):59-71. doi:10.1016/j.stem.2010.11.028

Lee JJ, Kim BC, Park MJ, Lee YS, Kim YN, Lee BL, et al. PTEN status switches cell fate between premature senescence and apoptosis in glioma exposed to ionizing radiation. Cell Death Differ. avr 2011;18(4):666-77. doi:10.1038/cdd.2010.139

Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. Cancer Cell. mai 2006;9(5):391-403. doi:10.1016/j.ccr.2006.03.030

Lee JH, Lee JE, Kahng JY, Kim SH, Park JS, Yoon SJ, et al. Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. Nature. août 2018;560(7717):243-7. doi:10.1038/s41586-018-0389-3

Lee Y, Park CK, Park SH. Prognostic Impact of TERT Promoter Mutations in Adult-Type Diffuse Gliomas Based on WHO2021 Criteria. Cancers. 27 mai 2024;16(11):2032. doi:10.3390/cancers16112032

Lehrer EJ, Breen WG, Singh R, Palmer JD, Brown PD, Trifiletti DM, et al. Hypofractionated Stereotactic Radiosurgery in the Management of Brain Metastases. Neurosurgery. août 2024;95(2):253-8. doi:10.1227/neu.0000000000002897

Leone P, Malerba E, Susca N, Favoino E, Perosa F, Brunori G, et al. Endothelial cells in tumor microenvironment: insights and perspectives. Front Immunol. 15 févr 2024;15:1367875. doi:10.3389/fimmu.2024.1367875

Lewitzki V, Klement RJ, Kosmala R, Lisowski D, Flentje M, Polat B. Accelerated hyperfractionated radiochemotherapy with temozolomide is equivalent to normofractionated radiochemotherapy in a retrospective analysis of patients with glioblastoma. Radiat Oncol. déc 2019;14(1):227. doi:10.1186/s13014-019-1427-5

Li C, Ran H, Song S, Liu W, Zou W, Jiang B, et al. Overexpression of RPN2 suppresses radiosensitivity of glioma cells by activating STAT3 signal transduction. Mol Med. déc 2020;26(1):43. doi:10.1186/s10020-020-00171-5

Li T, Chen ZJ. The cGAS–cGAMP–STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer. Journal of Experimental Medicine. 7 mai 2018;215(5):1287-99. doi:10.1084/jem.20180139

Li W, Germain RN, Gerner MY. High-dimensional cell-level analysis of tissues with Ce3D multiplex volume imaging. Nat Protoc. juin 2019;14(6):1708-33. doi:10.1038/s41596-019-0156-4

Li XP, Guo ZQ, Wang BF, Zhao M. EGFR alterations in glioblastoma play a role in antitumor immunity regulation. Front Oncol. 4 août 2023;13:1236246. doi:10.3389/fonc.2023.1236246

Li X, Wang R, Luo W, Gu H, Huang T, Wang Q, et al. PCSK9 Loss-of-Function Disrupts Cellular Microfilament Network via LIN28A/HES5/JMY Axis in Neural Tube Defects. Advanced Science. nov 2025;12(41):e04291. doi:10.1002/advs.202504291

Li Y, Qiu Y, Gao W, Geng L, Wu Z, Zhang T, et al. Necroptotic signaling orchestrates glioblastoma malignancy and potentiates temozolomide response. Cell Death Dis. 22 déc 2025;16(1):921. doi:10.1038/s41419-025-08377-3

Liljedahl E, Konradsson E, Linderfalk K, Gustafsson E, Petersson K, Ceberg C, et al. Comparable survival in rats with intracranial glioblastoma irradiated with single-fraction conventional radiotherapy or FLASH radiotherapy. Front Oncol. 16 janv 2024;13:1309174. doi:10.3389/fonc.2023.1309174

Lin JHC, Takano T, Cotrina ML, Arcuino G, Kang J, Liu S, et al. Connexin 43 Enhances the Adhesivity and Mediates the Invasion of Malignant Glioma Cells. J Neurosci. 1 juin 2002;22(11):4302-11. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-11-04302.2002

Lin ZX. Glioma-related edema: new insight into molecular mechanisms and their clinical implications. Chin J Cancer. 5 janv 2013;32(1):49-52. doi:10.5732/cjc.012.10242

Lin ZL, Cui XS, Namgoong S, Kim NH. Junction-mediating and regulatory protein (JMY) is essential for early porcine embryonic development. Journal of Reproduction and Development. 2015;61(5):361-7. doi:10.1262/jrd.2015-021

Lin ZL, Li YH, Jin YX, Kim NH. A Maternal Transcription Factor, Junction Mediating and Regulatory Protein is Required for Preimplantation Development in the Mouse. Dev Reprod. sept 2019;23(3):285-95. doi:10.12717/DR.2019.23.3.285

Lin Z, Xu YN, Namgoong S, Kim NH. JMY Functions as Actin Nucleation-Promoting Factor and Mediator for p53-Mediated DNA Damage in Porcine Oocytes. Sun QY, éditeur. PLoS ONE. 3 oct 2014;9(10):e109385. doi:10.1371/journal.pone.0109385

Linkous A, Balamatsias D, Snuderl M, Edwards L, Miyaguchi K, Milner T, et al. Modeling Patient-Derived Glioblastoma with Cerebral Organoids. Cell Reports. mars 2019;26(12):3203-3211.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.02.063

Liu C, Wang S, Zhang X, Han Y, Tan M, Fan J, et al. The biomechanical signature of tumor invasion. Genes & Diseases. janv 2026;13(1):101771. doi:10.1016/j.gendis.2025.101771

Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, et al. Wnt/β-catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. Sig Transduct Target Ther. 3 janv 2022;7(1):3. doi:10.1038/s41392-021-00762-6

Liu X, Klionsky DJ. Regulation of JMY's actin nucleation activity by TTC5/STRAP and LC3 during autophagy. Autophagy. 4 mars 2019;15(3):373-4. doi:10.1080/15548627.2018.1564417

Liu YJ, Le Berre M, Lautenschlaeger F, Maiuri P, Callan-Jones A, Heuzé M, et al. Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells. Cell. févr 2015;160(4):659-72. doi:10.1016/j.cell.2015.01.007

Liu Y, Fan J, Yan Y, Dang X, Zhao R, Xu Y, et al. JMY expression by Sertoli cells contributes to mediating spermatogenesis in mice. The FEBS Journal. déc 2020;287(24):5478-97. doi:10.1111/febs.15328

Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. Nat Rev Neurosci. mars 2006;7(3):179-93. doi:10.1038/nrn1867

Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-Distance Neuronal Migration in the Adult Mammalian Brain. Science. 20 mai 1994;264(5162):1145-8. doi:10.1126/science.8178174

Longstreth JH, Wang K. The role of fibronectin in mediating cell migration. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 1 avr 2024;326(4):C1212-25. doi:10.1152/ajpcell.00633.2023

Loras A, Gonzalez-Bonet L, Gutierrez-Arroyo J, Martinez-Cadenas C, Marques-Torrejon M. Neural Stem Cells as Potential Glioblastoma Cells of Origin. Life. 29 mars 2023;13(4):905. doi:10.3390/life13040905

Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Neuro-Oncology. 2 août 2021;23(8):1231-51. doi:10.1093/neuonc/noab106

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Acta Neuropathol. août 2007;114(2):97-109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol. juin 2016;131(6):803-20. doi:10.1007/s00401-016-1545-1

Lu C, Kang T, Zhang J, Yang K, Liu Y, Song K, et al. Combined targeting of glioblastoma stem cells of different cellular states disrupts malignant progression. Nat Commun. 26 mars 2025;16(1):2974. doi:10.1038/s41467-025-58366-5

Lundberg M, Samudyata, Koskuvi M, Gkogka A, Nikpour M, Çelik M, et al. Clonidine prevents radiation-induced cell death in human brain organoids. Sci Rep. 31 oct 2025;15(1):38113. doi:10.1038/s41598-025-26170-2

Ma DK, Bonaguidi MA, Ming G li, Song H. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. Cell Res. juin 2009;19(6):672-82. doi:10.1038/cr.2009.56

Ma N, Xu E, Luo Q, Song G. Rac1: A Regulator of Cell Migration and a Potential Target for Cancer Therapy. Molecules. 27 mars 2023;28(7):2976. doi:10.3390/molecules28072976

MacLeod G, Molaei F, Haider S, Almeida MP, Lin S, Kushida M, et al. Fitness Screens Map State-Specific Glioblastoma Stem Cell Vulnerabilities. Cancer Research. 2 déc 2024;84(23):3967-83. doi:10.1158/0008-5472.CAN-23-4024

Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. Nature. juin 2000;405(6789):951-5. doi:10.1038/35016083

Mahdi A, Aittaleb M, Tissir F. Targeting Glioma Stem Cells: Therapeutic Opportunities and Challenges. Cells. 6 mai 2025;14(9):675. doi:10.3390/cells14090675

Mamun MA, Mannoor K, Cao J, Qadri F, Song X. SOX2 in cancer stemness: tumor malignancy and therapeutic potentials. Journal of Molecular Cell Biology. 20 févr 2020;12(2):85-98. doi:10.1093/jmcb/mjy080

Mantica M, Pritchard A, Lieberman F, Drappatz J. Retrospective study of nivolumab for patients with recurrent high grade gliomas. J Neurooncol. sept 2018;139(3):625-31. doi:10.1007/s11060-018-2907-4

Marallano VJ, Ughetta ME, Tejero R, Nanda S, Ramalingam R, Stalbow L, et al. Hypoxia drives shared and distinct transcriptomic changes in two invasive glioma stem cell lines. Sci Rep. 27 mars 2024;14(1):7246. doi:10.1038/s41598-024-56102-5

Martínez-González A, Calvo GF, Pérez Romasanta LA, Pérez-García VM. Hypoxic Cell Waves Around Necrotic Cores in Glioblastoma: A Biomathematical Model and Its Therapeutic Implications. Bull Math Biol. déc 2012;74(12):2875-96. doi:10.1007/s11538-012-9786-1

Martinez-Rico C, Pincet F, Thiery JP, Dufour S. Integrins stimulate E-cadherin-mediated intercellular adhesion by regulating Src-kinase activation and actomyosin contractility. Journal of Cell Science. 1 mars 2010;123(5):712-22. doi:10.1242/jcs.047878

Martucci M, Russo R, Giordano C, Schiarelli C, D'Apolito G, Tuzza L, et al. Advanced Magnetic Resonance Imaging in the Evaluation of Treated Glioblastoma: A Pictorial Essay. Cancers. 26 juill 2023;15(15):3790. doi:10.3390/cancers15153790

Masud N, Hasib MHH, Ibironke B, Block C, Hughes J, Ekpenyong A, et al. Exploring the heterogeneity in glioblastoma cellular mechanics using in-vitro assays and atomic force microscopy. Sci Rep. 2 juin 2025;15(1):19302. doi:10.1038/s41598-025-04841-4

Matarredona ER, Pastor AM. Extracellular Vesicle-Mediated Communication between the Glioblastoma and Its Microenvironment. Cells. 30 déc 2019;9(1):96. doi:10.3390/cells9010096

Matsubara S, Matsuda T, Nakashima K. Regulation of Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis by Cell Extrinsic and Intrinsic Factors. Cells. 10 mai 2021;10(5):1145. doi:10.3390/cells10051145

Matsui TK, Matsubayashi M, Sakaguchi YM, Hayashi RK, Zheng C, Sugie K, et al. Six-month cultured cerebral organoids from human ES cells contain matured neural cells. Neuroscience Letters. mars 2018;670:75-82. doi:10.1016/j.neulet.2018.01.040

Mayor R, Etienne-Manneville S. The front and rear of collective cell migration. Nat Rev Mol Cell Biol. févr 2016;17(2):97-109. doi:10.1038/nrm.2015.14

McCutcheon S, Spray DC. Glioblastoma–Astrocyte Connexin 43 Gap Junctions Promote Tumor Invasion. Molecular Cancer Research. 1 févr 2022;20(2):319-31. doi:10.1158/1541-7786.MCR-21-0199

Memmel S, Sisario D, Zöller C, Fiedler V, Katzer A, Heiden R, et al. Migration pattern, actin cytoskeleton organization and response to PI3K-, mTOR-, and Hsp90-inhibition of glioblastoma cells with different invasive capacities. Oncotarget. 11 juill 2017;8(28):45298-310. doi:10.18632/oncotarget.16847

Messé M, Bernhard C, Foppolo S, Thomas L, Marchand P, Herold-Mende C, et al. Hypoxia-driven heterogeneous expression of α5 integrin in glioblastoma stem cells is linked to HIF-2α. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. déc 2024;1870(8):167471. doi:10.1016/j.bbadis.2024.167471

Mi L, Cai Y, Qi J, Chen L, Li Y, Zhang S, et al. Elevated nonhomologous end-joining by AATF enables efficient DNA damage repair and therapeutic resistance in glioblastoma. Nat Commun. 28 mai 2025;16(1):4941. doi:10.1038/s41467-025-60228-z

Mierke CT, Fischer T, Puder S, Kunschmann T, Soetje B, Ziegler WH. Focal adhesion kinase activity is required for actomyosin contractility-based invasion of cells into dense 3D matrices. Sci Rep. 16 févr 2017;7(1):42780. doi:10.1038/srep42780

Mierke CT. Extracellular Matrix Cues Regulate Mechanosensing and Mechanotransduction of Cancer Cells. Cells. 2 janv 2024;13(1):96. doi:10.3390/cells13010096

Millard M, Odde S, Neamati N. Integrin Targeted Therapeutics. Theranostics. 2011;1:154-88. doi:10.7150/thno/v01p0154

Miller SC, MacDonald CC, Kellogg MK, Karamysheva ZN, Karamyshev AL. Specialized Ribosomes in Health and Disease. IJMS. 28 mars 2023;24(7):6334. doi:10.3390/ijms24076334

Ming G li, Song H. ADULT NEUROGENESIS IN THE MAMMALIAN CENTRAL NERVOUS SYSTEM. Annu Rev Neurosci. 21 juill 2005;28(1):223-50. doi:10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459

Ming G li, Song H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. Neuron. mai 2011;70(4):687-702. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.001

Minniti G, Amelio D, Amichetti M, Salvati M, Muni R, Bozzao A, et al. Patterns of failure and comparison of different target volume delineations in patients with glioblastoma treated with conformal radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide. Radiotherapy and Oncology. déc 2010;97(3):377-81. doi:10.1016/j.radonc.2010.08.020

Miroshnikova YA, Mouw JK, Barnes JM, Pickup MW, Lakins JN, Kim Y, et al. Tissue mechanics promote IDH1-dependent HIF1α–tenascin C feedback to regulate glioblastoma aggression. Nat Cell Biol. déc 2016;18(12):1336-45. doi:10.1038/ncb3429

Moncharmont C, Levy A, Guy JB, Falk AT, Guilbert M, Trone JC, et al. Radiation-enhanced cell migration/invasion process: A review. Critical Reviews in Oncology/Hematology. nov 2014;92(2):133-42. doi:10.1016/j.critrevonc.2014.05.006

Monzo P, Crestani M, Chong YK, Ghisleni A, Hennig K, Li Q, et al. Adaptive mechanoproperties mediated by the formin FMN1 characterize glioblastoma fitness for invasion. Developmental Cell. oct 2021;56(20):2841-2855.e8. doi:10.1016/j.devcel.2021.09.007

Moon DO. Calcium's Role in Orchestrating Cancer Apoptosis: Mitochondrial-Centric Perspective. IJMS. 19 mai 2023;24(10):8982. doi:10.3390/ijms24108982

Mooney KL, Choy W, Sidhu S, Pelargos P, Bui TT, Voth B, et al. The role of CD44 in glioblastoma multiforme. Journal of Clinical Neuroscience. déc 2016;34:1-5. doi:10.1016/j.jocn.2016.05.012

Moore N, Lyle S. Quiescent, Slow-Cycling Stem Cell Populations in Cancer: A Review of the Evidence and Discussion of Significance. Journal of Oncology. 2011;2011:1-11. doi:10.1155/2011/396076

Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. Nature. juin 2006;441(7097):1068-74. doi:10.1038/nature04956

Morton JJ, Bird G, Refaeli Y, Jimeno A. Humanized Mouse Xenograft Models: Narrowing the Tumor–Microenvironment Gap. Cancer Research. 1 nov 2016;76(21):6153-8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1260

Mottareale R, Frascogna C, La Verde G, Arrichiello C, Muto P, Netti PA, et al. Impact of ionizing radiation on cell-ECM mechanical crosstalk in breast cancer. Front Bioeng Biotechnol. 6 juin 2024;12:1408789. doi:10.3389/fbioe.2024.1408789

Mousaei Ghasroldasht M, Seok J, Park HS, Liakath Ali FB, Al-Hendy A. Stem Cell Therapy: From Idea to Clinical Practice. IJMS. 5 mars 2022;23(5):2850. doi:10.3390/ijms23052850

Mulliqi E, Khelwatty S, Bagwan I, Kamaludin A, Morgan A, Long N, et al. The Co-Expression and Cellular Location of HER Family Members, EGFRvIII, Putative Cancer Stem Cell Biomarkers CD44 and CD109 in Patients with Glioblastoma, and Their Impacts on Prognosis. Cancers. 4 avr 2025;17(7):1221. doi:10.3390/cancers17071221

Mun SH, Jang HS, Choi BO, Kim SW, Song JH. Recurrence pattern of glioblastoma treated with intensity-modulated radiation therapy versus three-dimensional conformal radiation therapy. Radiat Oncol J. 30 sept 2024;42(3):218-27. doi:10.3857/roj.2024.00381

Murase S ichi, Horwitz AF. Deleted in Colorectal Carcinoma and Differentially Expressed Integrins Mediate the Directional Migration of Neural Precursors in the Rostral Migratory Stream. J Neurosci. 1 mai 2002;22(9):3568-79. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-09-03568.2002

Murphy SF, Varghese RT, Lamouille S, Guo S, Pridham KJ, Kanabur P, et al. Connexin 43 Inhibition Sensitizes Chemoresistant Glioblastoma Cells to Temozolomide. Cancer Research. 1 janv 2016;76(1):139-49. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1286

Mut M, Zengin HY, Azizova A, Askun CS, Schiff D, Soylemezoglu F. Repeat Resection for Recurrent Glioblastoma in the WHO 2021 Era: A Longitudinal Matched Case-Control Study. Brain Sciences. 27 avr 2025;15(5):463. doi:10.3390/brainsci15050463

Muthukrishnan SD, Kawaguchi R, Nair P, Prasad R, Qin Y, Johnson M, et al. P300 promotes tumor recurrence by regulating radiation-induced conversion of glioma stem cells to vascular-like cells. Nat Commun. 19 oct 2022;13(1):6202. doi:10.1038/s41467-022-33943-0

Nagano M, Hoshino D, Koshikawa N, Akizawa T, Seiki M. Turnover of Focal Adhesions and Cancer Cell Migration. International Journal of Cell Biology. 2012;2012:1-10. doi:10.1155/2012/310616

Navratil J, Raudenska M, Kratochvilova M, Balvan J, Shaul YD, Masarik M. Orchestrating movement: the role of Caveolin-1 in migration and metastasis. Mol Cancer. 23 oct 2025;24(1):267. doi:10.1186/s12943-025-02469-6

Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ, et al. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. Cell. août 2019;178(4):835-849.e21. doi:10.1016/j.cell.2019.06.024

Nguemgo Kouam P, Bühler H, Hero T, Adamietz IA. The increased adhesion of tumor cells to endothelial cells after irradiation can be reduced by FAK-inhibition. Radiat Oncol. déc 2019;14(1):25. doi:10.1186/s13014-019-1230-3

Nguemgo Kouam P, Rezniczek GA, Kochanneck A, Priesch-Grzeszkowiak B, Hero T, Adamietz IA, et al. Robo1 and vimentin regulate radiation-induced motility of human glioblastoma cells. Ahmad A, éditeur. PLoS ONE. 4 juin 2018;13(6):e0198508. doi:10.1371/journal.pone.0198508

Nguyen-Ba-Charvet KT, Picard-Riera N, Tessier-Lavigne M, Baron-Van Evercooren A, Sotelo C, Chédotal A. Multiple Roles for Slits in the Control of Cell Migration in the Rostral Migratory Stream. J Neurosci. 11 févr 2004;24(6):1497-506. doi:10.1523/JNEUROSCI.4729-03.2004

Noguera P. Etude du rôle de la protéine VASP dans la dynamique et la mécanique des réseaux d'actine avec un système biomimétique de la motilité cellulaire.

Nordgard SH, Johansen FE, Alnæs GIG, Bucher E, Syvänen A, Naume B, et al. Genome-wide analysis identifies 16q deletion associated with survival, molecular subtypes, mRNA expression, and germline haplotypes in breast cancer patients. Genes Chromosomes & Cancer. août 2008;47(8):680-96. doi:10.1002/gcc.20569

Novak D, Hüser L, Elton JJ, Umansky V, Altevogt P, Utikal J. SOX2 in development and cancer biology. Seminars in Cancer Biology. déc 2020;67:74-82. doi:10.1016/j.semcancer.2019.08.007

Oakley BR, Paolillo V, Zheng Y. γ-Tubulin complexes in microtubule nucleation and beyond. Drubin DG, éditeur. MBoC. sept 2015;26(17):2957-62. doi:10.1091/mbc.E14-11-1514

Ogawa J, Pao GM, Shokhirev MN, Verma IM. Glioblastoma Model Using Human Cerebral Organoids. Cell Reports. avr 2018;23(4):1220-9. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.105

Okano H, Sawamoto K. Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair. Phil Trans R Soc B. 27 juin 2008;363(1500):2111-22. doi:10.1098/rstb.2008.2264

Okano H, Temple S. Cell types to order: temporal specification of CNS stem cells. Current Opinion in Neurobiology. avr 2009;19(2):112-9. doi:10.1016/j.conb.2009.04.003

Okura H, Golbourn BJ, Shahzad U, Agnihotri S, Sabha N, Krieger JR, et al. A role for activated Cdc42 in glioblastoma multiforme invasion. Oncotarget. 30 août 2016;7(35):56958-75. doi:10.18632/oncotarget.10925

Ooft SN, Weeber F, Dijkstra KK, McLean CM, Kaing S, Van Werkhoven E, et al. Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. Sci Transl Med. 9 oct 2019;11(513):eaay2574. doi:10.1126/scitranslmed.aay2574

Oosterheert W, Boiero Sanders M, Bieling P, Raunser S. Structural insights into actin filament turnover. Trends in Cell Biology. oct 2025;35(10):893-906. doi:10.1016/j.tcb.2024.12.009

Oppel F, Müller N, Schackert G, Hendruschk S, Martin D, Geiger KD, et al. SOX2-RNAi attenuates S-phase entry and induces RhoA-dependent switch to protease-independent amoeboid migration in human glioma cells. Mol Cancer. déc 2011;10(1):137. doi:10.1186/1476-4598-10-137

Ordóñez-Rubiano EG, Rincón-Arias N, Shelton WJ, Salazar AF, Sierra MA, Bertani R, et al. Current Applications of Single-Cell RNA Sequencing in Glioblastoma: A Scoping Review. Brain Sciences. 14 mars 2025;15(3):309. doi:10.3390/brainsci15030309

Orkin RW, Gehron P, McGoodwin EB, Martin GR, Valentine T, Swarm R. A murine tumor producing a matrix of basement membrane. The Journal of experimental medicine. 1 janv 1977;145(1):204-20. doi:10.1084/jem.145.1.204

Ormel PR, Vieira De Sá R, Van Bodegraven EJ, Karst H, Harschnitz O, Sneeboer MAM, et al. Microglia innately develop within cerebral organoids. Nat Commun. 9 oct 2018;9(1):4167. doi:10.1038/s41467-018-06684-2

Orrego E, Castaneda CA, Castillo M, Bernabe LA, Casavilca S, Chakravarti A, et al. Distribution of Tumor-Infiltrating Immune Cells in Glioblastoma. CNS Oncol. déc 2018;7(4):CNS21. doi:10.2217/cns-2017-0037

Ortiz R, Perazzoli G, Cabeza L, Jiménez-Luna C, Luque R, Prados J, et al. Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. CN. avr 2021;19(4):513-37. doi:10.2174/1570159X18666200626204005

Oshiro S, Tsugu H, Komatsu F, Ohmura T, Ohta M, Sakamoto S, et al. Efficacy of Temozolomide Treatment in Patients with High-grade Glioma. ANTICANCER RESEARCH. 2009.

Osswald M, Jung E, Sahm F, Solecki G, Venkataramani V, Blaes J, et al. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. Nature. déc 2015;528(7580):93-8. doi:10.1038/nature16071

Osswald M, Solecki G, Wick W, Winkler F. A malignant cellular network in gliomas: potential clinical implications. Neuro Oncol. avr 2016;18(4):479-85. doi:10.1093/neuonc/now014

Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al. The epidemiology of glioma in adults: a « state of the science » review. Neuro-Oncology. 1 juill 2014;16(7):896-913. doi:10.1093/neuonc/nou087

Ostrom QT, Price M, Neff C, Cioffi G, Waite KA, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016—2020. Neuro-Oncology. 4 oct 2023;25(Supplement_4):iv1-99. doi:10.1093/neuonc/noad149

Osuka S, Van Meir EG. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. Journal of Clinical Investigation. 1 févr 2017;127(2):415-26. doi:10.1172/JCI89587

Otani Y, Ichikawa T, Kurozumi K, Date I. Dynamic Reorganization of Microtubule and Glioma Invasion. Acta Med Okayama. 2019;73(4).

Oukhdouch A, Zinbi B, Sellami S, Rais H. EGFR gene amplification in IDH-wildtype glioblastomas: an integrative bioinformatic and histopathological analysis using immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. Discov Onc. 21 oct 2025;16(1):1931. doi:10.1007/s12672-025-03390-6

Oweida A, Paquette B. Reconciling two opposing effects of radiation therapy: stimulation of cancer cell invasion and activation of anti-cancer immunity. International Journal of Radiation Biology. 3 juin 2023;99(6):951-63. doi:10.1080/09553002.2021.1956005

Oyefeso FA, Goldberg G, Opoku NYPS, Vazquez M, Bertucci A, Chen Z, et al. Effects of acute low-moderate dose ionizing radiation to human brain organoids. Kanungo J, éditeur. PLoS ONE. 31 mai 2023;18(5):e0282958. doi:10.1371/journal.pone.0282958

Ozturk MS, Lee VK, Zou H, Friedel RH, Intes X, Dai G. High-resolution tomographic analysis of in vitro 3D glioblastoma tumor model under long-term drug treatment. Sci Adv. 6 mars 2020;6(10):eaay7513. doi:10.1126/sciadv.aay7513

Padfield E, Ellis HP, Kurian KM. Current Therapeutic Advances Targeting EGFR and EGFRvIII in Glioblastoma. Front Oncol. 29 janv 2015;5. doi:10.3389/fonc.2015.00005

Paduraru E, Iacob D, Rarinca V, Plavan G, Ureche D, Jijie R, et al. Zebrafish as a Potential Model for Neurodegenerative Diseases: A Focus on Toxic Metals Implications. IJMS. 8 févr 2023;24(4):3428. doi:10.3390/ijms24043428

Paik J hye, Ding Z, Narurkar R, Ramkissoon S, Muller F, Kamoun WS, et al. FoxOs Cooperatively Regulate Diverse Pathways Governing Neural Stem Cell Homeostasis. Cell Stem Cell. nov 2009;5(5):540-53. doi:10.1016/j.stem.2009.09.013

Palazzo AF, Cook TA, Alberts AS, Gundersen GG. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. Nat Cell Biol. août 2001;3(8):723-9. doi:10.1038/35087035

Palmqvist T, Lopez-Riego M, Bucher M, Oestreicher U, Pojtinger S, Giesen U, et al. Biological effectiveness of combined exposure to neutrons and gamma radiation applied in two orders of sequence: Relevance for biological dosimetry after nuclear emergencies. Radiation Medicine and Protection. févr 2025;6(1):1-10. doi:10.1016/j.radmp.2024.10.004

Paluch EK, Aspalter IM, Sixt M. Focal Adhesion–Independent Cell Migration. Annu Rev Cell Dev Biol. 6 oct 2016;32(1):469-90. doi:10.1146/annurev-cellbio-111315-125341

Pang L, Dunterman M, Guo S, Khan F, Liu Y, Taefi E, et al. Kunitz-type protease inhibitor TFPI2 remodels stemness and immunosuppressive tumor microenvironment in glioblastoma. Nat Immunol. oct 2023;24(10):1654-70. doi:10.1038/s41590-023-01605-y

Paňková K, Rösel D, Novotný M, Brábek J. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. Cell Mol Life Sci. janv 2010;67(1):63-71. doi:10.1007/s00018-009-0132-1

Pannunzio NR, Watanabe G, Lieber MR. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. Journal of Biological Chemistry. juill 2018;293(27):10512-23. doi:10.1074/jbc.TM117.000374

Paredes I, Himmels P, Ruiz De Almodóvar C. Neurovascular Communication during CNS Development. Developmental Cell. avr 2018;45(1):10-32. doi:10.1016/j.devcel.2018.01.023

Park CM, Park MJ, Kwak HJ, Lee HC, Kim MS, Lee SH, et al. Ionizing Radiation Enhances Matrix Metalloproteinase-2 Secretion and Invasion of Glioma Cells through Src/Epidermal Growth Factor Receptor–Mediated p38/Akt and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathways. Cancer Research. 1 sept 2006;66(17):8511-9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4340

Park H, Min CH, Park SY, Kim JI. Two-dimensional dynamic multileaf collimator (2DDMLC) technique for improved treatment quality in intensity modulated radiation therapy. Sci Rep. 19 mai 2025;15(1):17371. doi:10.1038/s41598-025-01002-5

Park YS, Choi Y, Lee JS. Focal adhesion dynamics-mediated cell migration and proliferation on silica bead arrays. Biomater Sci. 2025;13(7):1849-57. doi:10.1039/D4BM01659A

Paşca AM, Sloan SA, Clarke LE, Tian Y, Makinson CD, Huber N, et al. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. Nat Methods. juill 2015;12(7):671-8. doi:10.1038/nmeth.3415

Pasqualetti F, Miniati M, Gonnelli A, Gadducci G, Giannini N, Palagini L, et al. Cancer Stem Cells and Glioblastoma: Time for Innovative Biomarkers of Radio-Resistance? Biology. 28 sept 2023;12(10):1295. doi:10.3390/biology12101295

Paß T, Aßfalg M, Tolve M, Blaess S, Rothermel M, Wiesner RJ, et al. The Impact of Mitochondrial Dysfunction on Dopaminergic Neurons in the Olfactory Bulb and Odor Detection. Mol Neurobiol. sept 2020;57(9):3646-57. doi:10.1007/s12035-020-01947-w

Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. Science. 20 juin 2014;344(6190):1396-401. doi:10.1126/science.1254257

Patru C, Romao L, Varlet P, Coulombel L, Raponi E, Cadusseau J, et al. CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. BMC Cancer. déc 2010;10(1):66. doi:10.1186/1471-2407-10-66

Patwardhan R, Nanda S, Wagner J, Stockter T, Dehmelt L, Nalbant P. Cdc42 activity in the trailing edge is required for persistent directional migration of keratinocytes. Li R, éditeur. MBoC. 1 janv 2024;35(1):br1. doi:10.1091/mbc.E23-08-0318

Pavlova S, Rubetskaya K, Fab L, Savchenko E, Samoylenkova N, Revishchin A, et al. The Aptamer bi-(AID-1-T) Synergizes with Radiation to Inhibit Proliferation of Human Glioma Cells. Pharmaceutics. 8 nov 2025;17(11):1442. doi:10.3390/pharmaceutics17111442

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B e, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions*. Endocrine Reviews. 1 avr 2001;22(2):153-83. doi:10.1210/edrv.22.2.0428

Peixoto P, Etcheverry A, Aubry M, Missey A, Lachat C, Perrard J, et al. EMT is associated with an epigenetic signature of ECM remodeling genes. Cell Death Dis. 27 févr 2019;10(3):205. doi:10.1038/s41419-019-1397-4

Peng Y, Wang Y, Zhou C, Mei W, Zeng C. PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway? Front Oncol. 24 mars 2022;12:819128. doi:10.3389/fonc.2022.819128

Pereira RC, Santagiuliana R, Ceseracciu L, Boso DP, Schrefler BA, Decuzzi P. Elucidating the Role of Matrix Porosity and Rigidity in Glioblastoma Type IV Progression. Applied Sciences. 18 déc 2020;10(24):9076. doi:10.3390/app10249076

Perillo B, Di Donato M, Pezone A, Di Zazzo E, Giovannelli P, Galasso G, et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. Exp Mol Med. févr 2020;52(2):192-203. doi:10.1038/s12276-020-0384-2

Pettee KM, Becker KN, Alberts AS, Reinard KA, Schroeder JL, Eisenmann KM. Targeting the mDia Formin-Assembled Cytoskeleton Is an Effective Anti-Invasion Strategy in Adult High-Grade Glioma Patient-Derived Neurospheres. Cancers. 20 mars 2019;11(3):392. doi:10.3390/cancers11030392

Pfrieger FW, Slezak M. Genetic approaches to study glial cells in the rodent brain. Glia. mai 2012;60(5):681-701. doi:10.1002/glia.22283

Phi LTH, Sari IN, Yang YG, Lee SH, Jun N, Kim KS, et al. Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. Stem Cells International. 2018;2018:1-16. doi:10.1155/2018/5416923

Pine AR, Cirigliano SM, Nicholson JG, Hu Y, Linkous A, Miyaguchi K, et al. Tumor Microenvironment Is Critical for the Maintenance of Cellular States Found in Primary Glioblastomas. Cancer Discovery. 1 juill 2020;10(7):964-79. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-0057

Pinto G, Saenz-de-Santa-Maria I, Chastagner P, Perthame E, Delmas C, Toulas C, et al. Patient-derived glioblastoma stem cells transfer mitochondria through tunneling nanotubes in tumor organoids. Biochemical Journal. 15 janv 2021;478(1):21-39. doi:10.1042/BCJ20200710

Piquet L. Régulation de l'expression de Rnd3 dans les cellules tumorales.

Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. Nature. oct 1992;359(6398):845-8. doi:10.1038/359845a0

Pollard TD. Actin and Actin-Binding Proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol. août 2016;8(8):a018226. doi:10.1101/cshperspect.a018226

Potschka H, Trinka E. Perampanel: Does it have broad-spectrum potential? Epilepsia. mars 2019;60 Suppl 1:22-36. doi:10.1111/epi.14456 PubMed PMID: 29953584.

Pouget JP. Radiobiologie de la radiothérapie interne vectorisée. Médecine Nucléaire. mars 2023;47(2):107-9. doi:10.1016/j.mednuc.2023.01.151

Pouyan A, Ghorbanlo M, Eslami M, Jahanshahi M, Ziaei E, Salami A, et al. Glioblastoma multiforme: insights into pathogenesis, key signaling pathways, and therapeutic strategies. Mol Cancer. 26 févr 2025;24(1):58. doi:10.1186/s12943-025-02267-0

Pradeau-Phélut L, Etienne-Manneville S. Cytoskeletal crosstalk: A focus on intermediate filaments. Current Opinion in Cell Biology. avr 2024;87:102325. doi:10.1016/j.ceb.2024.102325

Prager BC, Bhargava S, Mahadev V, Hubert CG, Rich JN. Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. Trends in Cancer. mars 2020;6(3):223-35. doi:10.1016/j.trecan.2020.01.009

Purnell MC. Bio-Field Array: The Influence of Junction Mediating and Regulatory Protein Expression on Cytoskeletal Filament Behavior During Apoptosis in Triple-Negative Breast Cancer. Breast Cancer(Auckl). janv 2019;13:1178223419830981. doi:10.1177/1178223419830981

Qian X, Nguyen HN, Song MM, Hadiono C, Ogden SC, Hammack C, et al. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. Cell. mai 2016;165(5):1238-54. doi:10.1016/j.cell.2016.04.032

Quail DF, Joyce JA. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. Cancer Cell. mars 2017;31(3):326-41. doi:10.1016/j.ccell.2017.02.009

Raguin J, Kortulewski T, Bergiers O, Granotier-Beckers C, Chatrousse L, Benchoua A, et al. Advanced human cerebral organoids as a model for investigating glioma stem cell interactions with microglia and vascular cells and response to radiotherapy [Internet]. 2024 [cité 7 mars 2026]. Disponible sur: http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.11.28.625826 doi:10.1101/2024.11.28.625826

Rahman M, Reyner K, Deleyrolle L, Millette S, Azari H, Day BW, et al. Neurosphere and adherent culture conditions are equivalent for malignant glioma stem cell lines. Anat Cell Biol. 2015;48(1):25. doi:10.5115/acb.2015.48.1.25

Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the Origin of the Term “Stem Cell”. Cell Stem Cell. juin 2007;1(1):35-8. doi:10.1016/j.stem.2007.05.013

Ramos B, Gómez-Cayupán J, Aranis I, García Tapia E, Coghlan C, Ulloa MJ, et al. Oxidative Stress-Mediated DNA Damage Induced by Ionizing Radiation in Modern Computed Tomography: Evidence for Antioxidant-Based Radioprotective Strategies. Antioxidants. 4 sept 2025;14(9):1085. doi:10.3390/antiox14091085

Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. Cell Death Differ. avr 2008;15(4):678-85. doi:10.1038/cdd.2008.21

Rayan AM, Adam A, Al-Arabi G, Ahmed MR. Journal of sustainable food, water, energy and environment. 2025.

Read RD, Tapp ZM, Rajappa P, Hambardzumyan D. Glioblastoma microenvironment—from biology to therapy. Genes Dev. 29 mai 2024;genesdev;gad.351427.123v1. doi:10.1101/gad.351427.123

Reaz F, Kristensen L, Traneus E, Sørensen BS, Bassler N. Probing the therapeutic window of proton minibeam radiotherapy using dose-response curves in a mouse model. Radiotherapy and Oncology. oct 2025;211:111050. doi:10.1016/j.radonc.2025.111050

Renner M, Lancaster MA, Bian S, Choi H, Ku T, Peer A, et al. Self-organized developmental patterning and differentiation in cerebral organoids. The EMBO Journal. 15 mai 2017;36(10):1316-29. doi:10.15252/embj.201694700

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. nov 2001;414(6859):105-11. doi:10.1038/35102167

Ribeiro A, Fote G, Himstead A, Zheng M, Elliott E, Smith SM, et al. Glioblastoma: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Approaches. Biomedicines. 12 août 2025;13(8):1963. doi:10.3390/biomedicines13081963

Ribeiro-Rodrigues TM, Martins-Marques T, Morel S, Kwak BR, Girão H. Role of connexin 43 in different forms of intercellular communication – gap junctions, extracellular vesicles and tunnelling nanotubes. Journal of Cell Science. 1 nov 2017;130(21):3619-30. doi:10.1242/jcs.200667

Ridley AJ. Rho GTPase signalling in cell migration. Current Opinion in Cell Biology. oct 2015;36:103-12. doi:10.1016/j.ceb.2015.08.005

Ridley AJ. Life at the Leading Edge. Cell. juin 2011;145(7):1012-22. doi:10.1016/j.cell.2011.06.010

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. Science. 5 déc 2003;302(5651):1704-9. doi:10.1126/science.1092053

Rim EY, Clevers H, Nusse R. The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators. Annu Rev Biochem. 21 juin 2022;91(1):571-98. doi:10.1146/annurev-biochem-040320-103615

Rizzuti M, Melzi V, Brambilla L, Quetti L, Sali L, Ottoboni L, et al. Shaping the Neurovascular Unit Exploiting Human Brain Organoids. Mol Neurobiol. sept 2024;61(9):6642-57. doi:10.1007/s12035-024-03998-9

Roadcap DW, Bear JE. Double JMY: making actin fast. Nat Cell Biol. avr 2009;11(4):375-6. doi:10.1038/ncb0409-375

Rødland GE, Temelie M, Eek Mariampillai A, Serban AM, Edin NFJ, Malinen E, et al. Interferon signaling is enhanced by ATR inhibition in glioblastoma cells irradiated with X-rays, protons or carbon ions. Radiotherapy and Oncology. févr 2025;203:110669. doi:10.1016/j.radonc.2024.110669

Rodriguez-Pastrana I, Birli E, Coutts AS. p53-dependent DNA repair during the DNA damage response requires actin nucleation by JMY. Cell Death Differ. juill 2023;30(7):1636-47. doi:10.1038/s41418-023-01170-9

Romano R, Cordella P, Bucci C. The Type III Intermediate Filament Protein Peripherin Regulates Lysosomal Degradation Activity and Autophagy. IJMS. 10 janv 2025;26(2):549. doi:10.3390/ijms26020549

Rongvaux A, Willinger T, Martinek J, Strowig T, Gearty SV, Teichmann LL, et al. Erratum: Corrigendum: Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. Nat Biotechnol. déc 2017;35(12):1211-1211. doi:10.1038/nbt1217-1211c

Rottner K, Hänisch J, Campellone KG. WASH, WHAMM and JMY: regulation of Arp2/3 complex and beyond. Trends in Cell Biology. nov 2010;20(11):650-61. doi:10.1016/j.tcb.2010.08.014

Roussos ET, Condeelis JS, Patsialou A. Chemotaxis in cancer. Nat Rev Cancer. août 2011;11(8):573-87. doi:10.1038/nrc3078

Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer. oct 1998;1378(2):F115-77. doi:10.1016/S0304-419X(98)00017-1

Rusak A, Gąsior-Głogowska M, Sargenti A, Krzyżak E, Kotowski K, Mrozowska M, et al. Inhibition of CHI3L1 decreases N-cadherin and VCAM-1 levels in glioblastoma. Pharmacol Rep. févr 2025;77(1):210-28. doi:10.1007/s43440-024-00677-3

Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport. Science. 13 févr 2004;303(5660):1007-10. doi:10.1126/science.1093133

Sachs N, De Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. Cell. janv 2018;172(1-2):373-386.e10. doi:10.1016/j.cell.2017.11.010

Safa AR, Saadatzadeh MR, Cohen-Gadol AA, Pollok KE, Bijangi-Vishehsaraei K. Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs. Genes & Diseases. juin 2015;2(2):152-63. doi:10.1016/j.gendis.2015.02.001

Safarians G, Sohrabi A, Solomon I, Xiao W, Bastola S, Rajput BW, et al. Glioblastoma Spheroid Invasion through Soft, Brain-Like Matrices Depends on Hyaluronic Acid–CD44 Interactions. Adv Healthcare Materials. juin 2023;12(14):2203143. doi:10.1002/adhm.202203143

Sagerer A, Eyüpoglu IY, Juratli TA, Cordes N. Context-specific targeting of focal adhesion kinase in brain tumors: lessons from glioblastoma and neurofibromatosis type 2-mutant meningioma. Front Oncol. 19 déc 2025;15:1724278. doi:10.3389/fonc.2025.1724278

Sahoo OS, Mitra R, Nagaiah NKH. The hidden architects of glioblastoma multiforme: Glioma stem cells. MedComm – Oncology. mars 2024;3(1):e66. doi:10.1002/mog2.66

Sakamoto M, Kageyama R, Imayoshi I. The functional significance of newly born neurons integrated into olfactory bulb circuits. Front Neurosci. 26 mai 2014;8. doi:10.3389/fnins.2014.00121

Samartha MVS, Dubey NK, Jena B, Maheswar G, Lo WC, Saxena S. AI-driven estimation of O6 methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) promoter methylation in glioblastoma patients: a systematic review with bias analysis. J Cancer Res Clin Oncol. 31 janv 2024;150(2):57. doi:10.1007/s00432-023-05566-5

Samkange-Zeeb F, Schlehofer B, Schüz J, Schlaefer K, Berg-Beckhoff G, Wahrendorf J, et al. Occupation and risk of glioma, meningioma and acoustic neuroma: Results from a German case–control study (Interphone Study Group, Germany). Cancer Epidemiology. févr 2010;34(1):55-61. doi:10.1016/j.canep.2009.12.003

Samuel MS, Lopez JI, McGhee EJ, Croft DR, Strachan D, Timpson P, et al. Actomyosin-Mediated Cellular Tension Drives Increased Tissue Stiffness and β-Catenin Activation to Induce Epidermal Hyperplasia and Tumor Growth. Cancer Cell. juin 2011;19(6):776-91. doi:10.1016/j.ccr.2011.05.008

Sanai N, Berger MS. GLIOMA EXTENT OF RESECTION AND ITS IMPACT ON PATIENT OUTCOME. Neurosurgery. avr 2008;62(4):753-66. doi:10.1227/01.neu.0000318159.21731.cf

Sanai N, Berger MS. Surgical oncology for gliomas: the state of the art. Nat Rev Clin Oncol. févr 2018;15(2):112-25. doi:10.1038/nrclinonc.2017.171

Sanai N, Polley MY, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas: Clinical article. JNS. juill 2011;115(1):3-8. doi:10.3171/2011.2.JNS10998

Schänzer A, Wachs F, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C, Beck H, et al. Direct Stimulation of Adult Neural Stem Cells In Vitro and Neurogenesis In Vivo by Vascular Endothelial Growth Factor. Brain Pathology. juill 2004;14(3):237-48. doi:10.1111/j.1750-3639.2004.tb00060.x

Schlüter K, Waschbüsch D, Anft M, Hügging D, Kind S, Hänisch J, et al. JMY is involved in anterograde vesicle trafficking from the trans-Golgi network. European Journal of Cell Biology. mai 2014;93(5-6):194-204. doi:10.1016/j.ejcb.2014.06.001

Schneider M, Vollmer L, Potthoff AL, Ravi VM, Evert BO, Rahman MA, et al. Meclofenamate causes loss of cellular tethering and decoupling of functional networks in glioblastoma. Neuro-Oncology. 2 nov 2021;23(11):1885-97. doi:10.1093/neuonc/noab092

Schüz J, Pirie K, Reeves GK, Floud S, Beral V, for the Million Women Study Collaborators. Cellular Telephone Use and the Risk of Brain Tumors: Update of the UK Million Women Study. JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 9 mai 2022;114(5):704-11. doi:10.1093/jnci/djac042

Schwartz AD, Hall CL, Barney LE, Babbitt CC, Peyton SR. Integrin α6 and EGFR signaling converge at mechanosensitive calpain 2. Biomaterials. sept 2018;178:73-82. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.05.056

Seano G, Jain RK. Vessel co-option in glioblastoma: emerging insights and opportunities. Angiogenesis. févr 2020;23(1):9-16. doi:10.1007/s10456-019-09691-z

Seki H, Kitabatake K, Tanuma S ichi, Tsukimoto M. Involvement of RAGE in radiation-induced acquisition of malignant phenotypes in human glioblastoma cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. sept 2024;1868(9):130650. doi:10.1016/j.bbagen.2024.130650

Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. Current Opinion in Genetics & Development. févr 2010;20(1):51-6. doi:10.1016/j.gde.2009.10.009

Sendtner N, Seitz R, Brandl N, Müller M, Gülow K. Reactive Oxygen Species Across Death Pathways: Gatekeepers of Apoptosis, Ferroptosis, Pyroptosis, Paraptosis, and Beyond. IJMS. 21 oct 2025;26(20):10240. doi:10.3390/ijms262010240

Senft C, Bink A, Franz K, Vatter H, Gasser T, Seifert V. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. The Lancet Oncology. oct 2011;12(11):997-1003. doi:10.1016/S1470-2045(11)70196-6

Seymour T, Nowak A, Kakulas F. Targeting Aggressive Cancer Stem Cells in Glioblastoma. Front Oncol. 20 juill 2015;5. doi:10.3389/fonc.2015.00159

Shah AH, Rivas SR, Doucet-O'Hare TT, Govindarajan V, DeMarino C, Wang T, et al. Human endogenous retrovirus K contributes to a stem cell niche in glioblastoma. Journal of Clinical Investigation. 3 juill 2023;133(13):e167929. doi:10.1172/JCI167929

Shaikh A, Mohan A, Collins M, Santis G, Parsons M. Ligand- and integrin-independent mechano-sensitive EGFR activation in lung cancer cells. Journal of Cell Science. 15 nov 2025;138(22):jcs264107. doi:10.1242/jcs.264107

Shi Y, Sun L, Wang M, Liu J, Zhong S, Li R, et al. Vascularized human cortical organoids (vOrganoids) model cortical development in vivo. Ye B, éditeur. PLoS Biol. 13 mai 2020;18(5):e3000705. doi:10.1371/journal.pbio.3000705

Shi Z, Hu C, Liu J, Cheng W, Chen X, Liu X, et al. Single-Cell Sequencing Reveals the Role of Radiation-Induced Stemness-Responsive Cancer Cells in the Development of Radioresistance. IJMS. 8 févr 2025;26(4):1433. doi:10.3390/ijms26041433

Shibamoto Y. Comparison of accelerated hyperfractionated radiotherapy and conventional radiotherapy for supratentorial malignant glioma. Japanese Journal of Clinical Oncology. 1 févr 1997;27(1):31-6. doi:10.1093/jjco/27.1.31

Shimada M, Matsumoto Y. Antioxidants Ameliorates Ionizing Radiation-Induced Microcephaly in Cerebral Organoid Derived from Human-induced Pluripotent Stem Cells. Radiation Research. 14 avr 2025;203(6). doi:10.1667/RADE-25-00017.1

Shikama, Chang-Woo Lee, Stephen France, Laurent Delavaine, Jonathan Lyon, Marija Krstic-Demonacos, Nicholas B La Thangue, A Novel Cofactor for p300 that Regulates the p53 Response, Molecular Cell,Volume 4, Issue 3,1999, ISSN 1097-2765, https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80338-X.

Shukla G, Alexander GS, Bakas S, Nikam R, Talekar K, Palmer JD, et al. Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: a review. Chin Clin Oncol. août 2017;6(4):40-40. doi:10.21037/cco.2017.06.28

Silvestre DC, Pineda JR, Hoffschir F, Studler JM, Mouthon MA, Pflumio F, et al. Alternative Lengthening of Telomeres in Human Glioma Stem Cells. Stem Cells. 1 mars 2011;29(3):440-51. doi:10.1002/stem.600

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res. 15 sept 2003;63(18):5821-8. PubMed PMID: 14522905.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature. nov 2004;432(7015):396-401. doi:10.1038/nature03128

Singh S, Dey D, Barik D, Mohapatra I, Kim S, Sharma M, et al. Glioblastoma at the crossroads: current understanding and future therapeutic horizons. Sig Transduct Target Ther. 9 juill 2025;10(1):213. doi:10.1038/s41392-025-02299-4

Sisto M, Lisi S. Amphiregulin and Fibrosis: Existing Evidence and Future Directions. IJMS. 8 août 2025;26(16):7678. doi:10.3390/ijms26167678

Skardal A, Murphy SV, Devarasetty M, Mead I, Kang HW, Seol YJ, et al. Multi-tissue interactions in an integrated three-tissue organ-on-a-chip platform. Sci Rep. 18 août 2017;7(1):8837. doi:10.1038/s41598-017-08879-x

Skene JHP, Jacobson RD, Snipes GJ, McGuire CB, Norden JJ, Freeman JA. A Protein Induced During Nerve Growth (GAP-43) is a Major Component of Growth-Cone Membranes. Science. 15 août 1986;233(4765):783-6. doi:10.1126/science.3738509

Sleurs C, Zegers CML, Ribeiro MF, Van Elmpt W, Dijkstra J, Postma AA, et al. Radiotherapy-induced neurocognitive decline among adult intracranial tumor patients: A voxel-based approach. Neuro-Oncology. 1 oct 2025;27(10):2634-46. doi:10.1093/neuonc/noaf114

Smyth JW, Guo S, Chaunsali L, O'Rourke L, Dahlka J, Deaver S, et al. Cytoplasmic connexin43-microtubule interactions promote glioblastoma stem-like cell maintenance and tumorigenicity. Cell Death Dis. 16 mai 2025;16(1):388. doi:10.1038/s41419-025-07514-2

Sneed PK, Gutin PH, Larson DA, Malec MK, Phillips TL, Prados MD, et al. Patterns of recurrence of glioblastoma multiforme after external irradiation followed by implant boost. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics. juill 1994;29(4):719-27. doi:10.1016/0360-3016(94)90559-2

Snezhkina AV, Nyushko KM, Zaretsky AR, Shagin DA, Sadritdinova AF, Fedorova MS, et al. Transcription Factor SAP30 Is Involved in the Activation of NETO2 Gene Expression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Mol Biol. mai 2018;52(3):385-92. doi:10.1134/S0026893318020152

Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, Nitta M, Zhelyazkova BH, Davidson CJ, et al. Mosaic Amplification of Multiple Receptor Tyrosine Kinase Genes in Glioblastoma. Cancer Cell. déc 2011;20(6):810-7. doi:10.1016/j.ccr.2011.11.005

Sofia Vala I, Martins LR, Imaizumi N, Nunes RJ, Rino J, Kuonen F, et al. Low Doses of Ionizing Radiation Promote Tumor Growth and Metastasis by Enhancing Angiogenesis. Gartel AL, éditeur. PLoS ONE. 21 juin 2010;5(6):e11222. doi:10.1371/journal.pone.0011222

Sojka C, Sloan SA. Gliomas: a reflection of temporal gliogenic principles. Commun Biol. 6 févr 2024;7(1):156. doi:10.1038/s42003-024-05833-2

Song Y, Jo H, Jeong S, Kim I, Lee SS. Vascularised Brain Organoids: Engineering Strategies and Neurobiological Applications. Cell Proliferation. mars 2026;59(3):e70161. doi:10.1111/cpr.70161

Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. Proc Natl Acad Sci USA. 5 mars 2013;110(10):4009-14. doi:10.1073/pnas.1219747110

Spitz DR, Azzam EI, Jian Li J, Gius D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: A unifying concept in stress response biology. Cancer Metastasis Rev. août 2004;23(3-4):311-22. doi:10.1023/B:CANC.0000031769.14728.bc

Stanzani E, Pedrosa L, Bourmeau G, Anezo O, Noguera-Castells A, Esteve-Codina A, et al. Dual Role of Integrin Alpha-6 in Glioblastoma: Supporting Stemness in Proneural Stem-Like Cells While Inducing Radioresistance in Mesenchymal Stem-Like Cells. Cancers. 19 juin 2021;13(12):3055. doi:10.3390/cancers13123055

Stefaniuk M, Swiech L, Dzwonek J, Lukasiuk K. Expression of Ttyh1, a member of the Tweety family in neurons in vitro and in vivo and its potential role in brain pathology. Journal of Neurochemistry. déc 2010;115(5):1183-94. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07023.x

Stupp R, Hegi ME, Mason WP. 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. Vol. 10. 2009;10.

Stupp R, Weller M, Belanger K, Bogdahn U, Ludwin SK, Lacombe D, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. The new england journal of medicine. 2005.

Suarez-Meade P, Whitehead R, Rosenfeld S, Schiapparelli P, Konstantopoulos K, Quinones-Hinojosa A. Extracellular matrix stiffness conditions glioblastoma cells for long-term migration: Mechanical memory as a driver of invasion and recurrence in glioblastoma. Neuro-Oncology. 1 janv 2026;28(1):19-37. doi:10.1093/neuonc/noaf205

Sulimenko V, Dráberová E, Sládková V, Sulimenko T, Vosecká V, Skalli O, et al. Regulation of microtubule nucleation in glioblastoma cells by ARF GTPase-activating proteins GIT1 and GIT2 and protein kinase C. Cancer Cell Int. 2 avr 2025;25(1):125. doi:10.1186/s12935-025-03740-y

Sullivan KM, Ko E, Kim EM, Ballance WC, Ito JD, Chalifoux M, et al. Extracellular Microenvironmental Control for Organoid Assembly. Tissue Engineering Part B: Reviews. déc 2022;28(6):1209-22. doi:10.1089/ten.teb.2021.0186

Sun B, Wang M, Hoerder-Suabedissen A, Xu C, Packer AM, Szele FG. Intravital imaging of the murine subventricular zone with three photon microscopy. Cerebral Cortex. 12 juill 2022;32(14):3057-67. doi:10.1093/cercor/bhab400

Sun L, Hui AM, Su Q, Vortmeyer A, Kotliarov Y, Pastorino S, et al. Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. Cancer Cell. avr 2006;9(4):287-300. doi:10.1016/j.ccr.2006.03.003

Sun SC, Sun QY, Kim NH. JMY is required for asymmetric division and cytokinesis in mouse oocytes. Molecular Human Reproduction. 1 mai 2011;17(5):296-304. doi:10.1093/molehr/gar006

Sun SC, Gao WW, Xu YN, Jin YX, Wang QL, Yin XJ, et al. Degradation of actin nucleators affects cortical polarity of aged mouse oocytes. Fertility and Sterility. avr 2012;97(4):984-90. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.01.101

Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. Chromosoma. juin 2018;127(2):175-86. doi:10.1007/s00412-018-0659-8

Sun Z, Tang Y, Zhang Y, Fang Y, Jia J, Zeng W, et al. Joint single-cell multiomic analysis in Wnt3a induced asymmetric stem cell division. Nat Commun. 12 oct 2021;12(1):5941. doi:10.1038/s41467-021-26203-0

Sundahl N, Duprez F, Ost P, De Neve W, Mareel M. Effects of radiation on the metastatic process. Mol Med. déc 2018;24(1):16. doi:10.1186/s10020-018-0015-8

Sundarraj N, Schachner M, Pfeiffer SE. Biochemically differentiated mouse glial lines carrying a nervous system specific cell surface antigen (NS-1). Proc Natl Acad Sci USA. mai 1975;72(5):1927-31. doi:10.1073/pnas.72.5.1927

Taioli S, Dapor M. Advancements in secondary and backscattered electron energy spectra and yields analysis: From theory to applications. Surface Science Reports. mars 2025;80(1):100646. doi:10.1016/j.surfrep.2024.100646

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell. nov 2007;131(5):861-72. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell. août 2006;126(4):663-76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024

Tamai S, Ichinose T, Tsutsui T, Tanaka S, Garaeva F, Sabit H, et al. Tumor Microenvironment in Glioma Invasion. Brain Sciences. 15 avr 2022;12(4):505. doi:10.3390/brainsci12040505

Tamborini M, Ribecco V, Stanzani E, Sironi A, Tambalo M, Franzone D, et al. Extracellular vesicles released by glioblastoma cancer cells drive tumor invasiveness via Connexin-43 gap junctions. Neuro-Oncology. 1 nov 2025;27(11):2843-60. doi:10.1093/neuonc/noaf013

Tan X, Shi SH. Neocortical neurogenesis and neuronal migration. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2013 Jul;2(4):443-59. doi: 10.1002/wdev.88. Epub 2012 Sep 18. PMID: 24014417; PMCID: PMC3767922.

Tan AC, Ashley DM, López GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. CA A Cancer J Clinicians. juill 2020;70(4):299-312. doi:10.3322/caac.21613

Tan G he, Chen X ren, Qi S ya, Huang Q yun, Chen M yue, Wei L hang, et al. Junction-mediating and regulatory protein (JMY) is a promoting protein for radial migration of cortical neurons [Internet]. 2025 [cité 30 mars 2026]. Disponible sur: https://www.researchsquare.com/article/rs-7054125/v1 doi:10.21203/rs.3.rs-7054125/v1

Tan Q, Li F, Wang J, Zou Y, Tang Y, Cai Y, et al. HIF-1α Mediated Regulation of Glioblastoma Malignant Phenotypes through CD47 Protein: Understanding Functions and Mechanisms. J Cancer. 1 janv 2025;16(3):750-64. doi:10.7150/jca.101050

Tancredi-Cueto N, Vigil-Bastitta G, Bologna-Molina R, Beovide-Cortegoso V. The value of Phosphohistone H3 as a cell proliferation marker in oral squamous cell carcinoma. A comparative study with Ki-67 and the mitotic activity index. Med Oral. 2022;e444-51. doi:10.4317/medoral.25420

Tang DD, Gerlach BD. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. Respir Res. déc 2017;18(1):54. doi:10.1186/s12931-017-0544-7

Tang J, Amin MA, Campian JL. Glioblastoma Stem Cells at the Nexus of Tumor Heterogeneity, Immune Evasion, and Therapeutic Resistance. Cells. 9 avr 2025;14(8):562. doi:10.3390/cells14080562

Tao Z, Sun Y, Yilamu Y, Xu B, Yu C, Zhang H, et al. SERPINE1 maintained expression by NR4A1 promotes invasion and migration of glioblastoma in hypoxic microenvironment. Front Oncol. 9 janv 2026;15:1750546. doi:10.3389/fonc.2025.1750546

Tapia N, Schöler HR. Molecular Obstacles to Clinical Translation of iPSCs. Cell Stem Cell. sept 2016;19(3):298-309. doi:10.1016/j.stem.2016.06.017

Tapia-Rojo R, Garcia-Manyes S. Nanomechanics at the extracellular matrix-focal adhesion interface. Current Opinion in Biomedical Engineering. sept 2025;35:100599. doi:10.1016/j.cobme.2025.100599

Tata M, Ruhrberg C, Fantin A. Vascularisation of the central nervous system. Mechanisms of Development. nov 2015;138:26-36. doi:10.1016/j.mod.2015.07.001

Tavazoie M, Van Der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, et al. A Specialized Vascular Niche for Adult Neural Stem Cells. Cell Stem Cell. sept 2008;3(3):279-88. doi:10.1016/j.stem.2008.07.025

Terskikh AV, Bryant PJ, Schwartz PH. Mammalian Stem Cells. Pediatr Res. avr 2006;59:13R-20R. doi:10.1203/01.pdr.0000205154.86517.2a

Tetzlaff SK, Reyhan E, Layer N, Bengtson CP, Heuer A, Schroers J, et al. Characterizing and targeting glioblastoma neuron-tumor networks with retrograde tracing. Cell. janv 2025;188(2):390-411.e36. doi:10.1016/j.cell.2024.11.002

Thangaretnam K, Islam MO, Lv J, El-Rifai A, Perloff A, Soutto HL, et al. WEE1 inhibition in cancer therapy: Mechanisms, synergies, preclinical insights, and clinical trials. Critical Reviews in Oncology/Hematology. juill 2025;211:104710. doi:10.1016/j.critrevonc.2025.104710

Thanh HD, Lee S, Nguyen TT, Huu TN, Ahn EJ, Cho SH, et al. Temozolomide promotes matrix metalloproteinase 9 expression through p38 MAPK and JNK pathways in glioblastoma cells. Sci Rep. 21 juin 2024;14(1):14341. doi:10.1038/s41598-024-65398-2

Tian L, Wang W, Sun W, Zhou H, Xiao Z, Han X, et al. Exploration of Diffusion Tensor Imaging for Delineating Target Volume Boundary in Glioblastoma Radiotherapy. J Med Imaging Radiat Oncol. août 2025;69(5):601-9. doi:10.1111/1754-9485.13873 PubMed PMID: 40495467; PubMed Central PMCID: PMC12317363.

Tidball AM, Niu W, Ma Q, Takla TN, Walker JC, Margolis JL, et al. Deriving early single-rosette brain organoids from human pluripotent stem cells. Stem Cell Reports. déc 2023;18(12):2498-514. doi:10.1016/j.stemcr.2023.10.020

Tomasetti C, Li L, Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. Science. 24 mars 2017;355(6331):1330-4. doi:10.1126/science.aaf9011

Tornavaca O, Chia M, Dufton N, Almagro LO, Conway DE, Randi AM, et al. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell–cell tension, angiogenesis, and barrier formation. Journal of Cell Biology. 16 mars 2015;208(6):821-38. doi:10.1083/jcb.201404140

Torsvik A, Stieber D, Enger PØ, Golebiewska A, Molven A, Svendsen A, et al. U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells. Cancer Medicine. août 2014;3(4):812-24. doi:10.1002/cam4.219

Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S, et al. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. The Journal of Cell Biology. 2 févr 2004;164(3):427-39. doi:10.1083/jcb.200306172

Tsai LH, Gleeson JG. Nucleokinesis in Neuronal Migration. Neuron. mai 2005;46(3):383-8. doi:10.1016/j.neuron.2005.04.013

Tsutsumi K, Tsuda M, Yazawa N, Nakamura H, Ishihara S, Haga H, et al. Increased Motility and Invasiveness in Tumor Cells That Survive 10 Gy Irradiation. Cell Struct Funct. 2009;34(2):89-96. doi:10.1247/csf.09006

Turinetto V, Orlando L, Giachino C. Induced Pluripotent Stem Cells: Advances in the Quest for Genetic Stability during Reprogramming Process. IJMS. 13 sept 2017;18(9):1952. doi:10.3390/ijms18091952

Ulrich TA, De Juan Pardo EM, Kumar S. The Mechanical Rigidity of the Extracellular Matrix Regulates the Structure, Motility, and Proliferation of Glioma Cells. Cancer Research. 15 mai 2009;69(10):4167-74. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4859

Vadla R, Miki S, Taylor B, Kawauchi D, Jones BM, Nathwani N, et al. Glioblastoma Mesenchymal Transition and Invasion are Dependent on a NF-κB/BRD2 Chromatin Complex [Internet]. 2023 [cité 6 avr 2026]. Disponible sur: http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.07.03.546613 doi:10.1101/2023.07.03.546613

Vadla R, Taylor B, Miyake Y, Lin B, Kawauchi D, Miki S, et al. BRD2 bromodomain-mediated regulation of cell state plasticity modulates therapy response in glioblastoma. Neuro-Oncology. 1 nov 2025;27(11):2828-42. doi:10.1093/neuonc/noaf169

Valamparamban GF, Spéder P. Homemade: building the structure of the neurogenic niche. Front Cell Dev Biol. 1 déc 2023;11:1275963. doi:10.3389/fcell.2023.1275963

Valdebenito S, Malik S, Luu R, Loudig O, Mitchell M, Okafo G, et al. Tunneling nanotubes, TNT, communicate glioblastoma with surrounding non-tumor astrocytes to adapt them to hypoxic and metabolic tumor conditions. Sci Rep. 15 juill 2021;11(1):14556. doi:10.1038/s41598-021-93775-8

Van Bodegraven EJ, Infante E, Peglion F, Pereira D, Kesenci Y, Roca V, et al. Intermediate filaments promote glioblastoma cell invasion by controlling nuclear deformations and mechanosensitive expression of MMP14. Cell Reports. nov 2025;44(11):116553. doi:10.1016/j.celrep.2025.116553

Van Opijnen MP, Van Valkengoed DR, De Ligt J, De Vos FYF, Broekman MLD, Cuppen E, et al. Whole genome sequencing-based analysis of genetic predisposition to adult glioblastoma [Internet]. 2025 [cité 5 avr 2026]. Disponible sur: http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2025.01.16.25320661 doi:10.1101/2025.01.16.25320661

Vaubel RA, Tian S, Remonde D, Schroeder MA, Mladek AC, Kitange GJ, et al. Genomic and Phenotypic Characterization of a Broad Panel of Patient-Derived Xenografts Reflects the Diversity of Glioblastoma. Clinical Cancer Research. 1 mars 2020;26(5):1094-104. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0909

Velasco S, Kedaigle AJ, Simmons SK, Nash A, Rocha M, Quadrato G, et al. Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. Nature. juin 2019;570(7762):523-7. doi:10.1038/s41586-019-1289-x

Veltman DM, Insall RH. WASP Family Proteins: Their Evolution and Its Physiological Implications. Pollard T, éditeur. MBoC. 15 août 2010;21(16):2880-93. doi:10.1091/mbc.e10-04-0372

Venkataramani V, Schneider M, Giordano FA, Kuner T, Wick W, Herrlinger U, et al. Disconnecting multicellular networks in brain tumours. Nat Rev Cancer. août 2022;22(8):481-91. doi:10.1038/s41568-022-00475-0

Verboon JM, Sugumar B, Parkhurst SM. Wiskott-Aldrich syndrome proteins in the nucleus: aWASH with possibilities. Nucleus. 3 sept 2015;6(5):349-59. doi:10.1080/19491034.2015.1086051

Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell. janv 2010;17(1):98-110. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020

Vicente JJ, Khan K, Tillinghast G, McFaline-Figueroa JL, Sancak Y, Stella N. The microtubule targeting agent ST-401 triggers cell death in interphase and prevents the formation of polyploid giant cancer cells. J Transl Med. 10 mai 2024;22(1):441. doi:10.1186/s12967-024-05234-3

Vilalta M, Rafat M, Graves EE. Effects of radiation on metastasis and tumor cell migration. Cell Mol Life Sci. août 2016;73(16):2999-3007. doi:10.1007/s00018-016-2210-5

Vilchez Mercedes SA, Bocci F, Levine H, Onuchic JN, Jolly MK, Wong PK. Decoding leader cells in collective cancer invasion. Nat Rev Cancer. sept 2021;21(9):592-604. doi:10.1038/s41568-021-00376-8

Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, Jamin Y, Fernández-Mateos J, Khan K, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. Science. 23 févr 2018;359(6378):920-6. doi:10.1126/science.aao2774

Volovetz J, Berezovsky AD, Alban T, Chen Y, Lauko A, Aranjuez GF, et al. Identifying conserved molecular targets required for cell migration of glioblastoma cancer stem cells. Cell Death Dis. 26 févr 2020;11(2):152. doi:10.1038/s41419-020-2342-2

Von Essen CF. Radiation enhancement of metastasis: a review. Clin Exp Metast. mars 1991;9(2):77-104. doi:10.1007/BF01756381

Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. Nat Rev Cancer. 1 août 2002;2(8):594-604. doi:10.1038/nrc864

Walcher L, Kistenmacher AK, Suo H, Kitte R, Dluczek S, Strauß A, et al. Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. Front Immunol. 7 août 2020;11:1280. doi:10.3389/fimmu.2020.01280

Walker CJ, Mrózek K, Ozer HG, Nicolet D, Kohlschmidt J, Papaioannou D, et al. Gene expression signature predicts relapse in adult patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. Blood Advances. 9 mars 2021;5(5):1474-82. doi:10.1182/bloodadvances.2020003727

Walker TL, Yasuda T, Adams DJ, Bartlett PF. The Doublecortin-Expressing Population in the Developing and Adult Brain Contains Multipotential Precursors in Addition to Neuronal-Lineage Cells. J Neurosci. 4 avr 2007;27(14):3734-42. doi:10.1523/JNEUROSCI.5060-06.2007

Wang B, Li C, Gu J, Wang X, Xun M, Jiang B, et al. Targeting glioma-associated microglia and macrophages: a new frontier in glioblastoma immunotherapy. Front Immunol. 17 déc 2025;16:1726440. doi:10.3389/fimmu.2025.1726440

Wang H, Man Q, Huo F, Gao X, Lin H, Li S, et al. STAT3 pathway in cancers: Past, present, and future. MedComm. juin 2022;3(2):e124. doi:10.1002/mco2.124

Wang J, Ma Y, Cooper MK. Cancer stem cells in glioma: challenges and opportunities. Translational Cancer Research. 2013;2(5).

Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang XF, White RR, et al. Notch Promotes Radioresistance of Glioma Stem Cells. Stem Cells. 1 janv 2010;28(1):17-28. doi:10.1002/stem.261

Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. Cancer Cell. juill 2017;32(1):42-56.e6. doi:10.1016/j.ccell.2017.06.003

Wang Q, Hu X, Hu B, Muller F, Kim H, Squatrito M, et al. Tumor evolution of glioma intrinsic gene expression subtype associates with immunological changes in the microenvironment [Internet]. 2016 [cité 5 avr 2026]. Disponible sur: http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/052076 doi:10.1101/052076

Wang QC, Liu J, Wang F, Duan X, Dai XX, Wang T, et al. Role of Nucleation-Promoting Factors in Mouse Early Embryo Development. Microsc Microanal. juin 2013;19(3):559-64. doi:10.1017/S1431927613000032

Wang X, Liang J, Sun H. The Network of Tumor Microtubes: An Improperly Reactivated Neural Cell Network With Stemness Feature for Resistance and Recurrence in Gliomas. Front Oncol. 29 juin 2022;12:921975. doi:10.3389/fonc.2022.921975

Wang X, Prager BC, Wu Q, Kim LJY, Gimple RC, Shi Y, et al. Reciprocal Signaling between Glioblastoma Stem Cells and Differentiated Tumor Cells Promotes Malignant Progression. Cell Stem Cell. avr 2018;22(4):514-528.e5. doi:10.1016/j.stem.2018.03.011

Wang Y, Shi P, Liu G, Chen W, Wang YJ, Hu Y, et al. Espin enhances confined cell migration by promoting filopodia formation and contributes to cancer metastasis. EMBO Rep. 4 avr 2025;26(10):2574-96. doi:10.1038/s44319-025-00437-1

Wang YL, Zhou DJ, Wang QW, Zhang Y, Yang WJ, Tan WJ, et al. Dynamic dual regulation of amphiregulin in liver pathophysiology: balancing regeneration and disease progression via the EGFR axis. Front Med. 18 févr 2026;13:1697954. doi:10.3389/fmed.2026.1697954

Wang Y. JimMY on the stage: Linking DNA damage with cell adhesion and motility. Cell Adhesion & Migration. avr 2010;4(2):166-8. doi:10.4161/cam.4.2.11368

Wang Y, Wang Y, Bao H, Wang Z, Jiang T. Mechanisms and therapeutic implications of glioma-neuron interactions. Cancer Letters. oct 2025;629:217884. doi:10.1016/j.canlet.2025.217884

Wang Y, McNiven MA. Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK–p130Cas complex. Journal of Cell Biology. 6 févr 2012;196(3):375-85. doi:10.1083/jcb.201105153

Wang Z, Zhang H, Xu S, Liu Z, Cheng Q. The adaptive transition of glioblastoma stem cells and its implications on treatments. Sig Transduct Target Ther. 23 mars 2021;6(1):124. doi:10.1038/s41392-021-00491-w

Wank M, Schilling D, Reindl J, Meyer B, Gempt J, Motov S, et al. Evaluation of radiation-related invasion in primary patient-derived glioma cells and validation with established cell lines: impact of different radiation qualities with differing LET. J Neurooncol. sept 2018;139(3):583-90. doi:10.1007/s11060-018-2923-4

Watanabe T, Noritake J, Kaibuchi K. Regulation of microtubules in cell migration. Trends in Cell Biology. févr 2005;15(2):76-83. doi:10.1016/j.tcb.2004.12.006

Watson DC, Bayik D, Storevik S, Moreino SS, Sprowls SA, Han J, et al. GAP43-dependent mitochondria transfer from astrocytes enhances glioblastoma tumorigenicity. Nat Cancer. 11 mai 2023;4(5):648-64. doi:10.1038/s43018-023-00556-5

Wegner M, Stolt CC. From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. Trends in Neurosciences. nov 2005;28(11):583-8. doi:10.1016/j.tins.2005.08.008

Weil S, Osswald M, Solecki G, Grosch J, Jung E, Lemke D, et al. Tumor microtubes convey resistance to surgical lesions and chemotherapy in gliomas. Neuro-Oncology. oct 2017;19(10):1316-26. doi:10.1093/neuonc/nox070

Weinberg F, Chandel NS. Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. Cell Mol Life Sci. déc 2009;66(23):3663-73. doi:10.1007/s00018-009-0099-y

Wellcome Trust Case Control Consortium, The Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. Nat Genet. nov 2007;39(11):1329-37. doi:10.1038/ng.2007.17

Weller M, Albert NL, Galldiks N, Bink A, Preusser M, Sulman EP, et al. Targeted radionuclide therapy for gliomas: Emerging clinical trial landscape. Neuro-Oncology. 9 déc 2024;26(Supplement_9):S208-14. doi:10.1093/neuonc/noae125

Weller M, Van Den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. Nat Rev Clin Oncol. mars 2021;18(3):170-86. doi:10.1038/s41571-020-00447-z

Wen PY, Kesari S. Malignant Gliomas in Adults. N Engl J Med. 31 juill 2008;359(5):492-507. doi:10.1056/NEJMra0708126

Werner H. The IGF1 Signaling Pathway: From Basic Concepts to Therapeutic Opportunities. IJMS. 4 oct 2023;24(19):14882. doi:10.3390/ijms241914882

Wild-Bode C, Weller M, Rimner A, Dichgans J, Wick W. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. Cancer Res. 15 mars 2001;61(6):2744-50. PubMed PMID: 11289157.

Winkler F. Silencing glioblastoma networks to make temozolomide more effective. Neuro-Oncology. 2 nov 2021;23(11):1807-9. doi:10.1093/neuonc/noab186

Winkler F, Kienast Y, Fuhrmann M, Von Baumgarten L, Burgold S, Mitteregger G, et al. Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis. Glia. sept 2009;57(12):1306-15. doi:10.1002/glia.20850

Winkler J, Abisoye-Ogunniyan A, Metcalf KJ, Werb Z. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. Nat Commun. 9 oct 2020;11(1):5120. doi:10.1038/s41467-020-18794-x

Wishart AL, Conner SJ, Guarin JR, Fatherree JP, Peng Y, McGinn RA, et al. Decellularized extracellular matrix scaffolds identify full-length collagen VI as a driver of breast cancer cell invasion in obesity and metastasis. Sci Adv. 23 oct 2020;6(43):eabc3175. doi:10.1126/sciadv.abc3175

Wittko IM, Schanzer A, Kuzmichev A, Schneider FT, Shibuya M, Raab S, et al. VEGFR-1 Regulates Adult Olfactory Bulb Neurogenesis and Migration of Neural Progenitors in the Rostral Migratory Stream In Vivo. Journal of Neuroscience. 8 juill 2009;29(27):8704-14. doi:10.1523/JNEUROSCI.5527-08.2009

Wobus AM, Boheler KR. Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. Physiological Reviews. avr 2005;85(2):635-78. doi:10.1152/physrev.00054.2003

Woehrer A, Bauchet L, Barnholtz-Sloan JS. Glioblastoma survival: has it improved? Evidence from population-based studies. Current Opinion in Neurology. déc 2014;27(6):666-74. doi:10.1097/WCO.0000000000000144

Wrighton KH. JMY: actin up in cell motility. Nat Rev Mol Cell Biol. mai 2009;10(5):304-304. doi:10.1038/nrm2678

Wu A, Wei J, Kong LY, Wang Y, Priebe W, Qiao W, et al. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. Neuro-Oncology. nov 2010;12(11):1113-25. doi:10.1093/neuonc/noq082

Wu J, Li R, Wang J, Zhu H, Ma Y, You C, et al. Reactive Astrocytes in Glioma: Emerging Opportunities and Challenges. IJMS. 23 mars 2025;26(7):2907. doi:10.3390/ijms26072907

Wu M, Zhao X, Zhu X, Shi J, Liu L, Wang X, et al. Functional analysis and expression profile of human platelets infected by EBV in vitro. Infection, Genetics and Evolution. août 2022;102:105312. doi:10.1016/j.meegid.2022.105312

Wu W, Wong K, Chen J hui, Jiang Z hong, Dupuis S, Wu JY, et al. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. Nature. juill 1999;400(6742):331-6. doi:10.1038/22477

Xia P. The significance of epithelial–mesenchymal transition (EMT) in the initiation, plasticity, and treatment of glioblastoma. Genes & Diseases. janv 2026;13(1):101711. doi:10.1016/j.gendis.2025.101711

Xiao S, Tian L, Gan X, Xu X, Liao M, Song D, et al. Role of Ubiquitin-regulated EMT in Cancer Metastasis and Chemoresistance. Int J Biol Sci. 29 sept 2025;21(14):6081-112. doi:10.7150/ijbs.115401

Xie T, Danieli-Mackay A, Buccarelli M, Barbieri M, Papadionysiou I, D'Alessandris QG, et al. Pervasive structural heterogeneity rewires glioblastoma chromosomes to sustain patient-specific transcriptional programs. Nat Commun. 9 mai 2024;15(1):3905. doi:10.1038/s41467-024-48053-2

Xie XP, Laks DR, Sun D, Ganbold M, Wang Z, Pedraza AM, et al. Quiescent human glioblastoma cancer stem cells drive tumor initiation, expansion, and recurrence following chemotherapy. Developmental Cell. janv 2022;57(1):32-46.e8. doi:10.1016/j.devcel.2021.12.007

Xu C, Hou P, Li X, Xiao M, Zhang Z, Li Z, et al. Comprehensive understanding of glioblastoma molecular phenotypes: classification, characteristics, and transition. Cancer Biol Med. 6 mai 2024;1-19. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2023.0510

Xu X, Zheng Y, Luo L, You Z, Chen H, Wang J, et al. Glioblastoma stem cells deliver ABCB4 transcribed by ATF3 via exosomes conferring glioblastoma resistance to temozolomide. Cell Death Dis. 6 mai 2024;15(5):318. doi:10.1038/s41419-024-06695-6

Xu X, Fang Z, Jiang W, Chou J, Lu Y. The effect and related mechanisms of RAC1 GTP on radiotherapy for hepatocellular carcinoma. Transl Cancer Res. juin 2025;14(6):3772-84. doi:10.21037/tcr-2025-987

Yabut OR, Pleasure SJ. The Crossroads of Neural Stem Cell Development and Tumorigenesis [Internet]. 25 déc 2016. doi:10.20388/OMP2016.003.0040

Yadav N, Purow BW. Understanding current experimental models of glioblastoma-brain microenvironment interactions. J Neurooncol. janv 2024;166(2):213-29. doi:10.1007/s11060-023-04536-8

Yang F, Akhtar MN, Zhang D, El-Mayta R, Shin J, Dorsey JF, et al. An immunosuppressive vascular niche drives macrophage polarization and immunotherapy resistance in glioblastoma. Sci Adv. mars 2024;10(9):eadj4678. doi:10.1126/sciadv.adj4678

Yang L, Wei W, Yuan X, Guo E, Peng P, Wang J, et al. Targeting DNA Damage Repair to Enhance Antitumor Immunity in Radiotherapy: Mechanisms and Opportunities. IJMS. 16 avr 2025;26(8):3743. doi:10.3390/ijms26083743

Yang N, Yan T, Zhu H, Liang X, Leiss L, Sakariassen PØ, et al. A co-culture model with brain tumor-specific bioluminescence demonstrates astrocyte-induced drug resistance in glioblastoma. J Transl Med. déc 2014;12(1):278. doi:10.1186/s12967-014-0278-

Yang YF, He ZJ, Kuo HH, Lin YY, Kim CH, Cai HY, et al. Targeting ESR1 restores SQSTM1-dependent autophagy and sensitizes ER-positive breast cancer to oxidative and radiation stress. Cell Death Discov. 7 oct 2025;11(1):451. doi:10.1038/s41420-025-02755-8

Yang Y, Jin X, Xie Y, Ning C, Ai Y, Wei H, et al. The CEBPB+ glioblastoma subcluster specifically drives the formation of M2 tumor-associated macrophages to promote malignancy growth. Theranostics. 2024;14(10):4107-26. doi:10.7150/thno.93473

Yao M, Li S, Wu X, Diao S, Zhang G, He H, et al. Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. Cell Mol Immunol. août 2018;15(8):737-9. doi:10.1038/cmi.2017.159

Yao M, Ventura PB, Jiang Y, Rodriguez FJ, Wang L, Perry JSA, et al. Astrocytic trans-Differentiation Completes a Multicellular Paracrine Feedback Loop Required for Medulloblastoma Tumor Growth. Cell. févr 2020;180(3):502-520.e19. doi:10.1016/j.cell.2019.12.024

Yilmaz MT, Kahvecioglu A, Yedekci FY, Yigit E, Ciftci GC, Kertmen N, et al. Comparison of different target volume delineation strategies based on recurrence patterns in adjuvant radiotherapy for glioblastoma. Neuro-Oncology Practice. 10 mai 2024;11(3):275-83. doi:10.1093/nop/npae009

Yin J, Seo Y, Rhim J, Jin X, Kim TH, Kim SS, et al. Cross-talk between PARN and EGFR–STAT3 Signaling Facilitates Self-Renewal and Proliferation of Glioblastoma Stem Cells. Cancer Research. 15 nov 2023;83(22):3693-709. doi:10.1158/0008-5472.CAN-22-3965

Yoshii Y, Saito A, Zhao DW, Nose T. Copper/Zinc Superoxide Dismutase, Nuclear DNA Content, and Progression in Human Gliomas. J Neurooncol. mai 1999;42(2):103-8. doi:10.1023/A:1006122923952

Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. Nat Rev Cancer. nov 2014;14(11):736-46. doi:10.1038/nrc3818

Yu J. Vascularized Organoids: A More Complete Model. IJSC. 31 déc 2020. doi:10.15283/ijsc20143

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. Science. 21 déc 2007;318(5858):1917-20. doi:10.1126/science.1151526

Yu SM, Liu JQ, Zhang LL, Ma YT, Yin FY, Liu S. Mmu_circ_0001148 promotes endothlial-mesenchymal transition via regulating miR-218-5p/JMY axis and drives progression of atherosclerosis. International Journal of Biological Macromolecules. mars 2025;293:139305. doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.139305

Yuan W, Zhang Q, Gu D, Lu C, Dixit D, Gimple RC, et al. Dual Role of CXCL8 in Maintaining the Mesenchymal State of Glioblastoma Stem Cells and M2-Like Tumor-Associated Macrophages. Clinical Cancer Research. 15 sept 2023;29(18):3779-92. doi:10.1158/1078-0432.CCR-22-3273

Zamani H, Saeb M, Monadi S, Alizade-Harakiyan M, Akhavan A, Khodaei A, et al. Comparative effectiveness of advanced radiotherapy techniques for brain cancers: A systematic review with an emphasis on dosimetric variability. Physica Medica. déc 2025;140:105682. doi:10.1016/j.ejmp.2025.105682

Zaoui K, Honoré S, Isnardon D, Braguer D, Badache A. Memo–RhoA–mDia1 signaling controls microtubules, the actin network, and adhesion site formation in migrating cells. The Journal of Cell Biology. 3 nov 2008;183(3):401-8. doi:10.1083/jcb.200805107

Zarei Ghobadi M, Emamzadeh R. Integration of gene co-expression analysis and multi-class SVM specifies the functional players involved in determining the fate of HTLV-1 infection toward the development of cancer (ATLL) or neurological disorder (HAM/TSP). Huang T, éditeur. PLoS ONE. 18 janv 2022;17(1):e0262739. doi:10.1371/journal.pone.0262739

Zhai GG, Malhotra R, Delaney M, Latham D, Nestler U, Zhang M, et al. Radiation Enhances the Invasive Potential of Primary Glioblastoma Cells via Activation of the Rho Signaling Pathway. J Neurooncol. févr 2006;76(3):227-37. doi:10.1007/s11060-005-6499-4

Zhang J, Jiao J. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. BioMed Research International. 2015;2015:1-14. doi:10.1155/2015/727542

Zhang M, Dong X, Wei Q, Ye Y, Zhou H. Hydrogel stiffness mediates the PI3K-AKT signaling of mouse bone marrow stromal cells through cellular traction force. Colloid and Interface Science Communications. sept 2024;62:100797. doi:10.1016/j.colcom.2024.100797

Zhang S, Wang X, Gao X, Chen X, Li L, Li G, et al. Radiopharmaceuticals and their applications in medicine. Sig Transduct Target Ther. 3 janv 2025;10(1):1. doi:10.1038/s41392-024-02041-6

Zhang W, Zhang W, Wu H, Han X. Harnessing innate immunity against glioblastoma microenvironment. Front Immunol. 25 juill 2025;16:1648601. doi:10.3389/fimmu.2025.1648601

Zhao C, Teng EM, Summers RG, Ming G li, Gage FH. Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus. J Neurosci. 4 janv 2006;26(1):3-11. doi:10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006

Zhao L, Qiu Z, Yang Z, Xu L, Pearce TM, Wu Q, et al. Lymphatic endothelial-like cells promote glioblastoma stem cell growth through cytokine-driven cholesterol metabolism. Nat Cancer. 3 janv 2024;5(1):147-66. doi:10.1038/s43018-023-00658-0

Zhao R, Choi BY, Lee MH, Bode AM, Dong Z. Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16 INK4a) in Cancer. EBioMedicine. juin 2016;8:30-9. doi:10.1016/j.ebiom.2016.04.017

Zhao X, Xu Z, Xiao L, Shi T, Xiao H, Wang Y, et al. Review on the Vascularization of Organoids and Organoids-on-a-Chip. Front Bioeng Biotechnol. 12 avr 2021;9:637048. doi:10.3389/fbioe.2021.637048

Zheng B, Han Y, Zhang H. Role of matrix metalloproteinases in the invasion of glioblastoma and drug interventions (Review). Int J Mol Med. 1 déc 2025;57(2):1-17. doi:10.3892/ijmm.2025.5704

Zhong J, Paul A, Kellie SJ, O'Neill GM. Mesenchymal Migration as a Therapeutic Target in Glioblastoma. Journal of Oncology. 2010;2010:1-17. doi:10.1155/2010/430142

Zhong Q, Xiao X, Qiu Y, Xu Z, Chen C, Chong B, et al. Protein posttranslational modifications in health and diseases: Functions, regulatory mechanisms, and therapeutic implications. MedComm. juin 2023;4(3):e261. doi:10.1002/mco2.261

Zhong W, Yan T, Lim R, Oberley LW. Expression of superoxide dismutases, catalase, and glutathione peroxidase in glioma cells. Free Radical Biology and Medicine. déc 1999;27(11-12):1334-45. doi:10.1016/S0891-5849(99)00181-1

Zhou C, Huang Y, Wu J, Wei Y, Chen X, Lin Z, et al. A narrative review of multiple mechanisms of progranulin in cancer: a potential target for anti-cancer therapy. Transl Cancer Res TCR. sept 2021;10(9):4207-16. doi:10.21037/tcr-20-2972

Zhou H, Wu W, Cao Y, Zhang B, Zhou M, Wang Y, et al. MMP14-Dependent Activation of TGF-β Signaling Enhances Malignancies via Promoting Necroptosis in Glioblastoma. The FASEB Journal. 31 déc 2025;39(24):e71343. doi:10.1096/fj.202501932R

Zhou W, Jing X, Hang R, Liu Z, Cao L, Li M. Base excision repair in human cancer: Emerging diagnostic and therapeutic target. DNA Repair. août 2025;152:103879. doi:10.1016/j.dnarep.2025.103879

Zhu F, Qiu J, Ye H, Su W, Wang R, Fu Y. The Prognostic Significance of Epidermal Growth Factor Receptor Amplification and Epidermal Growth Factor Receptor Variant III Mutation in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis with Implications for Targeted Therapy. IJMS. 9 avr 2025;26(8):3539. doi:10.3390/ijms26083539

Zhu Y, Guignard F, Zhao D, Liu L, Burns DK, Mason RP, et al. Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. Cancer Cell. août 2005;8(2):119-30. doi:10.1016/j.ccr.2005.07.004

Zientara-Rytter K, Subramani S. Role of actin in shaping autophagosomes. Autophagy. 1 déc 2016;12(12):2512-5. doi:10.1080/15548627.2016.1236877

Zohrabian VM, Forzani B, Chau Z, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. Rho/ROCK and MAPK signaling pathways are involved in glioblastoma cell migration and proliferation. Anticancer Res. janv 2009;29(1):119-23. PubMed PMID: 19331140.

Zuchero JB, Belin B, Mullins RD. Actin binding to WH2 domains regulates nuclear import of the multifunctional actin regulator JMY. Pollard TD, éditeur. MBoC. mars 2012;23(5):853-63. doi:10.1091/mbc.e11-12-0992

Zuchero JB, Coutts AS, Quinlan ME, Thangue NBL, Mullins RD. p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. Nat Cell Biol. avr 2009;11(4):451-9. doi:10.1038/ncb1852

Zuo W, Guo W, Yu H, Liu P, Zhang Q. Role of Junction-Mediating and Regulatory Protein in the Pathogenesis of Glucocorticoid-Induced Endothelial Cell Lesions. Orthopaedic Surgery. juin 2020;12(3):964-73. doi:10.1111/os.12680

Zurzolo C. Tunneling nanotubes: Reshaping connectivity. Current Opinion in Cell Biology. août 2021;71:139-47. doi:10.1016/j.ceb.2021.03.003

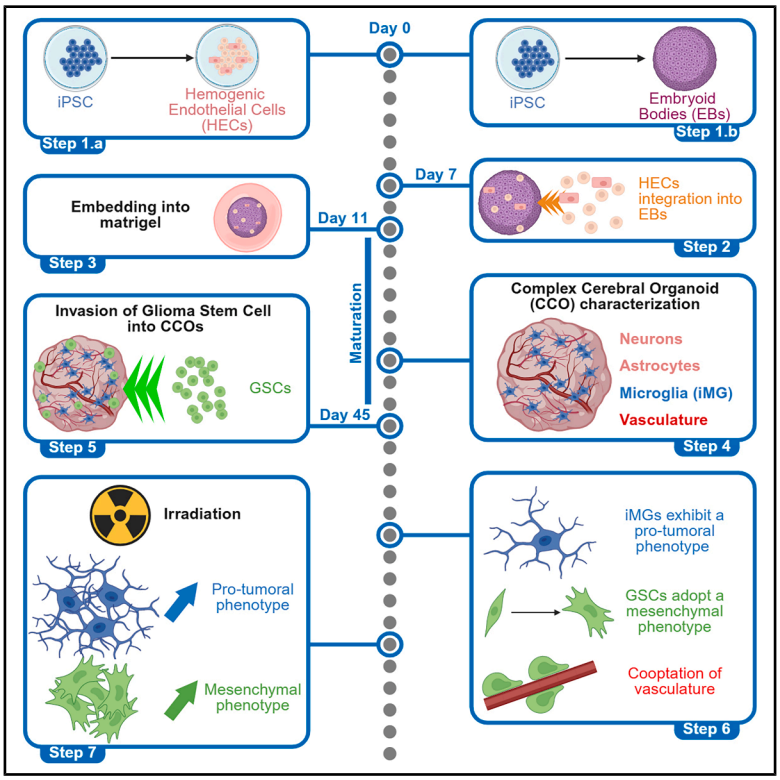
ANNEXE

Cell Reports
Methods

Article

Human cerebral organoids with microglia and vasculature model glioma stem cell interactions and radiotherapy response

Graphical abstract



Highlights

- Generation of vascularized cerebral organoids with functional microglia
- Organoids form perfusable vasculature with BBB features
- Invasion of glioma stem cells into cerebral organoids mimics the tumor microenvironment
- Model can potentially enable study of brain development, glioma biology, and therapy

Authors

Jérémy Raguin, Noa Legrand, Thierry Kortulewski, ..., Laurent R. Gauthier, François D. Boussin, Marc-André Mouthon

Correspondence

fdboussin@gmail.com (F.D.B.), marc-andre.mouthon@cea.fr (M.-A.M.)

In brief

Raguin et al. develop a method to generate vascularized, immunocompetent cerebral organoids by incorporating iPSC-derived hematoendothelial progenitors. These complex organoids form perfusable vascular-like networks with blood-brain barrier features and functional microglia. When co-cultured with glioma stem cells, they recapitulate key aspects of the glioblastoma niche.

Raguin et al., 2026, Cell Reports Methods 6, 101425
June 15, 2026 © 2026 The Authors. Published by Elsevier Inc.
https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2026.101425

CellPress

Cell Reports Methods

CellPress
OPEN ACCESS

Article

Human cerebral organoids with microglia and vasculature model glioma stem cell interactions and radiotherapy response

Jérémy Raguin,[1,2] Noa Legrand,[1,2] Thierry Kortulewski,[1,2] Oriane Bergiers,[1,2] Christine Granotier-Beckers,[1,2] Laure Chatrousse,[3] Alexandra Benchoua,[3] Laurent R. Gauthier,[1,2] François D. Boussin,[1,2,*] and Marc-André Mouthon[1,2,4,*]

[1]Université Paris Cité, Inserm, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, LRP/iRCM/IBFJ, 92265 Fontenay-aux-Roses, France
[2]Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, LRP/iRCM/IBFJ, 92265 Fontenay-aux-Roses, France
[3]IStem, CECS, AFM, Neuroplasticity and Therapeutics, 91100 Corbeil-Essonne, France
[4]Lead contact
*Correspondence: fdboussin@gmail.com (F.D.B.), marc-andre.mouthon@cea.fr (M.-A.M.)
https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2026.101425

MOTIVATION Understanding of glioblastoma resistance and recurrence is hindered by the lack of human models that faithfully recapitulate the tumor microenvironment. Vascular and immune components, particularly tumor-associated macrophages, play critical roles in tumor progression and therapy failure, yet most brain organoids lack these features. Developing vascularized and immunocompetent cerebral organoids is, therefore, essential to better model GBM biology and to identify more effective therapeutic strategies.

SUMMARY

Most human brain organoid models derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs) lack vascular and/or immune components, despite their critical roles in maintaining brain homeostasis and contributing to pathophysiological processes. We established a method for generating vascularized complex cerebral organoids (CCOs) containing microglial cells (brain-resident macrophages) by incorporating bipotent hematopoietic/endothelial progenitors derived from the same iPSC lines. This approach led to the formation of extensive vascular-like structures with blood-brain barrier characteristics, which were perfused upon transplantation into immunodeficient mice. Additionally, microglial cells exhibiting typical phenotypes also developed within the CCOs. By co-culturing CCOs with glioma stem cells, we demonstrated that this model recapitulates the tumor niche of glioblastoma, showing vascular co-option, reprogramming of microglia into tumor-associated macrophages, and recurrence after radiotherapy. In conclusion, our vascularized, immunocompetent CCO model provides a platform to study brain development, glioma pathogenesis, and therapies.

INTRODUCTION

Glioblastoma (GBM) is a brain tumor that is fatal despite aggressive treatment combining surgery, radiotherapy, and chemotherapy. Glioma stem cells (GSCs), a subpopulation of tumor cells with stem cell properties, are thought to play a major role in tumor relapse due to their resistance to treatment and invasive capacity.[1,2]

The innate immune and vascular systems within the tumor microenvironment also play a key role in GBM's resistance to treatment[3] and undergo significant alterations following radiotherapy.[4] Indeed, tumor-associated macrophages (TAMs) represent the majority of non-tumor cells in GBM, and their abundance correlates with disease severity, poor survival, and recurrence.[5,6] TAMs create immunosuppressive and pro-angiogenic conditions through the production of cytokines, promoting the proliferation and survival of GBM cells by synthesizing growth factors.[3] TAMs represent a heterogeneous population originating either from microglial cells (resident macrophages) or from circulating monocytes and/or bone marrow-derived cells.[7] The nature of TAMs depends, in part, on the genetic status of the tumor. In GBMs (isocitrate dehydrogenase (*IDH*) gene wild-type tumors), TAMs are predominantly derived from monocytes, whereas in *IDH*-mutated astrocytomas, they are more associated with microglial cells.[8] Vessel co-option and vascularization are among the strategies employed by some GBM cells to further invade the brain and regulate their proliferation and survival.[9] In the peri-necrotic regions of GBM, an abundance of

This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

destabilized microvessels polarizes macrophages toward a hypoxic state, which, in turn, increases vascular hyperpermeability, disrupting the efficacy of antitumor drugs.[10]

Altogether, these mechanisms contribute to the failure of various therapeutic approaches for GBM, but the exact roles of the GBM microenvironment in tumor development and relapse after treatments remain incompletely understood. Their elucidation requires study models that replicate its complexity in humans, which are currently not available.

The recent development of human brain organoids derived from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) allows for the modeling of brain biology and GBM pathophysiology.[11] Indeed, using 3D co-culture systems of human GSCs and brain organoids enables the identification of invasion signatures similar to those observed in surgical samples from GBM patients.[12,13] However, 3D co-culture models combining GBM cells and brain organoids have certain limitations, particularly the absence of vascularization and immune cells. On one hand, vascularized organoids have been obtained using various sources such as endothelial cells (ECs) and genetically modified iPSCs[14] or after their transplantation into mice.[15] On the other hand, microglia-containing cerebral organoids (COs) have been generated (reviewed by Zhang et al.[16]) with functional microglial cells[17] that closely resemble their *in vivo* counterparts.[18] Recently, COs containing both vascular systems and microglial cells have also been created by assembling vascular organoids and COs.[19]

Brain vasculogenesis, the *de novo* formation of blood vessels, begins during embryoid development with the emergence of hemogenic ECs (HECs) in the mammalian extraembryonic yolk sac.[20] Brain-resident macrophages, or microglia, also originate from this wave of HECs in the yolk sac and colonize the brain during early embryoid development.[21] The emergence of these HECs, which are of mesodermal origin, has been modeled using iPSCs.[22] Indeed, several research groups have developed strategies to derive HECs, inspired by human embryoid development.[23] HECs display a dual endothelial-hematopoietic phenotype characterized by the expression of VEGFR2/KDR/CD309 and the endothelial-specific junctional protein vascular endothelial cadherin (Cdh5/CD144).[24] HECs also have the capacity to differentiate into various mesodermal cell types, including pericytes.[24]

In this study, we developed a method to create vascularized COs containing microglial cells from iPSCs derived from healthy donors, with the aim of establishing an *in vitro* model for GBM. Our strategy was to recapitulate the stages of embryoid brain development, including the colonization of COs by HECs. By incorporating HECs during the early stages of CO formation, we generated complex cerebral organoids (CCOs) containing both vascular structures and microglia. Finally, the invasion of GSCs within these vascularized, immunocompetent COs served as a model to recapitulate the GBM tumor niche.

RESULTS

Integration of HECs favored CO maturation

We designed a stepwise protocol by separately inducing mesodermal differentiation into HECs and neuroectodermal differentiation from the same iPSC lines, then combining them to generate CCOs. We stimulated the differentiation of two iPSC lines (PDF01 and GM25256) into HECs by using a recently developed protocol with some modifications.[23] Hematopoietic-endothelial differentiation of iPSCs was confirmed by the expression of markers—determined through fluorescence-activated cell sorting (FACS) and quantitative reverse-transcription PCR (RT-qPCR) for CD309/KDR and CD144/Cdh5—and by FACS for CD31 and CD146—the mesenchymal cell/EC markers (Figure S1). RUNX1, a transcription factor involved in hematopoiesis, was also expressed at the mRNA level (Figure S1).

Meanwhile, embryoid bodies were formed from the same two iPSC lines to derive COs,[25] which were then co-cultured with HECs on seventh day in the presence of VEGFA, IL-34, and GM-CSF to support their differentiation into vascular and microglial cells.

Given the presence of lineage-directing growth factors and the incorporation of HECs into the COs, we examined whether neuroectodermal differentiation remained unaffected. CCOs were collected between days 49 and 113 after initiation and processed for immunostaining, either on thin slices or clarified thick slices, followed by 3D confocal microscopy. The CCOs contained neural rosettes composed of SOX2-positive neural progenitors and SOX9-positive gliogenic progenitors (Figures S2A and S2B). However, neural rosettes appeared sparsely distributed, suggesting the progressive differentiation of neural progenitors. Neural precursors expressing doublecortin (DCX) were abundant and widely distributed within the CCOs (Figure S2C). Differentiation into neurons was confirmed by the presence of MAP-2 and β3-tubulin immunostaining, which were widely present throughout the CCOs derived from both iPSC lines (Figures S2D, S2E, and S2E′). The presence of numerous astrocytes was confirmed by S100β/GFAP double-positive cells (Figures S3A, S3B, and S3B′). Notably, numerous astrocytes were observed in CCOs at 81 days *in vitro* (DIV), a time point when they were still absent from classical organoids, which showed only sparse astrocytes even at 126 DIV (Figures S3C and S3D).

Altogether, these findings indicated that the incorporation of HECs did not hinder neuronal differentiation, and even appeared to accelerate astrocyte emergence, suggesting that it promoted CO maturation.

Pseudo brain vascularization in CCOs

Fifty days after initiation, numerous tubule-like structures positive for CD31, a specific EC marker, had extensively developed within the CCOs derived from both iPSC lines (Figures 1A and 1B). These vascular structures occupied a significant portion of the organoids, including the inner region (Figures S4A and S4A′), but excluding the nucleus-dense areas, which were mainly composed of β3-positive neurons (Figures S4B and S4B′). These vascular-like networks were intermingled with neuronal terminals (Figure S4B). They were observed in CCOs initiated from both iPSC lines tested and remained prominent at later time points (up to 126 days). Additionally, immunostaining for collagen IV was detected adjacent to CD31, resembling the basal lamina of blood vessels (Figures 1C and 1C′). To confirm that the basal lamina was synthesized in association with the vascular structures,

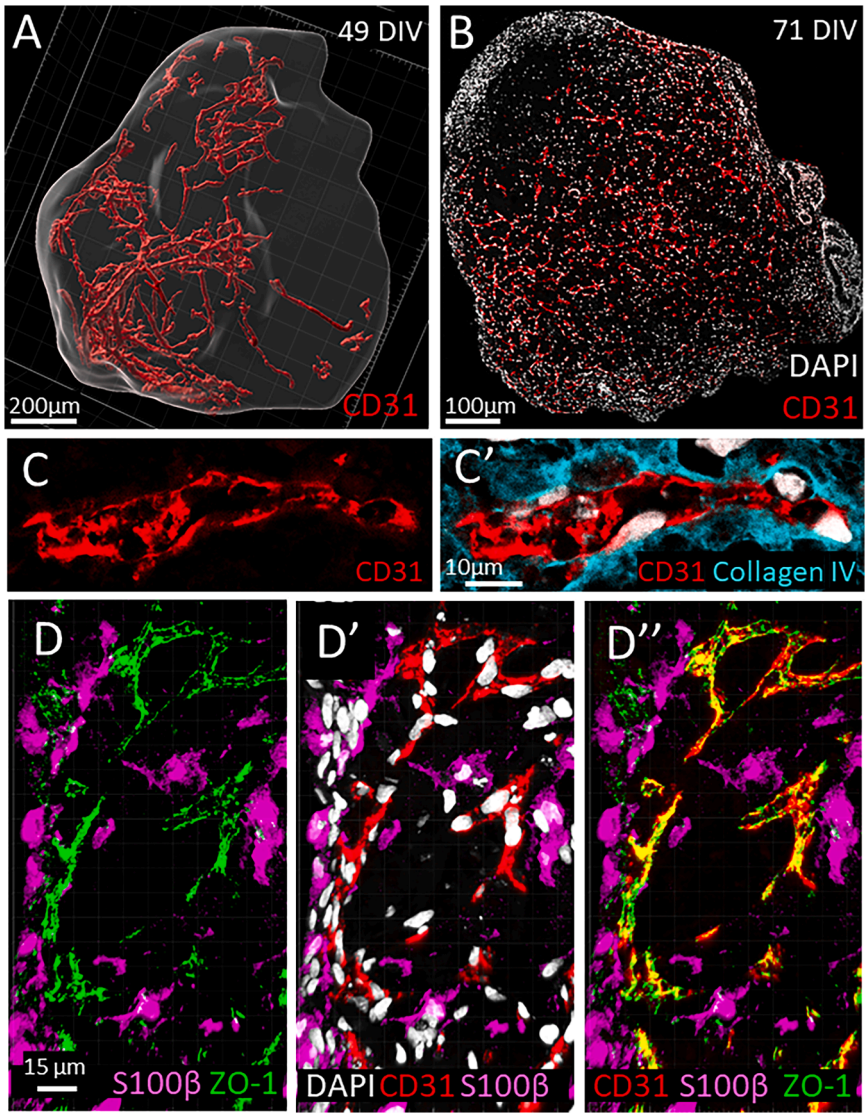


Figure 1. Vascular-like structures developed in CCOs

(A–D) Immunostaining for CD31 performed on 500 μm sections (A) and 5 μm thin sections (B–D). 3D modeling of CD31 is shown in (A). Enlarged views of the organoids derived from the PDF01 line (A) and GM25256 line (B) are shown. (C) and (C′) show enlarged views of (B), together with CD31 and collagen IV immunostaining. Multiplex immunostaining for endothelial cells (CD31), astrocytes (S100β), and BBB-specific tight junction (ZO-1) was performed at DIV71 and taken at 63×. (D)–(D″) show that CD31-positive vascular-like structures are in close contact with S100β cells and exhibit ZO-1 tight junctions. CCOs were derived from PDF01 (A) and GM25256 (B–D) iPSC lines.

rather than being solely derived from the Matrigel, we performed immunostaining using a human-specific antibody against laminin α5. Indeed, laminin α5 signal was closely apposed to collagen IV, outlining vascular-like structures, whereas it was absent in conventional COs (Figures S5A and S5B). To determine whether these vessel-like structures mimic the blood-brain barrier (BBB), we performed multiplex immunohistological analyses on thin CCO slices. ZO-1, a marker of tight junctions in brain vessels, was found to be expressed on CD31$^+$ ECs in the CCOs (Figure 1D). In addition, the detection of S100β$^+$ cells adjacent to vascular structures was consistent with the presence of astrocytes, a component of the BBB (Figure 1D).

To further examine the potential functionality of these vessel-like structures, CCOs were transplanted into immunodeficient NOD-SCID mice. One month post-transplantation, dextran-FITC was infused intracardially into the mice's vascular system, enabling visualization of vessel-like structures within the CCOs (Figures 2A and 2B). Notably, these dextran-FITC-perfused vessel-like structures in CCOs were also immunostained with a specific anti-human CD31 antibody (Figures 2B–2D), in contrast to FITC-perfused murine vessels adjacent to CCOs (Figure 2B). Figures 7D and 7D′ further show the anastomosis between mouse and human CCO-derived vessels. Moreover, human CD31$^+$ cells had typical elongated nuclei and were covered by PDGFRβ-positive pericytes (Figures 2E and E″).

Overall, our data show that vascular-like structures in CCOs contain components of the neurovascular unit and exhibit BBB-like features.

Microglia-like cells developed in CCOs

Next, we analyzed whether the early incorporation of HECs into embryoid bodies effectively led to the generation of microglial cells in the CCOs. Fifty days after initiation, numerous Iba1-positive cells, a pan-macrophage/microglia marker, were widely observed, extensively infiltrating the CCOs derived from both iPSC lines (Figures 3A and 4). Virtually, all Iba1-positive cells were also positive for P2RY12, a specific microglial marker (Figure 3B–B″). Additionally, while Iba1$^+$ cells exhibited an immature morphology at the early time points (56 DIV), they developed more mature microglial features at later stages (126 DIV), characterized by increased process length and morphological complexity (Figure 4B″).

Microglial cells play crucial roles in synaptic pruning and promoting brain maturation. To demonstrate that Iba1$^+$ cells have this function in CCOs, we examined their ability to engulf synapses by double staining for postsynaptic density protein 95 (PSD95) and Iba1. Remarkably, Iba1$^+$ cells exhibited numerous PSD95 puncta distributed throughout their cytoplasm, indicating synaptic engulfment (Figure 3C).

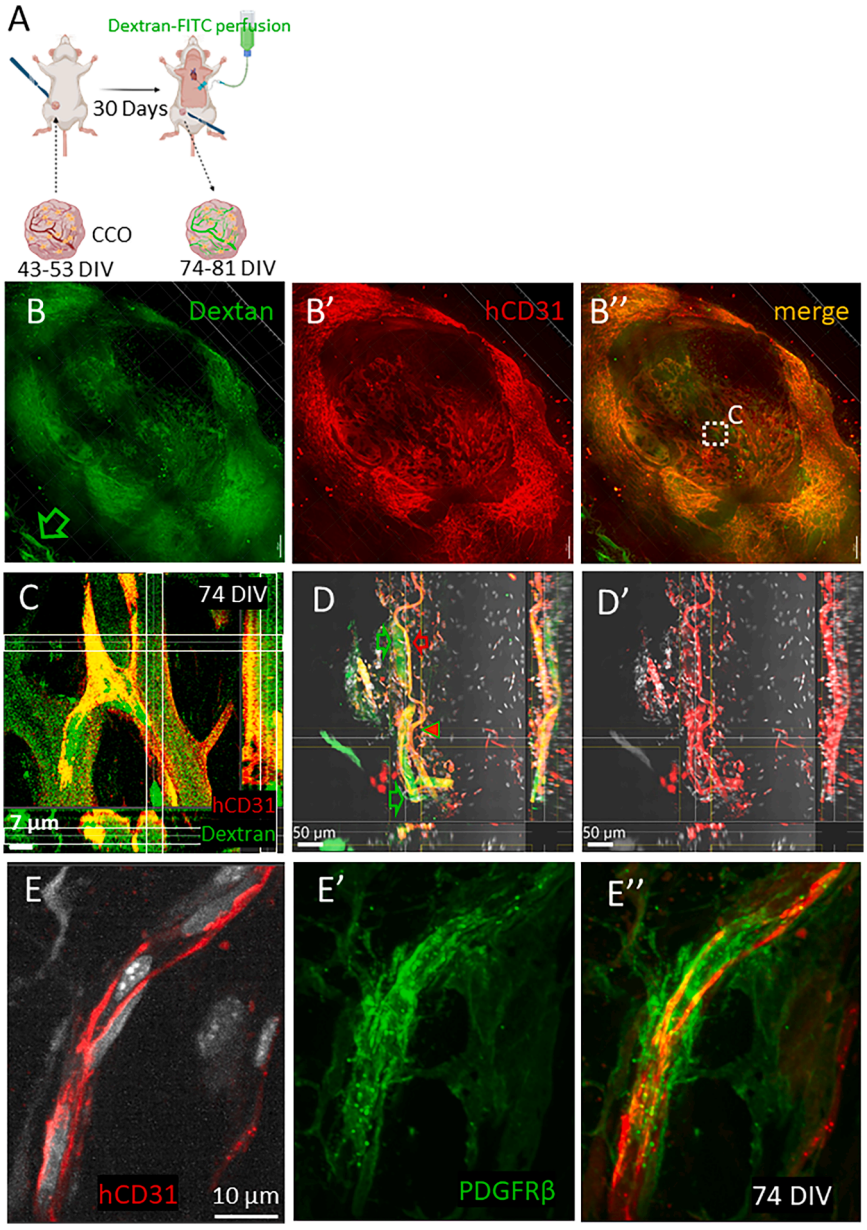


Figure 2. Vascular-like structures in CCOs are perfused after xenotransplantation and are covered by pericytes

(A) CCOs were xenotransplanted subcutaneously into the mouse limb. One month after transplantation, intracardiac perfusion with FITC-dextran was performed to label perfused blood vessels.

(B) FITC-dextran-positive vessels were observed on 500-µm thick sections both within the CCO and in adjacent mouse vessels (green arrow). The specificity of the human anti-CD31 immunostaining was confirmed by the absence of signal in murine adjacent vessels. (B′) Human CD31 immunostaining on 500-µm thick CCO sections.

(C) A magnified 3D reconstruction of CD31 immunostaining reveals a vessel lumen perfused with FITC-dextran within the CCO.

(D and D′) Mouse vessels are visualized by FITC-dextran (green arrows), while human CCO vessels are marked by CD31 (red arrow). A vascular anastomosis between host and graft vessels is visible (bicolored arrowhead).

(E–E″) Vascular structures are covered by PDGFRβ-positive pericytes. CCOs were derived from GM25256 iPSCs. Xenotransplantations were performed in six mice across two independent experiments.

Quantification of vascular and microglial cells in CCOs

To quantify vascular- and microglia-like populations, we performed flow cytometry on single-cell suspensions generated by the enzymatic dissociation of CCOs. ECs, identified by CD31 expression, were detected in CCOs but not in conventional COs. The frequency of $CD31^+$ ECs in CCOs did not differ between the iPSC lines (Figure 5A). Microglial cells express the hematopoietic marker CD45, and significant levels of $CD45^+$ cells were found in CCOs while very few, if any, $CD45^+$ cells were detected in conventional COs (Figures S6D and S6E). In addition, $CD45^+$ cells were positive for the myeloid marker CD11b and the specific markers of resident microglia, i.e., P2RY12 and CX3CR1 (Figures 5B and S6D′–D″). Interestingly, the great majority of $CD45^+$ cells in CCOs were $P2RY12^+CD11b^+$ microglial-like cells without any difference according to iPSC lines (Figures 5C and 5C′). The maximum number of $CD45^+CD11b^+$ $P2RY12^+$ cells, i.e., microglia, was observed around ten weeks after initiation of CCOs (Figure 5C). Although RT-qPCR analyses showed endogenous expression of VEGFA, IL-34, and CX3CL1—growth factors involved in endothelial and microglial development/homeostasis (Figure S7A)—the withdrawal of exogenous VEGF, GM-CSF, and IL-34 after day 30 led to a marked reduction in $CD31^+$ ECs and $CD45^+$ $CD11b^+$ $P2RY12^+$ microglia-like cells (Figures 5A and 5C′).

We further confirmed the expression of macrophage/microglial genes in sorted $CD45^+$ cells. The hematopoietic transcription factors SPI1 and RUNX1 were highly expressed in $CD45^+$ cells compared with parental iPSCs and differentiated HECs (Figure S7B). Additionally, CSF1R and AIF1 were also enriched in $CD45^+$ cells (Figure S7B). Other markers, including P2RY12, TMEM119, PLIN2, and CX3CR1, showed high enrichment in $CD45^+$ cells compared with iPSCs and differentiated HECs (Figure S7B). Therefore, these $CD45^+$/$Iba1^+$ cells are referred to as induced microglia (iMG) hereafter.

Overall, our data demonstrated that both iPSC lines generated CCOs containing functional iMG and BBB-like vascular structures.

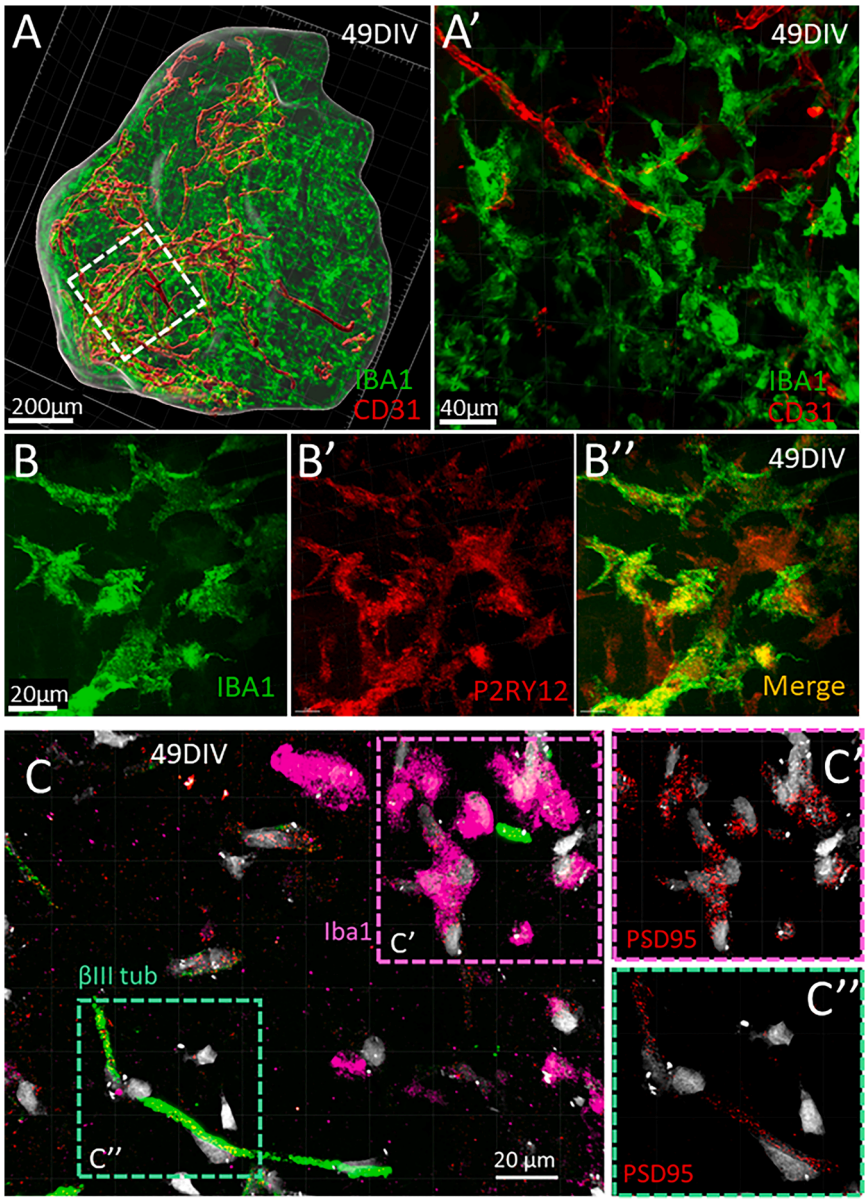


Figure 3. Microglial-like cells developed in CCOs and internalized the post-synaptic protein PSD95

(A and B) Representative immunostaining images for CD31 and IBA1 on 500 μm section of the CCO. Enlarged view is shown in A′. (B–B″) Almost all Iba1-positive cells co-expressed the microglial marker P2RY12.

(C–C″) PSD95 immunostaining on a 5-μm thick section observed in βIII-tubulin$^+$ neurons (C″), and Iba1-expressing cells showed internalization of the neuronal PSD95. The outline of Iba1$^+$ cell is shown in C'.

CCOs were derived from the PDF01 iPSC line (A and B) and GM25256 iPSC line (C).

Co-culture of GSCs with CCOs recreated heterogeneity of tumor microenvironment

We next investigated whether our organoid model could efficiently recapitulate the GBM tumor niche. GBM tumor niches consist of tumor cells, including GSCs, non-neoplastic cells such as neural and vascular cells, and TAMs. To this end, we performed 3D co-cultures of CCOs with the GSC lines derived from adult patients with wild-type *IDH* GBM (TG16) or *IDH*-mutated grade IV astrocytoma (TG20) (Figure S8). Both GSC lines exhibited high expression of the stem cell marker SOX2, as revealed by FACS, with TG16 showing elevated levels of CD44 (Figure S8B), consistent with its mesenchymal phenotype.[26] Additionally, RT-qPCR showed that TG16 GSCs expressed higher levels of chemokines, cytokines, and immune checkpoints than TG20 GSCs (Figures S8B and S8C). Following xenotransplantation into nude mice, both GSC lines generated tumors and induced host death, which occurred earlier with TG16 GSCs than with TG20 GSCs (Figures S8D and S8E). *In situ* analyses further revealed that GSC-derived tumors displayed vascular abnormalities and extensive infiltration of Iba1$^+$ macrophages/microglial cells (Figures S8F and S8G). FACS analyses of dissected striatum showed a higher abundance of CD45^{++}CD11b$^+$ cells, corresponding to monocyte-derived TAMs, in tumor-bearing brains than in controls (Figures S8H and S8H′). The abundance of CD206$^+$ macrophages, which are associated with an immunosuppressive phenotype, was also higher in tumor-bearing mice (Figure S8H″). Additionally, sorted CD45$^+$ cells, encompassing both macrophages and microglia, exhibited elevated expression of key genes (*MSR1*, *SPP1*, and *TGF-β1*), indicating their transition to an immunosuppressive TAM phenotype (Figure S8I) consistently with the expression of cytokines and immunomodulators by GSCs (Figure S8C).

GSCs were co-cultured with CCOs (45–60 DIV) for two days under orbital shaking to enrich for cells with active adhesion, after which the CCOs were separated from the non-adherent GSCs. Two weeks after co-culture, both TG16 and TG20 GSCs formed focal clones that were dispersed within the CCOs but were largely excluded from the densely packed neural rosettes (Figures 6A and 6B). To estimate the GSC percentage, organoids were dissociated after 28 days of co-culture and analyzed by FACS (Figure 6C). Despite the heterogeneity in GSC engraftment within each group, there was a trend toward higher EGFP-TG16 levels in CCOs compared with those in COs for both iPSC lines ($p = 0.036$ and $p = 0.10$ for GM25256 and PDF01, respectively; Mann-Whitney test), but no difference in GSC content in CCOs was observed between the iPSC lines. Resident microglial cells, which form part of the TAM population,

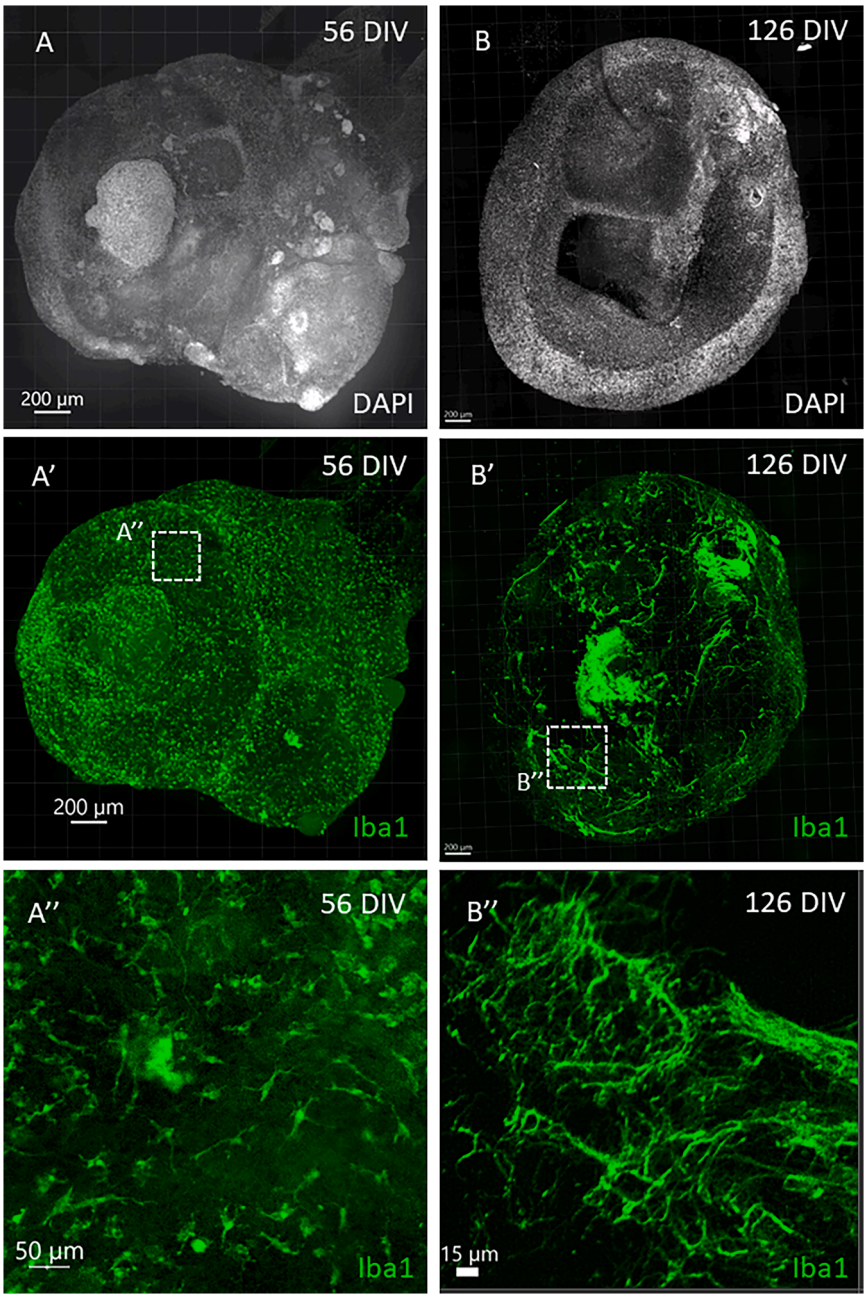


Figure 4. Iba1$^+$ cells exhibited increasingly elongated processes and greater morphological complexity over time

(A and B) Iba1 immunostaining on 400-μm thick CCO section at 56 DIV (A–A″) and 126 DIV (B–B″). CCOs were derived from the GM25256 iPSC line. A magnified view of Iba1 immunostaining is shown in (A″) and (B″).

along with vascular cells, play a critical role in GBM development and treatment resistance.[3] Because iMG were widely present throughout the CCOs, they also located in close proximity to GSCs in the CCO co-cultures (Figures 6D and 6E). Additionally, both TG16 and TG20 GSCs were frequently observed in close association with ECs, with TG20 GSCs exhibiting signs of vessel co-option (Figure 6F).

Dissociation of the co-cultures enabled us to further quantify the effects of GSCs on ECs and iMG by FACS. The percentages of CD31$^+$ ECs were not significantly altered by the presence of GSCs compared with CCO alone (Figure S9). However, in the TG16 GSC line, the expression of CD49d on CD31$^+$ ECs was increased (Figure S9), consistent with observations in the GBM tumor core.[27] The percentage of iMG was increased after co-culture with TG16 for both iPSC lines (Figure S9). Moreover, iMG displayed an immunosuppressive phenotype characterized by increased CD163 and CD206 expression in FACS analyses and upregulated MSR1 mRNA levels in sorted iMG (Figure S9). These phenotypic changes were further associated with the increased expression of SPP1, a TAM marker (Figure S9). Despite variability, iMG phenotypic alterations were observed in co-culture with GM25256-derived CCOs (Figure S9).

In summary, these results showed that co-cultures of GSCs with CCOs recapitulate several key features of the GBM tumor niche.

The complexity of CCOs promoted the GBM-derived line aggressiveness after irradiation

Standard radiotherapy for GBM typically involves a total dose of 60 Gy, delivered in 2 Gy fractions. However, glioma cells at the margin of the irradiation field may receive lower doses. Additionally, invasiveness of glioma cells could be increased by irradiation,[28] allowing them to escape the irradiation field. Thus, it is essential to consider the effects of lower doses, particularly the 2 Gy fractional dose, which may play a critical role in residual tumor progression. After two weeks of CCO-GSC co-culture, the co-cultures were exposed to a single 2 Gy dose of irradiation, and effects were analyzed two weeks later. Unirradiated TG16 cells exhibited a rounded morphology and formed clonal aggregates, whereas irradiated TG16 cells adopted a mesenchymal-like morphology and appeared more dispersed (Figure S10). We further quantified cell numbers by flow cytometry on dissociated co-cultures. Two weeks after 2 Gy exposure, total TG16 (GBM-derived GSC) counts showed a modest increase in GM25256-derived CCO co-cultures and a slight decrease in PDF01-derived CCO co-cultures (Figure S11). In contrast, TG20 GSCs exhibited a relative decrease after irradiation with CCOs from both iPSC lines

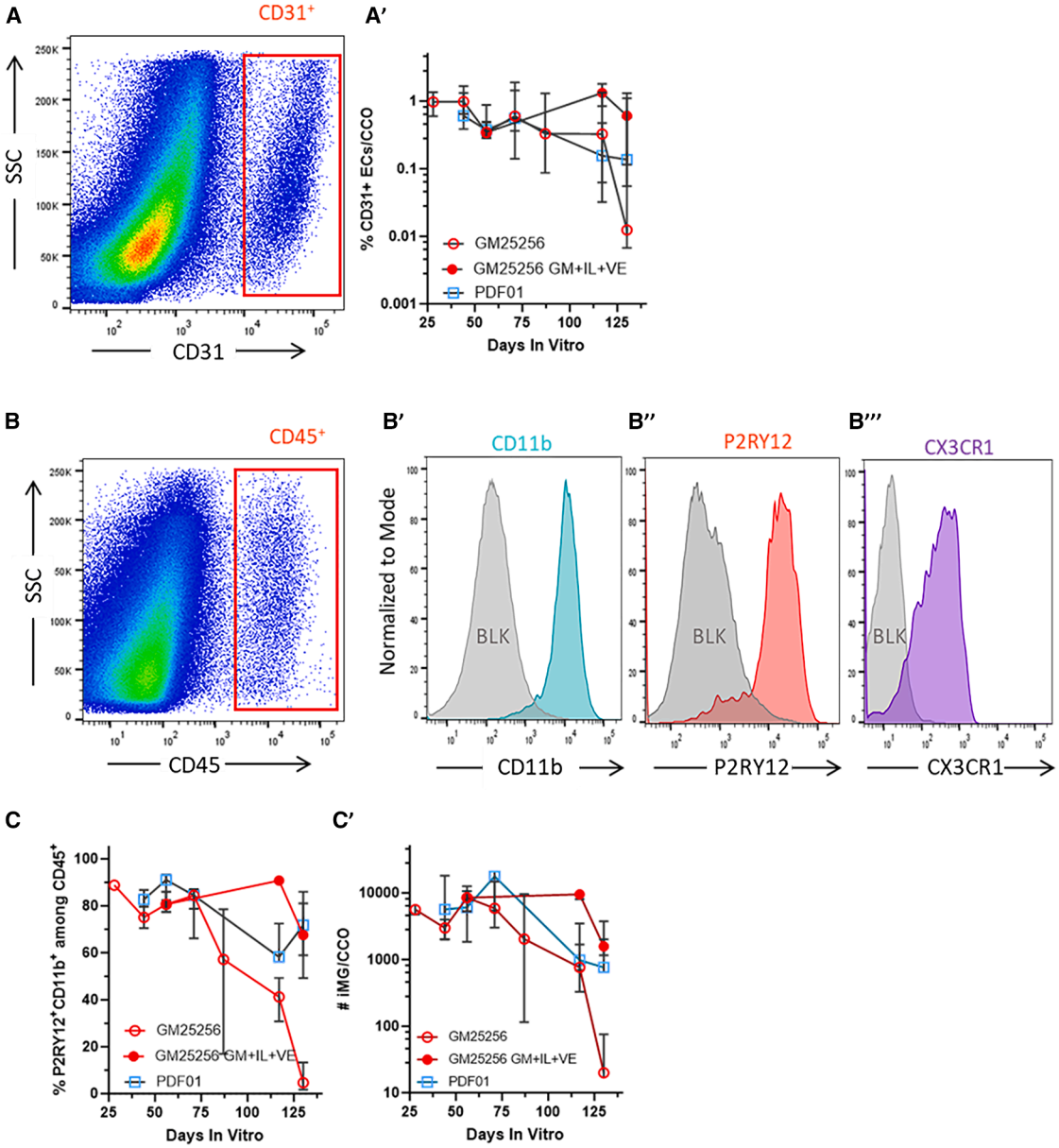


Figure 5. Flow cytometry-based quantification of key cellular populations in CCOs as a function of time and the iPSC line

(A) Endothelial cells were defined as CD31$^+$ cells, and quantification with iPSC lines are shown (A′).

(B) Microglial-like cells were contained in the CD45$^+$ population expressing CD11b (B′), P2RY12 (B″), and CX3CR1 (B‴).

(C) For both iPSC lines, the great majority of CD45$^+$ co-expressed CD11b and P2RY12, but this proportion dropped at a later time point when exogenous factors were removed. (C′) The number of CD45$^+$CD11b$^+$P2RY12$^+$ cells (iMGs) was maintained over time in the presence of GM-CSF, IL-34, and VEGF (GM + IL + VE), but decreased at later time points in CCOs derived from both iPSC lines when exogenous factors were withdrawn. CCOs were derived from PDF01 and GM25256 iPSC lines. Data are presented as median with interquartile range; each data point represents 2–16 individual CCOs.

(Figure S11D). However, relatively large variability in GSC engraftment, as reflected by EGFP cell recovery within each group, may have attenuated these effects. Therefore, to more robustly evaluate the effects of 2 Gy irradiation on GSC growth, we monitored bioluminescence of luciferase, encoded by the same vector as EGFP, in GSCs (Figure S11C). We measured the bioluminescence of TG16 and TG20 GSCs in CCOs on days 16 and 23 after co-culture, corresponding to days 2–9 post-irradiation, and compared it with those of conventional COs. The bioluminescence signal for TG16 and TG20 GSCs increased similarly in CCOs and conventional COs, indicating that GSCs developed comparably in each environment (TG16: Figure 7B and TG20: Figure S11D). However, irradiation favored TG16-GSC proliferation in CCOs, while it had no effect on TG16 in co-culture with conventional COs (Figures 7B and 7B′). In contrast, irradiation tended to reduce TG20 growth in either conventional COs or CCOs (Figure S11D).

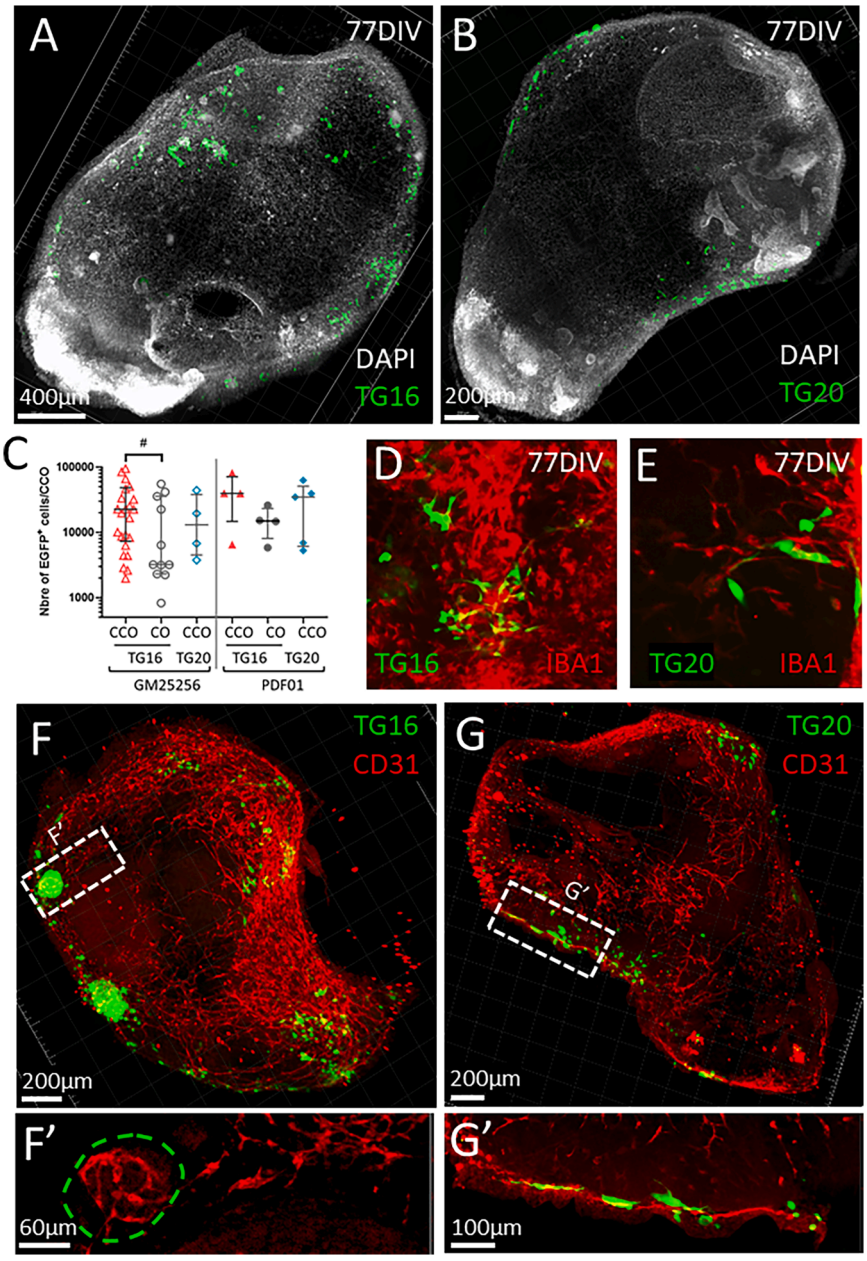


Figure 6. Co-cultures of GSC-derived lines with CCOs mimicked the tumor microenvironment

(A and B) TG16-GSCs and (B) TG20-GSCs were co-cultured with CCO for 4 weeks and were immunodetected for EGFP on 500 µm sections.

(C) Quantification by FACS of EGFP-GSCs after 28 days of co-culture with CO/CCO.

(D and E) GSCs were observed at the proximity of Iba1^{+} cells.

(F and G) GSCs were in close contact to vascular-like CD31^{+} structures (enlarged views in F′ and G′). TG20 cells appeared to co-opt existing vascular structures.

CCOs were derived from the PDF01 iPSC line (A, B, and D–G) and GM25256 iPSC line (C). Data are presented as median with interquartile range; each dot represents an individual CCO/CO. Comparisons across all groups were performed using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc multiple-comparisons test; no significant differences were detected. CCOs and COs were compared pairwise using the Mann-Whitney test (#, $p < 0.05$).

We then sorted TG16 GSCs to analyze the expression of a set of genes associated with GBM development and aggressiveness, known as the natural evolution signature (NES).[29] While CD44 mRNA levels were minimally impacted by irradiation, a specific set of genes (*SPP1*, *POSTN*, *FOSL2*, *ANXA1*, and *CXCL12*) were upregulated in TG16 cells co-cultured with CCOs following irradiation (Figure 7C). In contrast, with the exception of *SPP1*, the expression of these genes remained largely unchanged in TG16 tumors derived from conventional COs (Figure 7C). This gene alteration aligned with the observed radiation-induced proliferation of TG16 GSCs and their mesenchymal phenotype.

We then analyzed the effects of irradiation on iMG/TAMs, using FACS. While the proportion of iMG remained unchanged in CCOs (Figure S12), the expression of HLA-DR, CD11b, CD163, and CD206 on iMG increased following irradiation, indicating their alternative activation toward an immunosuppressive TAM phenotype (Figure S12). This radiation-induced response was consistently observed in co-cultures with GBM-derived GSCs (TG16) across both iPSC lines, while co-cultures with astrocytoma-derived GSCs (TG20) exhibited only a limited effect (Figure S12).

DISCUSSION

To generate CCOs that contained both vascular structures and microglia-like cells, we replicated the stages of embryoid brain development, focusing on the colonization of COs by ECs and primitive macrophages. We, thus, incorporated bipotent hemato/ECs during the early stages of CO formation. We validated these vascularized, immunocompetent COs to model the GBM tumor niches and assess resistance to radiotherapy.

Given the critical role of vascularization in tissue physiopathology, recent efforts have focused on vascularizing COs. Brain vasculature is formed by a combination of ECs, astrocytes, pericytes, and neurons, creating the BBB, an impermeable structure.[30] Most BBB cell types, such as astrocytes, pericytes, and neurons, are derived from the neuroepithelium and can arise spontaneously within COs. However, conventional COs lack the ability to generate vascular ECs, as these cells originate from the mesoderm.

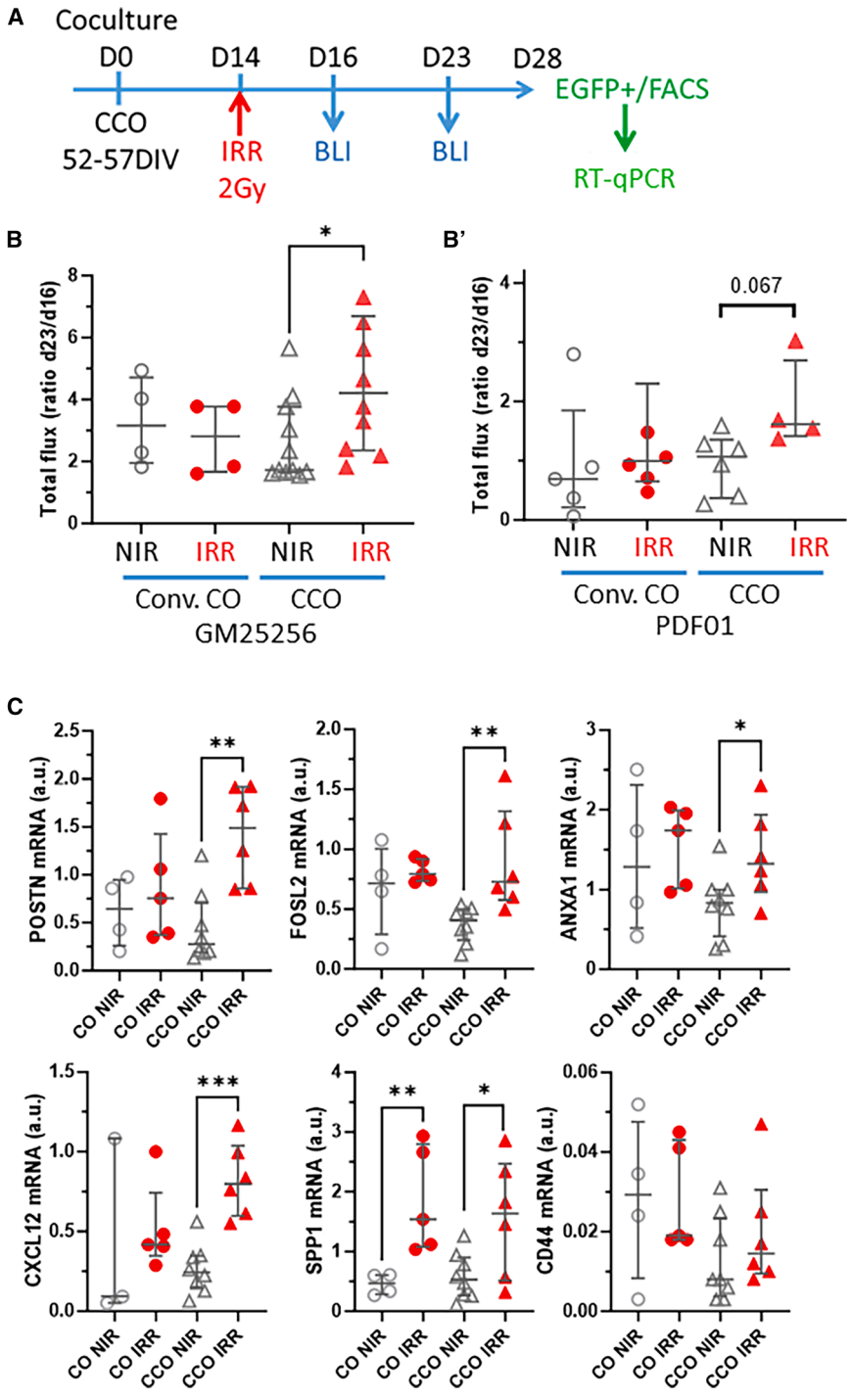


Figure 7. The complexity of the CCO niche promoted the TG16 GBM-derived line aggressiveness after irradiation

(A and B) TG16-GSCs were co-cultured with CCOs for 14 days then were irradiated (IRR), or not (NIR). The amount of GSCs was determined by luciferase bioluminescence (photons/sec) 2 and 9 days later (D16 and D23). Then, the co-cultures were dissociated, and EGFP-GSCs were sorted by FACS. Longitudinal analyses of bioluminescence for GSCs co-cultured with conventional CO (Conv. CO) or complex CCO derived from the GM25256 iPSC line (B) and PDF01 iPSC line (B′). (C) EGFP-GSCs were sorted, and the expression of a set of NES genes was determined by RT-qPCR (a.u., arbitrary unit). CCOs were derived from PDF01 and GM25256 iPSC lines. Data are presented as median with interquartile range; each dot represents an individual CCO/CO. Comparisons across all groups were performed using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc multiple-comparisons test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.005$).

In this study, we added iPSC-derived HECs along with exogenous VEGF and BMP4 to initiate EC differentiation. We anticipated that neural progenitor cells within the organoids would produce signals necessary for inducing vascular network formation.[31] Indeed, we observed vascular-like structures, identified by the EC marker CD31, surrounded by basal lamina (collagen IV) and pericyte coverage (PDGFRβ). Additionally, the presence of ZO-1, a key component of the tight junctions associated with BBB, was confirmed.

Recent studies have also modeled vascularized brain organoids with BBB features by fusing vascular organoids and COs *in vitro*.[19,32] However, these vascular structures initially lacked a lumen, leading to apoptosis in the absence of blood flow. Consistent with previous findings,[14] once our CCOs were transplanted into immunodeficient mice, the vascular structures became perfused with blood, confirming their functionality. We believe that the presence of vascular structures will further enable the integration of CCOs into microfluidic chips for advanced research applications.[33] In a previous study, iPSCs expressing ETV2 contributed to the formation of a complex vascular network within CCOs and enhanced the functional maturation of the organoids.[14] In our model, the inclusion of HECs enabled the generation of a substantial number of neurons within the CCOs. Neural rosettes, i.e., neural progenitor-rich regions, were less abundant in our CCOs compared with previously reported conventional COs, likely reflecting a more advanced maturation state associated with the integration of HECs. Moreover, we observed significant numbers of astrocytes (S100β/GFAP) as early as days 60–80, but astrocyte abundance is typically reported to increase after 90–100 days.[34,35] This suggests that the combination of vascularization and microglia supports the maturation of COs.

Microglial cells play a critical role in regulating neuronal wiring, angiogenesis, and immune responses in the brain, originating from extraembryonic erythroid-myeloid progenitors.[36] Various techniques have been used to generate COs containing microglial cells.[16] In this study, by incorporating HECs into COs derived from the same iPSC lines, we successfully produced COs with iMG. Given their expression of CD309 and CD144, iPSC-derived HECs are closely related to erythroid-myeloid progenitors, from which microglia originate.[23] Although CCOs appeared to intrinsically produce IL-34 and CX3CL1/Fractalkine, both of which are involved in microglia homeostasis, the organoid medium was supplemented with GM-CSF and IL-34 to support the long-term maintenance of iMG.

The brain environment significantly influences the expression profile of microglial cells, distinguishing them from macrophages.[37] In our CCO model, iMG cells expressed key surface markers such as CX3CR1, P2RY12, and TMEM119 and displayed specific gene expression patterns consistent with previous studies.[17,18] Notably, in our FACS experiments, iMG cells represented 0.50% (0.16–1.42) of the total cell population within CCOs, aligning with the levels of microglia observed in the adult human brain, which range from 0.5% to 16.6%, depending on the brain region.[38] The iMG cells in our CCOs exhibited a ramified morphology that transitioned from a rudimentary, initial state, to a more complex structure over the culture period. We demonstrated that these microglia-like cells exhibited characteristics of natural microglia, including the ability to engulf neuronal synapses (PSD95 expression), in agreement with previous findings.[16,17,19]

Recently, Sun et al. reported a model integrating both ECs and microglia simultaneously.[19] In contrast to their approach, which involved generating vascular organoids, we adopted a different strategy by dissociating HEC colonies. Overall, our results corroborate their findings regarding the integration of ECs and microglia in CCOs. Nevertheless, using dissociated HECs instead of vascular organoids may offer specific technical advantages, such as facilitating the manipulation of specific cell populations (treatment, electroporation).

After validating our CCO model, we used it to explore the tumor microenvironment (TME) of GBM by co-culturing CCOs with GSC lines. The tumor microenvironment includes various classes of non-neoplastic tissue-resident and infiltrating cells.[3] The non-neoplastic brain environment promotes electrochemical coupling between tumors and neurons, as well as metabolic interactions with astrocytes, which drive tumor growth.[3] Neurogenic niches have been proposed as a favorable environment for glioma cells,[39] although the proximity of glioma cells to these niches may also reflect their stem cell origin.[40] In our observations, we did not find any preferential location or development of GSCs near the neurogenic niches of CCOs, particularly neural rosettes. Instead, we observed that in co-cultures with CCOs, GSCs were frequently surrounded by numerous iMG cells ($Iba1^{+}$).

TAMs represent the largest population of non-cancerous cells in the GBM tumor microenvironment, comprising up to 30%–50% of the tumor mass.[5] This population includes a mix of resident microglia and macrophages derived from infiltrating monocytes.[7] While the infiltration of blood-derived TAMs can be inhibited using CSF1R inhibitors or chemokine receptor antagonists,[41] resident microglia persist in the brain and can acquire TAM-like features. GBM cells can hijack microglial gene expression to support tumor growth,[42] causing TAMs to adopt immunosuppressive properties.[43] Interactions between cancer cells and immune cells are known to drive transition to mesenchymal-like states in GBM.[44]

Our model allows for the specific investigation of how GSCs influence microglial cells. Indeed, we demonstrated that co-culturing CCOs with GSCs alters the phenotype of iMG, particularly inducing them to adopt an immunosuppressive state, as evidenced by the increased expression of markers such as CD163, CD206, MSR1, and the TAM-associated gene *SPP1*. The higher expression levels of factors that influence TAMs in the TG16 line, such as CSF1,[41] CCL2, and POSTN,[45] likely explain the more pronounced alterations in iMG in the presence of TG16 compared to TG20.

Additionally, GBM cells were often found in close proximity to vascular structures, suggesting vessel co-option in TG20 cells.[46] Moreover, ECs in the co-cultures showed elevated CD49d expression, a feature that has been previously reported in the tumor core.[27] These effects of GSCs on iMG and EC phenotypes showed variability, likely reflecting the fact that some iMG or ECs were not in close proximity to glioma cells, as the latter were not widely distributed throughout the CCOs. Therefore, further studies, such as those employing spatial transcriptomic, are warranted.

Radiotherapy is administered to nearly all GBM patients, yet it may enhance the invasiveness of GSCs,[28] which are highly resistant to radiation.[1] GSCs can infiltrate brain parenchyma and persist after surgical resection and radiotherapy.[47] Those located at the tumor margin are often exposed to lower doses of radiation compared with the central tumor mass. We demonstrated that GSCs proliferate in co-cultures with conventional COs, and radiation exposure does not hinder their growth, consistent with previous studies using even higher doses of radiation.[13] Remarkably, we observed that irradiation of co-cultures with CCOs actually promoted GSC proliferation. Although we cannot definitively pinpoint the specific cell population(s) responsible for this radiation-induced effect on GSCs, the enhanced recovery of GSCs was evident only in immunocompetent vascularized CCOs, not in conventional COs, suggesting a possible role for TAMs and/or vascular cells, an assumption that requires further confirmation. This observation is reminiscent of the recurrences seen within 1–2 cm of the primary tumor border in GBM patients.[48] Similarly, in experimental GBM models of mice, initial depletion of tumor cells post-irradiation was often followed by significant recurrence, which is correlated with tumor microenvironment reorganization, particularly involving TAMs.[6,49] Interactions between cancer and immune cells drive transition to mesenchymal-like states in GBM.[44]

Radiation also induces persistent reprogramming of microglia into a primed state[50] and expands TAM populations with an immunosuppressive profile.[51] Notably, we observed that iMG were already reprogrammed toward an immunosuppressive TAM state in the presence of TG16 GSCs. A gene expression signature, known as NES, has been identified in patients and is significantly associated with tumor evolution and macrophage

polarization.[29] Intriguingly, several NES genes were upregulated after irradiation in TG16 GSCs co-cultured with CCOs. Among these, *POSTN* plays a dual role in maintaining GBM stem cells and promoting the immunosuppressive phenotype of microglia in GBM.[45] The immunosuppressive environment created by TAMs is responsible for the failure of immunotherapies.[52] Therefore, our model will be invaluable for elucidating the mechanisms driving recurrence after radiotherapy and for discovering therapeutic strategies, particularly in the context of precision medicine.

Primary brain tumors, particularly pediatric and adult diffuse gliomas, are strongly influenced by the tumor microenvironment, including microglia, TAMs, and vascular cells. Recent studies have introduced patient-derived tumoroids, or GBM organoids, generated from tumor explants, which recapitulate key histological features, cellular heterogeneity, and mutational profiles of the parental tumors and enable biobanking for personalized therapeutic testing.[53,54] Despite the partial loss of patient-derived immune and vascular components during culture, tumoroids remain valuable preclinical models to predict disease progression and therapeutic response.[54–57] More recently, CO-based models have enabled the investigation of tumor invasion and cellular plasticity within a human neural context.[13] Co-culture of human GSCs with COs has been valuable to study tumor growth and identify invasion signatures that closely resemble those observed in surgical GBM specimens.[13,58] This model also provided insight into the intercellular communications between malignant and non-malignant cells.[59] However, such models present important limitations, notably the absence of vascular and immune compartments. Only recently have more complex CO systems begun to incorporate vasculature and/or microglia to address these shortcomings, although these approaches remain technically demanding and have not been widely adopted yet. Very recently, neuroimmune-competent human brain organoid glioma models have been reported using either microglia-containing brain organoids[60] or the integration of matched peripheral blood mononuclear cells into human cortical organoids, enabling the study of patient-specific immune responses and tumor-immune interactions.[61] Within this landscape, our approach simultaneously integrates glioma cells with both microglial and endothelial components in a single, fully human 3D system that more closely reflects the *in vivo* situation. Our model supports long-term culture, enabling in-depth analyses of tumor development and progression and the effects of diverse treatments and the incorporation of multiple cell types, genetically modified or not. It may also reproduce invasion of glioma cells into normal brain tissue. To our knowledge, no other iPSC-derived CO incorporating both microglia and vascular cells has been used to study gliomas.

In conclusion, our vascularized and immunocompetent CCO model offers a robust platform for investigating cellular interactions within the tumor microenvironment and assessing therapeutic responses. Additionally, it holds significant potential for advancing our understanding of human cerebral development and the disruptions that occur in diseases involving the endothelium and microglia.

Limitations of the study

The developmental state of COs has been reported to approximate late embryonic stages. In our model of CCOs, their cellular complexity favored astrocyte production, which may impart features reminiscent of a more advanced developmental stage. Further works are, therefore, warranted to precisely define the developmental stage of our CCOs.

In vitro, the vascular structures in CCOs lack lumen, but blood flow is known to promote vessel maturation. Notably, following transplantation into mice, these vessels exhibited blood flow and pericyte coverage, indicating more advanced maturation *in vivo*. These transplantation experiments were performed exclusively in male mice and should be extended to include female mice. Such transplantation strategies provide a useful avenue to study human-specific neuro-immune interactions under *in vivo* conditions. In parallel, engineering more sophisticated human organoid models within microfluidic devices may enable investigations under conditions that more closely mimic the *in vivo* environment.

In this study, cell populations in CCOs were quantified by FACS analysis of the dissociated whole organoids, while their characterization was performed by immunohistology on thick 3D sections. Although technically challenging, the quantitative analysis of these cell populations by immunohistology on intact organoids—which preserves spatial organization—warrants further development.

The direct involvement of ECs and microglia in the development of tumoral cells has not been demonstrated in this work and will be further assessed in future works.

Finally, the number of GSCs maintained in co-culture with CCOs is substantially lower than that in other model such as tumor explants. This suggests that our model more closely reflects the invasive behavior of tumor cells within normal brain tissue, rather than the cellular composition of the tumor core.

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Requests for further information should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Marc-André Mouthon (marc-andre.mouthon@cea.fr).

Materials availability

This study did not generate new unique reagents.

Data and code availability

- All data reported in this paper will be shared by the lead contact upon request.
- This study does not report original code.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to M.T. Garcia-Mitjavila, L. Morizur, and A. Perrier for iPSC lines and advice on iPSC cultures and organoid generation; C. Duwatt, V. Barroca, and S. Devanand for mice experiments; S. Messiaen for multiplex experiments; F. Pflumio for giving immunodeficient mice; and V. Ménard for irradiation. J.R. and O.B. are fellows from CEA (CFR « blanc» and CFR Organoid on Chip). J.R. is an ImmunoTools Award winner. This work was supported by La Ligue Contre le Cancer (comité des Hauts-de Seine), Les Entreprises Contre le Cancer (GEFLUC), Electricité de France, and GIS FC3R (project no. 22FC3R-024) from funds managed by INSERM. IStem/CECS is supported by Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.-A.M. conceptualized the study; L.C., T.K., and O.B. helped in methodology; C.G.-B., J.R., N.L., and M.-A.M. did experiments and formal analyses; L.C. and A.B. supplied biological resources; J.R., N.L., and M.-A.M. prepared figures and wrote the original draft; L.R.G., F.D.B., and M.-A.M. reviewed and edited the manuscript; L.R.G., F.D.B., M.-A.M., and A.B. obtained funding; and F.D.B. and M.-A.M. supervised the study. All authors reviewed the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS
  - Animals
  - Cell lines
- METHOD DETAILS
  - Hemogenic endothelial cell differentiation
  - Obtaining of complex cerebral organoids
  - Obtaining of cerebral organoids
  - Subcutaneous implantation of organoids into mice
  - Flow cytometry
  - Glioma stem cell cultures
  - Coculture of GSC with CCO
  - Irradiation
  - Luciferase assay in CCO
  - Quantitative PCR (qPCR)
  - Manual and automated multiplex immunofluorescences
  - 3D Immunofluorescence and CE3D clearing
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2026.101425.

Received: May 12, 2025
Revised: October 21, 2025
Accepted: April 2, 2026
Published: May 5, 2026

REFERENCES

1. 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. https://doi.org/10.1038/nature05236.
2. Vollmann-Zwerenz, A., Leidgens, V., Feliciello, G., Klein, C.A., and Hau, P. (2020). Tumor Cell Invasion in Glioblastoma. Int. J. Mol. Sci. *21*, 1932. https://doi.org/10.3390/ijms21061932.
3. Read, R.D., Tapp, Z.M., Rajappa, P., and Hambardzumyan, D. (2024). Glioblastoma microenvironment-from biology to therapy. Genes Dev. *38*, 360–379. https://doi.org/10.1101/gad.351427.123.
4. Jeon, H.-M., Kim, J.-Y., Cho, H.J., Lee, W.J., Nguyen, D., Kim, S.S., Oh, Y.T., Kim, H.-J., Jung, C.-W., Pinero, G., et al. (2023). Tissue factor is a critical regulator of radiation therapy-induced glioblastoma remodeling. Cancer Cell *41*, 1480–1497.e9. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.06.007.
5. Gutmann, D.H., and Kettenmann, H. (2019). Microglia/Brain Macrophages as Central Drivers of Brain Tumor Pathobiology. Neuron *104*, 442–449. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.08.028.
6. Akkari, L., Bowman, R.L., Tessier, J., Klemm, F., Handgraaf, S.M., de Groot, M., Quail, D.F., Tillard, L., Gadiot, J., Huse, J.T., et al. (2020). Dynamic changes in glioma macrophage populations after radiotherapy reveal CSF-1R inhibition as a strategy to overcome resistance. Sci. Transl. Med. *12*, eaaw7843. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw7843.
7. Pombo Antunes, A.R., Scheyltjens, I., Lodi, F., Messiaen, J., Antoranz, A., Duerinck, J., Kancheva, D., Martens, L., De Vlaminck, K., Van Hove, H., et al. (2021). Single-cell profiling of myeloid cells in glioblastoma across species and disease stage reveals macrophage competition and specialization. Nat. Neurosci. *24*, 595–610. https://doi.org/10.1038/s41593-020-00789-y.
8. Amankulor, N.M., Kim, Y., Arora, S., Kargl, J., Szulzewsky, F., Hanke, M., Margineantu, D.H., Rao, A., Bolouri, H., Delrow, J., et al. (2017). Mutant IDH1 regulates the tumor-associated immune system in gliomas. Genes Dev. *31*, 774–786. https://doi.org/10.1101/gad.294991.116.
9. Rosińska, S., and Gavard, J. (2021). Tumor Vessels Fuel the Fire in Glioblastoma. Int. J. Mol. Sci. *22*, 6514. https://doi.org/10.3390/ijms22126514.
10. Wang, W., Li, T., Cheng, Y., Li, F., Qi, S., Mao, M., Wu, J., Liu, Q., Zhang, X., Li, X., et al. (2024). Identification of hypoxic macrophages in glioblastoma with therapeutic potential for vasculature normalization. Cancer Cell *42*, 815–832.e12. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2024.03.013.
11. Chiaradia, I., and Lancaster, M.A. (2020). Brain organoids for the study of human neurobiology at the interface of in vitro and in vivo. Nat. Neurosci. *23*, 1496–1508. https://doi.org/10.1038/s41593-020-00730-3.
12. Krieger, T.G., Tirier, S.M., Park, J., Jechow, K., Eisemann, T., Peterziel, H., Angel, P., Eils, R., and Conrad, C. (2020). Modeling glioblastoma invasion using human brain organoids and single-cell transcriptomics. Neuro Oncol. *22*, 1138–1149. https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa091.
13. Linkous, A., Balamatsias, D., Snuderl, M., Edwards, L., Miyaguchi, K., Milner, T., Reich, B., Cohen-Gould, L., Storaska, A., Nakayama, Y., et al. (2019). Modeling Patient-Derived Glioblastoma with Cerebral Organoids. Cell Rep. *26*, 3203–3211.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.063.
14. Cakir, B., Xiang, Y., Tanaka, Y., Kural, M.H., Parent, M., Kang, Y.-J., Chapeton, K., Patterson, B., Yuan, Y., He, C.-S., et al. (2019). Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. Nat. Methods *16*, 1169–1175. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0586-5.
15. Mansour, A.A., Gonçalves, J.T., Bloyd, C.W., Li, H., Fernandes, S., Quang, D., Johnston, S., Parylak, S.L., Jin, X., and Gage, F.H. (2018). An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. Nat. Biotechnol. *36*, 432–441. https://doi.org/10.1038/nbt.4127.
16. Zhang, W., Jiang, J., Xu, Z., Yan, H., Tang, B., Liu, C., Chen, C., and Meng, Q. (2023). Microglia-containing human brain organoids for the study of brain development and pathology. Mol. Psychiatry *28*, 96–107. https://doi.org/10.1038/s41380-022-01892-1.
17. Park, D.S., Kozaki, T., Tiwari, S.K., Moreira, M., Khalilnezhad, A., Torta, F., Olivié, N., Thiam, C.H., Liani, O., Silvin, A., et al. (2023). iPS-cell-derived microglia promote brain organoid maturation via cholesterol transfer. Nature *623*, 397–405. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06713-1.
18. Schafer, S.T., Mansour, A.A., Schlachetzki, J.C.M., Pena, M., Ghassemzadeh, S., Mitchell, L., Mar, A., Quang, D., Stumpf, S., Ortiz, I.S., et al. (2023). An in vivo neuroimmune organoid model to study human microglia phenotypes. Cell *186*, 2111–2126.e20. https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.04.022.
19. Sun, X.-Y., Ju, X.-C., Li, Y., Zeng, P.-M., Wu, J., Zhou, Y.-Y., Shen, L.-B., Dong, J., Chen, Y.-J., and Luo, Z.-G. (2022). Generation of vascularized brain organoids to study neurovascular interactions. eLife *11*, e76707. https://doi.org/10.7554/eLife.76707.
20. Marcelo, K.L., Goldie, L.C., and Hirschi, K.K. (2013). Regulation of endothelial cell differentiation and specification. Circ. Res. *112*, 1272–1287. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300506.

21. Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science *330*, 841–845. https://doi.org/10.1126/science.1194637.

22. Atkins, M.H., Scarfò, R., McGrath, K.E., Yang, D., Palis, J., Ditadi, A., and Keller, G.M. (2021). Modeling human yolk sac hematopoiesis with pluripotent stem cells. J. Exp. Med. *219*, e20211924. https://doi.org/10.1084/jem.20211924.

23. Vargas-Valderrama, A., Ponsen, A.-C., Le Gall, M., Clay, D., Jacques, S., Manoliu, T., Rouffiac, V., Ser-le-Roux, K., Quivoron, C., Louache, F., et al. (2022). Endothelial and hematopoietic hPSCs differentiation via a hematoendothelial progenitor. Stem Cell Res. Ther. *13*, 254. https://doi.org/10.1186/s13287-022-02925-w.

24. Azzoni, E., Conti, V., Campana, L., Dellavalle, A., Adams, R.H., Cossu, G., and Brunelli, S. (2014). Hemogenic endothelium generates mesoangioblasts that contribute to several mesodermal lineages in vivo. Development *141*, 1821–1834. https://doi.org/10.1242/dev.103242.

25. Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurles, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. Nature *501*, 373–379. https://doi.org/10.1038/nature12517.

26. El-Habr, E.A., Dubois, L.G., Burel-Vandenbos, F., Bogeas, A., Lipecka, J., Turchi, L., Lejeune, F.-X., Coehlo, P.L.C., Yamaki, T., Wittmann, B.M., et al. (2017). A driver role for GABA metabolism in controlling stem and proliferative cell state through GHB production in glioma. Acta Neuropathol. *133*, 645–660. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1659-5.

27. Xie, Y., He, L., Lugano, R., Zhang, Y., Cao, H., He, Q., Chao, M., Liu, B., Cao, Q., Wang, J., et al. (2021). Key molecular alterations in endothelial cells in human glioblastoma uncovered through single-cell RNA sequencing. JCI Insight *6*, e150861. https://doi.org/10.1172/jci.insight.150861.

28. Gauthier, L.R., Saati, M., Bensalah-Pigeon, H., Ben M'Barek, K., Gitton-Quent, O., Bertrand, R., Busso, D., Mouthon, M.-A., Collura, A., Junier, M.-P., et al. (2020). The HIF1α/JMY pathway promotes glioblastoma stem-like cell invasiveness after irradiation. Sci. Rep. *10*, 18742. https://doi.org/10.1038/s41598-020-75300-5.

29. Wu, L., Wu, W., Zhang, J., Zhao, Z., Li, L., Zhu, M., Wu, M., Wu, F., Zhou, F., Du, Y., et al. (2022). Natural Coevolution of Tumor and Immunoenvironment in Glioblastoma. Cancer Discov. *12*, 2820–2837. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-22-0196.

30. Daneman, R., and Prat, A. (2015). The Blood–Brain Barrier. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *7*, a020412. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412.

31. Carmeliet, P., and Tessier-Lavigne, M. (2005). Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. Nature *436*, 193–200. https://doi.org/10.1038/nature03875.

32. Dao, L., You, Z., Lu, L., Xu, T., Sarkar, A.K., Zhu, H., Liu, M., Calandrelli, R., Yoshida, G., Lin, P., et al. (2024). Modeling blood-brain barrier formation and cerebral cavernous malformations in human PSC-derived organoids. Cell Stem Cell *31*, 818–833.e11. https://doi.org/10.1016/j.stem.2024.04.019.

33. Quintard, C., Tubbs, E., Jonsson, G., Jiao, J., Wang, J., Werschler, N., Laporte, C., Pitaval, A., Bah, T.-S., Pomeranz, G., et al. (2024). A microfluidic platform integrating functional vascularized organoids-on-chip. Nat. Commun. *15*, 1452. https://doi.org/10.1038/s41467-024-45710-4.

34. Paşca, A.M., Sloan, S.A., Clarke, L.E., Tian, Y., Makinson, C.D., Huber, N., Kim, C.H., Park, J.-Y., O'Rourke, N.A., Nguyen, K.D., et al. (2015). Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. Nat. Methods *12*, 671–678. https://doi.org/10.1038/nmeth.3415.

35. Renner, M., Lancaster, M.A., Bian, S., Choi, H., Ku, T., Peer, A., Chung, K., and Knoblich, J.A. (2017). Self-organized developmental patterning and differentiation in cerebral organoids. EMBO J. *36*, 1316–1329. https://doi.org/10.15252/embj.201694700.

36. Thion, M.S., Ginhoux, F., and Garel, S. (2018). Microglia and early brain development: An intimate journey. Science *362*, 185–189. https://doi.org/10.1126/science.aat0474.

37. Gosselin, D., Skola, D., Coufal, N.G., Holtman, I.R., Schlachetzki, J.C.M., Sajti, E., Jaeger, B.N., O'Connor, C., Fitzpatrick, C., Pasillas, M.P., et al. (2017). An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. Science *356*, eaal3222. https://doi.org/10.1126/science.aal3222.

38. Mittelbronn, M., Dietz, K., Schluesener, H.J., and Meyermann, R. (2001). Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. Acta Neuropathol. *101*, 249–255. https://doi.org/10.1007/s004010000284.

39. Sinnaeve, J., Mobley, B.C., and Ihrie, R.A. (2018). Space Invaders: Brain Tumor Exploitation of the Stem Cell Niche. Am. J. Pathol. *188*, 29–38. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.029.

40. Kusne, Y., and Sanai, N. (2015). The SVZ and Its Relationship to Stem Cell Based Neuro-oncogenesis. Adv. Exp. Med. Biol. *853*, 23–32. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16537-0_2.

41. Stafford, J.H., Hirai, T., Deng, L., Chernikova, S.B., Urata, K., West, B.L., and Brown, J.M. (2016). Colony stimulating factor 1 receptor inhibition delays recurrence of glioblastoma after radiation by altering myeloid cell recruitment and polarization. Neuro Oncol. *18*, 797–806. https://doi.org/10.1093/neuonc/nov272.

42. Maas, S.L.N., Abels, E.R., Van De Haar, L.L., Zhang, X., Morsett, L., Sil, S., Guedes, J., Sen, P., Prabhakar, S., Hickman, S.E., et al. (2020). Glioblastoma hijacks microglial gene expression to support tumor growth. J. Neuroinflammation *17*, 120. https://doi.org/10.1186/s12974-020-01797-2.

43. Blériot, C., Dunsmore, G., Alonso-Curbelo, D., and Ginhoux, F. (2024). A temporal perspective for tumor-associated macrophage identities and functions. Cancer Cell *42*, 747–758. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2024.04.002.

44. Hara, T., Chanoch-Myers, R., Mathewson, N.D., Myskiw, C., Atta, L., Bussema, L., Eichhorn, S.W., Greenwald, A.C., Kinker, G.S., Rodman, C., et al. (2021). Interactions between cancer cells and immune cells drive transitions to mesenchymal-like states in glioblastoma. Cancer Cell *39*, 779–792.e11. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.05.002.

45. Zhou, W., Ke, S.Q., Huang, Z., Flavahan, W., Fang, X., Paul, J., Wu, L., Sloan, A.E., McLendon, R.E., Li, X., et al. (2015). Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. Nat. Cell Biol. *17*, 170–182. https://doi.org/10.1038/ncb3090.

46. Jhaveri, N., Chen, T.C., and Hofman, F.M. (2016). Tumor vasculature and glioma stem cells: Contributions to glioma progression. Cancer Lett. *380*, 545–551. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.028.

47. Marhuenda, E., Fabre, C., Zhang, C., Martin-Fernandez, M., Iskratsch, T., Saleh, A., Bauchet, L., Cambedouzou, J., Hugnot, J.-P., Duffau, H., et al. (2021). Glioma stem cells invasive phenotype at optimal stiffness is driven by MGAT5 dependent mechanosensing. J. Exp. Clin. Cancer Res. *40*, 139. https://doi.org/10.1186/s13046-021-01925-7.

48. Cuddapah, V.A., Robel, S., Watkins, S., and Sontheimer, H. (2014). A neurocentric perspective on glioma invasion. Nat. Rev. Neurosci. *15*, 455–465. https://doi.org/10.1038/nrn3765.

49. Watson, S.S., Duc, B., Kang, Z., de Tonnac, A., Eling, N., Font, L., Whitmarsh, T., Massara, M., Bodenmiller, B., Hausser, J., et al. (2024). Microenvironmental reorganization in brain tumors following radiotherapy and recurrence revealed by hyperplexed immunofluorescence imaging. Nat. Commun. *15*, 3226. https://doi.org/10.1038/s41467-024-47185-9.

50. Voshart, D.C., Oshima, T., Jiang, Y., van der Linden, G.P., Ainslie, A.P., Reali Nazario, L., van Buuren-Broek, F., Scholma, A.C., van Weering, H.R.J., Brouwer, N., et al. (2024). Radiotherapy induces persistent innate immune reprogramming of microglia into a primed state. Cell Rep. *43*, 113764. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.113764.

51. Wang, L., Dou, X., Chen, S., Yu, X., Huang, X., Zhang, L., Chen, Y., Wang, J., Yang, K., Bugno, J., et al. (2023). YTHDF2 inhibition potentiates radiotherapy antitumor efficacy. Cancer Cell *41*, 1294–1308.e8. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.04.019.

52. Antonucci, L., Canciani, G., Mastronuzzi, A., Carai, A., Del Baldo, G., and Del Bufalo, F. (2022). CAR-T Therapy for Pediatric High-Grade Gliomas: Peculiarities, Current Investigations and Future Strategies. Front. Immunol. *13*, 867154. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867154.

53. Golebiewska, A., Hau, A.-C., Oudin, A., Stieber, D., Yabo, Y.A., Baus, V., Barthelemy, V., Klein, E., Bougnaud, S., Keunen, O., et al. (2020). Patient-derived organoids and orthotopic xenografts of primary and recurrent gliomas represent relevant patient avatars for precision oncology. Acta Neuropathol. *140*, 919–949. https://doi.org/10.1007/s00401-020-02226-7.

54. Jacob, F., Salinas, R.D., Zhang, D.Y., Nguyen, P.T.T., Schnoll, J.G., Wong, S.Z.H., Thokala, R., Sheikh, S., Saxena, D., Prokop, S., et al. (2020). A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. Cell *180*, 188–204.e22. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.036.

55. Logun, M., Wang, X., Sun, Y., Bagley, S.J., Li, N., Desai, A., Zhang, D.Y., Nasrallah, M.P., Pai, E.L.-L., Oner, B.S., et al. (2025). Patient-derived glioblastoma organoids as real-time avatars for assessing responses to clinical CAR-T cell therapy. Cell Stem Cell *32*, 181–190.e4. https://doi.org/10.1016/j.stem.2024.11.010.

56. Rajan, R.G., Fernandez-Vega, V., Sperry, J., Nakashima, J., Do, L.H., Andrews, W., Boca, S., Islam, R., Chowdhary, S.A., Seldin, J., et al. (2023). In Vitro and In Vivo Drug-Response Profiling Using Patient-Derived High-Grade Glioma. Cancers (Basel) *15*, 3289. https://doi.org/10.3390/cancers15133289.

57. Soubéran, A., Jiguet-Jiglaire, C., Toutain, S., Morando, P., Baeza-Kallee, N., Appay, R., Boucard, C., Graillon, T., Meyer, M., Farah, K., et al. (2025). Brain tumoroids: Treatment prediction and drug development for brain tumors with fast, reproducible, and easy-to-use personalized models. Neuro Oncol. *27*, 415–429. https://doi.org/10.1093/neuonc/noae184.

58. Fedorova, V., Pospisilova, V., Vanova, T., Amruz Cerna, K., Abaffy, P., Sedmik, J., Raska, J., Vochyanova, S., Matusova, Z., Houserova, J., et al. (2023). Glioblastoma and cerebral organoids: development and analysis of an in vitro model for glioblastoma migration. Mol. Oncol. *17*, 647–663. https://doi.org/10.1002/1878-0261.13389.

59. Mangena, V., Chanoch-Myers, R., Sartore, R., Paulsen, B., Gritsch, S., Weisman, H., Hara, T., Breakefield, X.O., Breyne, K., Regev, A., et al. (2025). Glioblastoma Cortical Organoids Recapitulate Cell-State Heterogeneity and Intercellular Transfer. Cancer Discov. *15*, 299–315. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-23-1336.

60. Sarnow, K., Majercak, E., Qurbonov, Q., Cruzeiro, G.A.V., Jeong, D., Haque, I.A., Khalil, A., Baird, L.C., Filbin, M.G., and Tang, X. (2025). Neuroimmune-competent human brain organoid model of diffuse midline glioma. Neuro Oncol. *27*, 369–382. https://doi.org/10.1093/neuonc/noae245.

61. Baisiwala, S., Fazzari, E., Li, M.X., Martija, A., Azizad, D.J., Sun, L., Herrera, G., Phan, T., Monteleone, A., Kan, R.L., et al. (2026). A human tumor-immune organoid model of glioblastoma. Cell Rep. *45*, 116790. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2025.116790.

62. Silvestre, D.C., Pineda, J.R., Hoffschir, F., Studler, J.M., Mouthon, M.A., Pflumio, F., Junier, M.P., Chneiweiss, H., and Boussin, F.D. (2011). Alternative lengthening of telomeres in human glioma stem cells. Stem Cell. *29*, 440–451.

CellPress
OPEN ACCESS

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
CD11b-BB700	BD Biosciences	Clone identity: M1/70 Cat#566417 RRID: AB_2744272
CD11b-BV421	BioLegend	Clone identity: M1/70 Cat#101235 RRID: AB_10897942
CD31-BV605	BioLegend	Clone identity: WM59 Cat#303122 RRID: AB_2562148
CD31-PE	Immunotools	Clone identity: MEM-05 Cat#21270314S RRID: AB_3662732
CD43-PE-Cy7	BioLegend	Clone identity: CD43-10G7 Cat#343208 RRID: AB_2563698
CD45-APC	BioLegend	Clone identity: HI30 Cat#304012 RRID: AB_2562049
CD45-PE	BioLegend	Clone identity: HI30 Cat#304008 RRID: AB_2562057
CD49d-APC-Cy7	BioLegend	Clone identity: 9F10 Cat#304327 RRID: AB_2616848
CD144-APC	BioLegend	Clone identity: BV9 Cat#348507 RRID: AB_10639861
CD146-BV605	BioLegend	Clone identity: P1H12 Cat#361024 RRID: AB_2783271
CD163-BV510	BioLegend	Clone identity: GHI/61 Cat#333628 RRID: AB_2650631
CD206-APC	Thermo Fisher Scientific	Clone identity: 19.2 Cat#17-2069-42 RRID: AB_2573182
CD309-BV421	BioLegend	Clone identity: A16085H Cat#393010 RRID: AB_2832739
CX3CR1-APC	Thermo Fisher Scientific	Clone identity: 2A9-1 Cat#17-6099-42 RRID: AB_11149136
HLADR-SB780	Thermo Fisher Scientific	Clone identity: LN3 Cat#78-9956-42 RRID: AB_2724457
P2RY12-BV421	BioLegend	Clone identity: S16001E Cat#392105 RRID: AB_2783290
SSEA3-AF488	R and D Systems	Clone identity: MC-631 Cat#FAB1434G RRID: AB_3646484
TRA-1-81-AF594	R and D Systems	Clone identity: TRA-1-81 Cat#IC8495T RRID: AB_3662726
AIF-1/Iba1	Novus	Clone identity: polyclonal Cat#NBP2-19019 RRID: AB_3073939
AIF-1/Iba1	Novus	Clone identity: polyclonal Cat#NB100-1028 RRID: AB_521594
CD31	Biolegend	Clone identity: P2B1 Cat#910005 RRID: AB_2566676
Collagen IV	Abcam	Clone identity: polyclonal Cat#ab6586 RRID: AB_305584
Connexin 43	Abcam	Clone identity: polyclonal Cat#ab11370 RRID: AB_297976
Doublecortin (DCX)	Novus	Clone identity: polyclonal Cat#NBP1-72042 RRID: AB_11019667
GFAP	Cell Signaling Technology	Clone identity: GA5 Cat#3670 RRID: AB_561049
GFP	Novus	Clone identity: polyclonal Cat#NB100-1614 RRID: AB_10001164
GFP	Novus	Clone identity: polyclonal Cat#NB100-1770 RRID: AB_10128178
MAP2	Millipore	Clone identity: AP20 Cat#MAB3418 RRID: AB_94856

(*Continued on next page*)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
P2RY12	Sigma-Aldrich	Clone identity: polyclonal Cat#HPA014518 RRID: AB_2669027
PDGFRβ	R and D Systems	Clone identity: polyclonal Cat#AF1042 RRID: AB_2162633
PSD95	Cell Signaling Technology	Clone identity: polyclonal Cat#3450 RRID: AB_2292883
S100β	Agilent DAKO	Clone identity: polyclonal Cat#Z0311 RRID: AB_10013383
SOX2	Millipore	Clone identity: polyclonal Cat#AB5603 RRID: AB_2286686
SOX9	Millipore	Clone identity: polyclonal Cat#AB5535 RRID: AB_2239761
ZO-1	Thermo Fisher Scientific	Clone identity: ZO1-1A12 Cat#33–9100 RRID: AB_2533147
β3-tubulin	BioLegend	Clone identity: TUJ1 Cat#801202 RRID: AB_2313773
Rabbit anti-Chicken-FITC	Thermo Fisher Scientific	Clone identity: polyclonal Cat#SA1-9511 RRID: AB_1075130
Donkey anti-Goat-AFplus488	Thermo Fisher Scientific	Clone identity: polyclonal Cat#A32814 RRID: AB_2762838
Donkey anti-Goat-AF594	Thermo Fisher Scientific	Clone identity: polyclonal Cat#A-21468 RRID: AB_2535871
Donkey anti-Goat-AF647	Thermo Fisher Scientific	Clone identity: polyclonal Cat#A-21447 RRID: AB_141844
Chicken anti-Mouse-AF488	Thermo Fisher Scientific	Clone identity: polyclonal Cat#A-21200 RRID: AB_2535786
Donkey anti-Mouse-AF488	Thermo Fisher Scientific	Clone identity: polyclonal Cat#A-21202 RRID: AB_141607
Donkey anti-Mouse-AF594	Thermo Fisher Scientific	Clone identity: polyclonal Cat#A-21203 RRID: AB_2535789
Donkey anti-Mouse-AFplus647	Thermo Fisher Scientific	Clone identity: polyclonal Cat#A32787 RRID: AB_2762830
Donkey anti-Rabbit-AF488	Thermo Fisher Scientific	Clone identity: polyclonal Cat#A-21206 RRID: AB_2535792
Donkey anti-Rabbit-AF594	Thermo Fisher Scientific	Clone identity: polyclonal Cat#A21207 RRID: AB_141637
Donkey anti-Rabbit-AFplus647	Thermo Fisher Scientific	Clone identity: polyclonal Cat#A32795 RRID: AB_2762835
OmniMap anti-Ms HRP	Roche	Cat#5269652001; RRID: AB_2885182
OmniMap anti-Rb HRP	Roche	Cat#5269679001
OPAL520	AKOYA Biosciences	Cat#FP1487001KT
OPAL570	AKOYA Biosciences	Cat#FP1488001KT
OPAL620	AKOYA Biosciences	Cat#FP1495001KT
CD31	Biolegend	Clone identity: WM59 Cat#303102 RRID: AB_314328
GFAP	Millipore	Clone identity: GA5 Cat#IF03L RRID: AB_2294571
LAMININ a4	Millipore	Clone identity: 4B12 Cat#MABT39 RRID: AB_10807830
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
StemMACS™ iPS-Brew XF, human	Miltenyi Biotec	Cat#130-104-368
Vitronectin	Gibco™	Cat#A14700
mTESR1	Stem Cell Technologies	Cat#85850
Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix, LDEV-free	Corning	Cat#354277

(*Continued on next page*)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
EDTA	Invitrogen	Cat#15575-038
Accutase™	Sigma Aldrich	Cat# A6964
STEMdiff™ APEL™2	Stem Cell Technologies	Cat# 05275
Y-27632	Stem Cell Technologies	Cat#7230
Human VEGF-165 Recombinant Protein	PeproTech®	Cat#100-20-050u
Human BMP-4 Recombinant Protein	PeproTech®	Cat#120-05-100u
CHIR99021	BioTechne	Cat#4423
Human Flt-3 Ligand (FLT3L) Recombinant Protein	PeproTech®	Cat#300-19-10u
Human SCF Recombinant Protein	PeproTech®	Cat#300-07-10u
Human TPO (Thrombopoietin) Recombinant Protein	PeproTech®	Cat#300-18-10u
TrypLE™ Express	Gibco	Cat#12605010
DMEM/F12 1% Glutamax	Gibco	Cat#31331028
Knockout Serum Replacer	Gibco	Cat#10828028
MEM-NEAA	Gibco	Cat#11140050
2β-mercaptoethanol	Gibco	Cat# 31350010
Fetal Bovine Serum	Gibco	Cat#10500064
Anti-Anti	Gibco	Cat#15240062
thermostable human basic fibroblast growth factor (bFGF)	Gibco	Cat#PHG0360
N2	Gibco	Cat#17502048
Heparin	Stem Cell Technologies	Cat#07980
Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix, LDEV-free	Corning	Cat#354230
Neurobasal	Gibco	Cat#21103049
Glutamax	Gibco	Cat#35050061
Insulin	Sigma-Aldrich	I9278
B27 without vitamin A	Gibco	Cat#12587010
Human IL-34 Recombinant Protein	PeproTech®	Cat#200-34
Human GM-CSF Recombinant Protein	PeproTech®	Cat#300-03
B27	Gibco	Cat#17504044
Papain	Worthington	Cat#LS003119
DNAse I	Sigma Aldrich	Cat#D5025
EDTA	Sigma Aldrich	Cat#E5134
L-cysteine	Sigma Aldrich	Cat#C7352
EBSS	Gibco	Cat#24010043
Trypsin inhibitor type II	Sigma Aldrich	Cat#T9128
bisBenzimide H 33258	Sigma Aldrich	Cat#23491-45-4 H
human recombinant epidermal growth factor (EGF)	Sigma Aldrich	Cat#E9644
D-luciferin	PerkinElmer	Cat#122799
70kDa FITC-dextran	Sigma Aldrich	Cat#90718
RLT lysis buffer	Qiagen	Cat#79216
RNeasy Micro Kit with DNase treatment	Qiagen	Cat#74004
NucleoSpin RNA XS	Marcherey-Nagel	Cat#740902
Reverse Transcription High Capacity Master Mix	Applied Biosystems	Cat#4368814
Power SYBR GREEN	Applied Biosystems	Cat#4367659
BSA	Sigma Aldrich	Cat#A7906
Fluoromount-DAPI	Southern Biotechnologies	Cat#0100-20
PBS-TABS	Sigma Aldrich	Cat#18912

(*Continued on next page*)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Triton X-100	Sigma Aldrich	Cat#T8787
BD Perm/Wash Buffer	BD Bioscience	Cat#554723
Donkey Serum	Eurobio Scientific	Cat#CAEMTN00-0U
1-thioglycerol	Sigma Aldrich	Cat#M1753
Saponine	Sigma Aldrich	Cat#S-4521
DAPI	Sigma Aldrich	Cat#D9542
Experimental models: Cell lines		
PDF01	ATCC®, ISTEM, Evry	PCS-201-012™
GM25256*G	Coriell	Cat#GM25256, RRID:CVCL_Y803
Experimental models: Organisms/strains		
Male NOD-SCID mouse: NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ	The Jackson Laboratory	RRID:IMSR_JAX:005557
Nude mouse: Rj:NMRI-Foxn1 nu/nu	Janvier Labs	SM-NMRNU-F
Oligonucleotides		
qRT-PCR primers used in this work	This paper	see Table S1
Software and algorithms		
FlowJo	BD Bioscience	RRID:SCR_008520
StepOne	Applied Biosystems	RRID:SCR_014281
Leica Application Suite X	Leica	RRID:SCR_013673
IMARIS	Bitplane	RRID:SCR_007370
GraphPad Prism	GraphPad	RRID:SCR_002798
Other		
24-wells AggreWell™800	Stem Cell Technologies	Cat#34815
Corning® 96-well Clear Round Bottom Ultra-Low Attachment Microplate	Corning	Cat#7007
24-well plate	Falcon	Cat#353047
Bioluminescence Imager (IVIS LUMINA II)	Perkin Elmer	IVIS LUMINA II
BD FACSAria II Cell Sorter	BD Bioscience	RRID:SCR_018934
GSR D1 irradiator	Gamma services	GSR D1
Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System	Applied Biosystems	RRID:SCR_023455
Tissue-Tek	Sakura	Tissue-Tek
microtome	Leica Microsystems	RM2125RT
SuperFrost Plus slides	Epredia	Cat#J1800AMNZ
Roche Ventana BenchMark ULTRA IHC/ISH System	Roche	RRID:SCR_025506
Leica SP8 LIGHTNING confocal microscope	Leica	RRID:SCR_018169
Spinning-Disk confocal microscope	Nikon, GATTACA	N/A
1mm piezoelectric	Piezoconcept	N/A
Leica VT1200S vibrating microtome	Leica	RRID:SCR_020243
24 well plate glass bottom	Azenta	Cat#4TI-0243
cover slips	Epredia	Cat#CB00120RA120MNZ0

EXPERIMENTAL MODEL AND STUDY PARTICIPANT DETAILS

Animals

All animal experiments described in this study were approved by the Institutional Animal Care & Use Committee of CEA/DRF (CEtEA) and were performed under the EU guidelines with approved protocol (APAFIS#40886–2023021010503692). NOD-SCID mice (RRID:IMSR_JAX:005557) were bred in our animal facility. Three-to five-month-old male from different littermates of the same sex were randomly assigned to experimental groups.

CellPress
OPEN ACCESS

Cell lines

Human iPSC lines PDF01 (reprogrammed from dermal female fibroblasts (ATCC #PCS-201-012) at ISTEM, Evry, France) and GM25256*G (derived from male fibroblasts; Coriell Cat#GM25256, RRID:CVCL_Y803) were cultured, respectively, in IPS-BREW XF (Miltenyi Biotec Cat#130-104-368, StemMACS iPS-Brew XF, human) on Vitronectin (GibcoTM Cat#A14700, VTN-N) coated dishes and in mTESR1 (Stem Cell Technologies Cat#85850, mTeSR1) on Matrigel (Corning Cat#354277, Corning Matrigel hESC-Qualified Matrix, LDEV-free) coated dishes. iPSCs were passaged and used at 70–80% of confluence. Pluripotency was routinely checked for >85% TRA1-81 (R and D Systems Cat# IC8495T, RRID:AB_3662726) and SSEA3 (R and D Systems Cat#FAB1434G, RRID:AB_3646484) staining by flow cytometry.

The TG16 and TG20 human GSC lines were established from surgical resections carried out at Sainte Anne Hospital (Paris, France)[26,62] on males with high-grade IDH wt/mut gliomas according to the WHO classification (GBM: TG16; astrocytoma: TG20). TG20 line is mutated for TP53 (P278L), loss of ATRX but no deletion of 1p/19q. GSC lines were cultured as gliospheres in defined stem cell culture condition (serum-free Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM/F12 supplemented with 1% Anti-Anti, 1x B27 without vitamin A, 5 μg/mL heparin, 20 ng/mL human recombinant epidermal growth factor (EGF, Sigma Aldrich Cat#E9644) and 20 ng/mL bFGF at 37°C in an atmosphere containing 5% CO2. Every week, cells were dissociated after a 5 min incubation at room temperature with the Accutase cell dissociation reagent and reseeded at 0.5×10^6 cells per T75 flask. GSC lines were transduced using a lentiviral vector containing a Luciferase/EGFP cassette (pTRIP-MND-Luciferase-Ires-GFP).[62]

METHOD DETAILS

Hemogenic endothelial cell differentiation

Hemogenic endothelial cells (HECs) were generated according to Vargas-Valderamma's protocol with some modifications.[23] Briefly, iPSC colonies were moderately dissociated with 0.5mM EDTA (Invitrogen Cat#15575-038) and, optionally with AccutaseTM (Sigma Aldrich, Cat# A6964). One million of cells were cultured in 5mL STEMdiff APEL2 medium (Stem Cell Technologies, Cat# 05275) in the presence of 10μM Y-27632 (Stem Cell Technologies Cat#7230), 50ng/mL Human VEGF-165 Recombinant Protein (PeproTech Cat#100-20-050u) 50ng/mL Human BMP-4 Recombinant Protein (PeproTech Cat#120-05-100u), 6μM CHIR99021 (BioTechne Cat#4423) in a 25 cm^2 flask. Alternatively, GM25256 cells for which dissociation is critical, HEC cultures were cultured into 24-wells AggreWell800 (Stem Cell Technologies Cat#34815) with 500 cells/μwell. After 48h, cells were transferred to APEL2 medium with 50ng/mL VEGF-165, 50ng/mL BMP-4, 20ng/mL Human Flt-3 Ligand (FLT3L) Recombinant Protein (PeproTech Cat#300-19-10u), 20ng/mL Human SCF Recombinant Protein (PeproTech Cat#300-07-10u) and 20ng/mL Human TPO (Thrombopoietin) Recombinant Protein (PeproTech Cat#300-18-10u) for 3 or 4 days. Five to seven days after their initiation, HECs were recovered from adherent clones by dissociation with TrypLE Express (Gibco Cat#12605010) or Accutase.

Obtaining of complex cerebral organoids

Human cerebral organoids were generated according to Lancaster's protocol with modifications.[25] Briefly, iPSC colonies were dissociated with 0.5mM EDTA and Accutase. Embryoid bodies (EB) were formed with 9,000 cells in Corning 96-well Clear Round Bottom Ultra-Low Attachment Microplate (Corning Cat#7007) and cultured in hESC medium (DMEM/F12 1% Glutamax [Gibco Cat#31331028] containing 20% [v/v] Knockout Serum Replacer [Gibco Cat#10828028], 1% [v/v] MEM-NEAA [Gibco Cat#11140050], 100μM 2β-mercaptoethanol [Gibco Cat# 31350010], 15% Fetal Bovine Serum [Gibco Cat#10500064], 1% [v/v] Anti-Anti [Gibco Cat#15240062]) with 10 μM Y-27632 and 4ng/mL thermostable human basic fibroblast growth factor (bFGF, Gibco Cat#PHG0360). The fifth day, EB were transferred in hESC medium without bFGF or Y-27632 for 6 h. Then, EB were transferred in Neural Induction Medium (DMEM/F12 1% Glutamax containing 1% [v/v] N2 [Gibco Cat#17502048], 1% [v/v] MEM-NEAA, 1μg/mL Heparin [Stem Cell Technologies Cat#07980], 1% [v/v] Anti-Anti). Seven days after their initiation, embryoid bodies were cocultured for 2 days with dissociated HEC (10^4 HEC/embryoid body) in neural induction medium under static conditions. Then, complex cerebral embryoid bodies were embedded into 20μL droplet of GFR Matrigel (Corning Cat#354230) and cultivated into cerebral organoid differentiation medium (50% [v/v] DMEM/F12 with 50% [v/v] Neurobasal [Gibco Cat#21103049] containing 1% [v/v] Glutamax [Gibco Cat#35050061], 0.5% [v/v] N2, 2.63 μg/mL Insulin [Gibco Cat#], 0.5% [v/v] MEM-NEAA, 50μM 2β-mercaptoethanol) composed of 0.5% (v/v) B27 without vitamin A (Gibco Cat#12587010) supplemented with 20ng/mL VEGFA, 100ng/mL IL-34 (PeproTech Cat#200-34), 10ng/mL GM-CSF (PeproTech Cat#300-03). After 2–3 days, the medium was replaced by cerebral organoid differentiation medium with 0.5% (v/v) B27 (Gibco Cat#17504044), 20ng/mL VEGFA, 100ng/mL IL-34, 10ng/mL GM-CSF and renewed each 3–4 days. CCOs were kept under orbital shaking from day 11 (85 rpm).

Obtaining of cerebral organoids

Conventional cerebral organoids were generated following the same protocol as CCOs, but without the addition of human endothelial cells (HECs) or growth factors (VEGF, IL-34, and GM-CSF).

Subcutaneous implantation of organoids into mice

Thirty days after initiation, CCOs were implanted into the leg of NOD-SCID mice. Mice were placed into a chamber by providing 2% isoflurane for anesthetization. Then, mice were immobilized under a laminar flow hood to cut a small incision at each back leg. CCOs

were subcutaneously placed into the incision of the right and left back legs. Once CCO were inserted, the wound was closed with sutures and buprenorphine (0.1 mg/kg) was administered for pain relief. One month after xenotransplantation, mice were anesthetized and perfused with 25 mL of 70kDa FITC-dextran (Sigma Aldrich Cat#90718) for 5 min then euthanized. Subsequently, CCOs were recovered and fixed in 4% PFA for immunostaining.

Flow cytometry

CCOs were dissociated into single cell for FACS analyses. Briefly, CCOs were minced into small pieces by razor blade and incubated 30 min at 37°C, under orbital shaking (85 rpm), with 30U/mL Papain (Worthington Cat#LS003119), 100U/mL DNAse I (Sigma Aldrich Cat#D5025), 0.05mM EDTA (Sigma Aldrich Cat#E5134) and 0.18mg/mL L-cysteine (Sigma Aldrich Cat#C7352) in EBSS (Gibco Cat#24010043). After mechanical dissociation, cell suspensions were further incubated for 5–10 min at 37°C under orbital shaking. Then, cells were filtered into single cell in 10mg/mL Trypsin inhibitor type II (Sigma Aldrich Cat#T9128) and 100U/mL DNAse I (Sigma Cat#D5025).

Dissociated cells were incubated for 15 min at 4°C with fluorochrome-labeled antibodies in PBS containing 0.15% BSA. Then, cells were washed and resuspended in 0.15% BSA/PBS with 1μg/mL of bisBenzimide H 33258 (Sigma Aldrich Cat#23491-45-4 H) and sorted on a BD FACSAria II Cell Sorter (RRID:SCR_018934). Data were analyzed on FlowJo (RRID:SCR_008520).

Glioma stem cell cultures

The TG16 and TG20 GSC lines were established from surgical resections carried out at Sainte Anne Hospital (Paris, France)[26,62] on patients with high-grade IDH wt/mut gliomas according to the WHO classification (GBM: TG16; astrocytoma: TG20). TG20 line is mutated for TP53 (P278L), loss of ATRX but no deletion of 1p/19q. GSC lines were cultured as gliospheres in defined stem cell culture condition (serum-free Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM/F12 supplemented with 1% Anti-Anti, 1x B27 without vitamin A, 5 μg/mL heparin, 20 ng/mL human recombinant epidermal growth factor (EGF, Sigma Aldrich Cat#E9644) and 20 ng/mL bFGF at 37°C in an atmosphere containing 5% CO2. Every week, cells were dissociated after a 5 min incubation at room temperature with the Accutase cell dissociation reagent and reseeded at 0.5 × 106 cells per T75 flask. GSC lines were transduced using a lentiviral vector containing a Luciferase/EGFP cassette (pTRIP-MND-Luciferase-Ires-GFP).[62]

Coculture of GSC with CCO

Forty to 100 days after their initiation, CCOs were individually transferred into 1 well of 24-well plate (Falcon Cat#353047). Dissociated EGFP/Luciferase-expressing stable GSCs (2 x 10^4 cells) were added to each well in 1mL of GSC medium without growth factor. Plates were incubated on orbital agitator (85 RPM). After 2 days, CCOs were washed in PBS and transferred into new 24 well conventional plate. Then, CCO/GSC were maintained under orbital shaking (85 RPM) in cerebral organoid differentiation medium without growth factor with biweekly renewal.

Irradiation

Irradiations were performed with a GSR D1 irradiator (GSM) with four sources of Cs-137, with a total activity of around 180 TBq in March 2014, emitting 662 KeV gamma rays. Samples were irradiated at one single dose of 2 Gy (∼1 Gy/min) in 24-well plates. Prior to irradiation, dosimetry was performed in the same irradiation conditions with a cylindrical ionizing chamber 31010 by PTW as the recommendation of the AAPM'S TG-61. This ionizing chamber has a cavity of 0.125 cm3 calibrated in Cs-137 Kerma air with the PTB reference facility number 230451301. The polarity and the ion recombination were measured for this Cs-137 source. Each measurement was corrected using the KTP factor to account for variations in temperature and atmospheric pressure.

Luciferase assay in CCO

Pre-warmed medium containing D-luciferin (PerkinElmer Cat#122799) was added to each well to reach a final concentration of 250 μg/mL and immediately processed for monitoring with a Bioluminescence Imager (PerkinElmer IVIS LUMINA II). The flux (photons/sec) was measured each 2 min for 8 min, and the maximum value was recorded.

Quantitative PCR (qPCR)

Cells were sorted into tubes containing RLT lysis buffer (Qiagen Cat#79216) and total RNAs were isolated with the RNeasy Micro Kit with DNase treatment (Qiagen Cat#74004) or alternatively with the NucleoSpin RNA XS (Marcherey-Nagel Cat#740902). For qRT-PCR experiments, total RNAs were reverse-transcribed into cDNA using the Reverse Transcription High Capacity Master Mix (Applied Biosystems Cat#4368814). q-PCR was performed on an Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System (RRID:SCR_023455) using Power SYBR GREEN (Applied Biosystems Cat#4367659) with specific primers listed in Table S1. Data were analyzed on StepOne Software (RRID:SCR_014281).

Manual and automated multiplex immunofluorescences

CCOs were fixed in 4% paraformaldehyde 3–4 h at room temperature and conserved at 4°C in PBS with 0.2% azide. For 5μm slides, fixed CCOs were embedded in paraffin with Tissue-Tek (Sakura) and sliced with microtome (RM2125RT, Leica Microsystems), and were mounted on SuperFrost Plus (Epredia Cat#J1800AMNZ). After paraffin removal and citrate treatment, slices were blocked 1 h at

room temperature in PBS with 10% FCS and 5% BSA (Sigma Aldrich Cat#A7906). The slides were incubated overnight with primary antibodies at 4°C. After PBS washing, the slides were incubated with secondary antibodies (1/1000) at room temperature for 3 h then washed with PBS. Alternatively, 4-plex was performed by automated immunostainnings on a Roche Ventana BenchMark ULTRA IHC/ISH System (RRID:SCR_025506) according to the manufacturer's protocol. Primary antibodies were the same as above and OmniMap anti-Ms HRP and anti-Rb HRP (Roche Cat#5269652001 and Cat#5269679001) secondary antibodies were coupled to OPAL520 (AKOYA Biosciences Cat# FP1487001KT), OPAL570 (AKOYA Biosciences Cat#FP1488001KT), OPAL620 (AKOYA Biosciences Cat#FP1495001KT), OPAL650 (AKOYA Biosciences Cat#FP1496001KT) reagents with Tyramide Signal Amplification. Slides were mounted with Fluoromount-DAPI (Southern Biotechnologies Cat#0100-20). Images were captured on a Leica SP8 LIGHTNING confocal microscope (RRID:SCR_018169) with the following objectives: ×20/0.75 NA, and ×63/1.3 NA Oil. Images were analyzed on Leica Application Suite X (RRID:SCR_013673) or IMARIS (RRID:SCR_007370) softwares.

3D Immunofluorescence and CE3D clearing

Fixed CCOs were embedded in 2% low melting point agarose in PBS and sliced at 500μm with a Leica VT1200S vibrating microtome (RRID:SCR_020243). Slices were stained and cleared following the Ce3D protocol with modifications [28]. Briefly, slices were blocked 24h with Alternative Blocking Buffer (ABB) (PBS-TABS [Sigma Aldrich Cat#18912] with 0.3% Triton X-100 [Sigma Aldrich Cat#T8787], 1% BSA, 1X BD Perm/Wash Buffer [BD Cat#554723], alternatively 1% of Donkey Serum [Eurobio Scientific Cat#CAEMTN00-0U] was added for secondary antibodies). Slices were incubated 72h with primary antibodies in ABB at 37°C under 85 RPM. After a 12 h washing with Conventional Washing Buffer (CWB) (PBS-TABS with 0.3% Triton X-100, 0.5% 1-thioglycerol [Sigma Aldrich Cat#M1753], 0.1% Saponine [Sigma Aldrich Cat#S-4521]) at 37°C under 85 RPM, slices were incubated 72h with secondary antibodies (1/1000) and with 5μg/mL of DAPI (Sigma Aldrich Cat#D9542) in ABB at 37°C under 85 RPM. After a washing with CWB, slices were placed into 24 well plate glass bottom (Azenta Cat#4TI-0243), and were progressively cleared under orbital shaking (100 RPM) with 30%, 50%, 70%, 90% gradient of Ce3D solution in PBS, each for 1h30 then with 100% Ce3D solution overnight. Supernatant was eliminated and cover slips (Epredia Cat#CB00120RA120MNZ0) were placed. Images were acquired on a Spinning-Disk confocal microscope (Nikon, GATTACA) with a 1mm piezoelectric (Piezoconcept) with the following objectives: ×10/0.45 NA, ×20/0.75 NA, ×40/0.45 NA, and ×60/1.4 NA oil. Images were analyzed with IMARIS software (RRID:SCR_007370).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Each data point in figures represents a single organoid with at least two different batches per figure. All data points were plotted, and the median along with the interquartile range (1st and 3rd quartiles) are shown. One-way ANOVA was performed using Kruskal–Wallis test with Dunn's post hoc correction for multiple comparisons ($p < 0.05$: *; $p < 0.01$: **), or Mann–Whitney test for pairwise comparisons ($p < 0.05$: #; $p < 0.01$: ##), using GraphPad Prism 9 (RRID:SCR_002798). For flow cytometry analyses, each data point corresponds to a single CO/CCO. Few CCOs had a low CD45-positive cell content (less than 0.040%) and/or contained less than 20% P2RY12-positive cells within the $CD45^+$ population; they were therefore removed from the analyses except in Figure 5.