

Rôle de la voie de signalisation Interleukine-6 dans la radiorésistance des glioblastomes humains

Emmanuel Chautard

▶ **To cite this version:**

Emmanuel Chautard. Rôle de la voie de signalisation Interleukine-6 dans la radiorésistance des glioblastomes humains. Biologie cellulaire. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2009. Français. NNT : 2009CLFMM20 . tel-00726307

HAL Id: tel-00726307
https://theses.hal.science/tel-00726307

Submitted on 29 Aug 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL UNIVERSITÉ D'AUVERGNE

2009 N° : 20 DOC

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Thèse
Présentée à l'Université d'Auvergne

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 Juillet 1984)

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Soutenue le 11 Décembre 2009

CHAUTARD Emmanuel

Rôle de la voie de signalisation Interleukine-6 dans la radiorésistance des glioblastomes humains

---

Pr Laurent MOREL	Président
Pr Olivier CHINOT	Rapporteur
Dr Nicolas FORAY	Rapporteur
Dr Claudine VERMOT-DESROCHES	Examinateur
Pr Jean-Louis KEMENY	Examinateur
Pr Pierre VERRELLE	Directeur de Thèse

EA3846 : Thérapie Ciblée Combinatoire en Onco-Hématologie

Résumé

L'identification et la neutralisation des cibles moléculaires impliquées dans les mécanismes de radiorésistance des glioblastomes, approche développée au laboratoire, vise à diminuer le risque de récidive à l'intérieur du volume irradié et donc à allonger la survie des patients. Les travaux antérieurs du laboratoire ont démontré le rôle potentiel de l'interleukine-6 (IL-6) dans les mécanismes anti-apoptotiques impliqués dans la radiorésistance. Nous avons tout d'abord contribué à la validation de l'Interleukine-6 en tant que cible potentielle en rapportant l'association entre une amplification avec surexpression du gène *IL*-6 et un mauvais pronostic dans une série de 36 glioblastomes. La médiane de survie chute de 22 à 6 mois entre le groupe *IL-6* non amplifié et amplifié. Bien que nous n'ayons pas établi de corrélation entre la radiorésistance intrinsèque et le niveau d'expression et de production d'IL-6 *in vitro,* les données de la littérature nous ont incité à explorer le potentiel thérapeutique d'un blocage des voies PI3K/Akt et JAK/STAT3 situées en aval de l'IL-6. L'inhibition de la voie Akt, dont l'activation a été corrélée à la radiorésistance intrinsèque, permet de radiosensibiliser les glioblastomes *in vitro* alors que celle de la voie STAT3 s'est révélée sans impact sur la sensibilité à l'irradiation. En accord avec ces résultats, la deuxième approche, consistant en l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'IL-6 ou les sous unités qui composent son récepteur conduit à une inactivation de la voie STAT3 sans impact sur la radiorésistance. Au vu des données apportées par ce travail il semble que l'IL-6, malgré son statut de facteur de pronostique, et la voie STAT3 ne soient pas impliqués dans la radiorésistance intrinsèque. Notre hypothèse, en accord avec la littérature, est que l'activation aberrante de la voie STAT3 dans les gliomes, *via* la production d'IL-6, serait impliquée dans les modifications du micro-environnement telles que l'immunosuppression et l'angiogénèse. Pour tenter d'expliquer la différence de survie entre les deux groupes de patients de la série de 31 glioblastomes, une analyse comparative est en cours d'une part sur les profils génomiques et transcriptomiques par micro-arrays, et d'autre part sur l'état d'activation des voies de signalisation anti-apoptotiques Akt et STAT3 par immunohostochimie. Les données obtenues seront interprétées conjointement avec le niveau d'amplification/expression de l'IL-6 et la survie des patients. Les résultats présentés ici constituent un argumentaire pour l'utilisation d'inhibiteurs d'Akt en combinaison avec l'irradiation dans de futurs essais cliniques.

Abstract

Identification and neutralization of molecular targets invovled in human glioblastoma radioresistance mechanims is an approach developped in the laboratory to decrease recurrence inside irradiated volume and then to increase patient survival. Previous data published by the team have demonstrated a potential role of interleukin-6 (IL-6) in anti-apoptotic mechanism involved in radioresistance. Firstly, we contributed to IL-6 validation as a potential target by demonstrating association between amplification with overexpression of *IL-6* gene and a bad prognosis in 36 glioblastoma. Median survival dropped from 22 to 6 months between IL-6 non-amplified and amplified group. Although, we have found no correlation between intrinsic radioresistance and expression or IL-6 production *in vitro,* published data prompted us to explore therapeutic potential of blocking IL-6 downtream signaling pathways such as PI3K/Akt and JAK/STAT3. Akt pathway inhibition, whose activation has been correlated with intrinsic radioresistance, radiosensitizes glioblastoma *in vitro* whereas STAT3 inhibition did not affect ionizing radiation sensitivity. Accordingly, second approach using antibodies against IL-6 or its receptor subunits induced a decrease in STAT3 pathway activation without any effect on radioresistance. Results provided by this work suggest that IL-6, despite being a prognosis factor, and STAT3 pathway are not involved in intrinsic radioresistance. Our hypothesis is that in glioma, frequently activated STAT3 pathway is involved in micro-environnement alteration such as immunosuppression and angiogenesis as described in the litterature. To explain survival variation between the two groups of patients, comparative analyses are ongoing, on the one hand genomic and transcriptomic profiling by micro-arrays, and on the other hand studies of activation level of Akt and STAT3 anti-apoptotic pathways by immunohistochemmistry. The data will be interpreted together with the level of amplification/expression of *IL-6* and survival of patients. Results obtained here give us a rationale for using Akt inhibitor combined with irradiation in future clinical trials.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier très chaleureusement le Pr Pierre Verrelle de m'avoir accueilli au sein de son équipe, Merci pour son enthousiasme, sa patience, son écoute, et la confiance qu'il m'a accordé. Notre entente aussi bien scientifique qu'humaine a rendu ses premières années de recherche très agréables et propices à mon épanouissement. Merci également pour sa bonne humeur de tous les instants. Bref un Enorme Merci!

Je tiens à remercier le Pr Olivier Chinot et le Dr Nicolas Foray pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Merci au Pr Laurent Morel, pour son aide dans le travail présenté ici ; pour sa disponibilité, ses conseils, et pour toutes les discussions que nous avons pu avoir. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Merci enfin d'avoir bien voulu siéger au sein de mon jury.

Merci à Claudine Vermot-Desroches pour sa collaboration majeure au cours de cette thèse tant sur le plan intellectuel que matériel, et pour sa présence au sein de mon jury. Nos échanges sur les manips ou sur l'écriture des articles m'ont aidé à progresser dans mon projet.

Merci au Pr Jean Louis Kemeny pour sa contribution à ce travail et de sa présence dans mon jury de soutenance. Merci aussi d'avoir activement participé à l'évolution de la tumorothèque gliomes et pour tout le travail initié en immunohistochimie.

Merci à Andreï Tchirkov pour son écoute et son aide tout au long de ma thèse. Merci pour son aide dans l'analyse statistique des résultats et pour toutes les discussions que nous avons pu avoir.

Merci à Jacques Chassagne, avec qui j'ai aimé discuter au cours de ces années. Merci de m'avoir fait bénéficier de son expérience pour la mise au point des conditions en cytométrie.

Merci à Patrick Merle pour sa sympathie et toutes nos discussions. Notre parfaite entente n'est pas étrangère au bon déroulement dans l'organisation du labo. J'ai aimé travailler avec toi, et maintenant cela va bientôt être ton tour de faire un bilan de ton travail, bon courage !

Merci à Toufic Khalil pour les échanges que nous avons eus et pour son implication dans l'évolution de la tumorothèque gliomes.

Merci à Dominique Chadeyron pour sa sympathie et son efficacité. Son arrivée au sein de l'équipe m'a grandement soulagé dans la gestion des commandes.

Merci à Antoine Nigon pour sa disponibilité, sa sympathie, son enthousiasme…et surtout pour son humour « bon public ». Merci pour son aide dans le développement des modèles de xénogreffes, mais aussi pour toutes les manips de culture cellulaire. Merci à Florence Pétiard pour tout le travail effectué sur les anticorps, pour les fous rires que nous avons eus. Merci Cocotte!

Merci à Michel Lapeyre et à l'ensemble du personnel du Département de Radiothérapie pour leur contribution au bon déroulement de cette thèse. Merci à Véronique Dedieu pour la mise

au point des conditions d'irradiation des modèles de xénogreffes. Merci aux manips radio pour les créneaux « cellules ».

Merci au Pr Jean Paul Thiery pour son investissement majeur dans le projet d'étude comparative des deux populations en micro-arrays. Merci à Charles Decraene de m'avoir accueilli au sein du Département de Transfert de l'Institut Curie. Je remercie également la « Team » ABCD : Audrey Rapinat, Benoît Albaud, Cécile Reyes et David Gentien ; pour leur sympathie et leur contribution à ce travail. Merci aussi à Jean Philippe Meyniel pour sa gentillesse, pour m'avoir initié à l'analyse bio-informatique, et pour ses conseils avisés lors de la rédaction de ce manuscrit.

Merci à l'ensemble des personnes que j'ai côtoyé au sein du GReD et notamment à Claude Beaudoin et Michèle Manin pour tous leurs conseils et les échanges que nous avons eus. Merci aussi à Sylvère Baron pour son aide précieuse dans la mise au point des conditions de détection de pAkt en immunohistochimie. Merci à Jérôme Allemand, pour ses conseils et pour toutes nos discussions. Merci à Fabrice Saez pour sa sympathie et sa patience sur quelques dossiers épineux (si si, un jour mon cas sera résolu…). Merci à Jean-Paul Saru et Angélique DeHaze pour leur aide technique au cours de la dernière année de thèse.

Merci à Jean-Michel Chezal de nous avoir accueilli au sein de l'INSERM-UMR 484 pour débuter les études *in vivo*. Merci à Janine Papon et Maryse Rapp pour leur aide et leurs conseils. Merci à Fabien Rondepierre pour tous les échanges que nous avons eus et pour avoir fait vivre le « SAV de cardiologie » pendant les années de monitorat!

Merci à Qian, Julie, Gaëlle et Jennifer de m'avoir supporté le temps de quelques mois où j'espère leur avoir donné l'envie de continuer dans la voie de la recherche. Merci pour leurs éclats de rire et leurs « j'ai une question !».

Merci à toute la famille des Rouges et Noirs, continuez de porter haut les couleurs du SCB! Merci pour tous ces bons moments sur et en dehors du terrain, avec mention spéciale pour tous mes potes de la génération Reichel 2002-2003, ma plus belle année rugbystique!

Merci à mes amis de fac : Merci à Cyrille et Aurélie qui m'ont soutenu même du Kansas lors de la dernière ligne droite (j'espère bien venir te voir le Grand). Merci à Ludo et son paradis de Nature à Giat (oh mon polo!). Merci à vous, avec qui les soirées « t'en es où dans ta thèse » furent agrémentées par quelques petits repas pantagruéliques. Montrognon est à nous!

Merci à mes amis de Navarre : Merci à Ludo & Sophie (sunam ??? Laisse !), Jean-Baptiste & Karine (Bienvenue à la petite Jade !), pour tous les bons moments passés ensemble! Merci également à Fred, Aurel, et Juju, pour toutes ces virées sur les eaux Auvergnates en quête de lieux magiques et de poissons record ; Merci aussi pour toutes ces soirées mémorables!

Merci à toute ma famille et ma belle-famille pour leur soutien et leur présence à mes cotés tout au long de cette thèse. Un Merci tout particulier à mes parents pour m'avoir permis de réaliser toutes ces années d'études.

Enfin Merci à toi, Ameline, Merci pour ta relecture du manuscrit et pour ton soutien de tous les jours. Ensemble, on écrit autre chose…

Abréviations

53BP1 : p53 Binding Protein 1
ABH2 : Alkylation repair Homolog 2
ABH3 : Alkylation repair Homolog 3
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADP : Adenosine DiPhosphate
Ag : Antigène
AIF : Apoptosis-Inducing Factor
Akt/PKB : Protein Kinase B
ANT : Andenine Nucleotide Translocator
Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor-1
APC : Adenomatous Polyposis Coli
ARN : Acide RiboNucléique
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related
AUC : Area Under Curve
Bad : BCL2-associated agonist of cell death
Bak : BCL2-antagonist/killer 1
BAX : BCL2-Associated X protein
Bcl-2 : B-cell lymphoma protein 2
Bcl-w : BCL2-like 2
Bcl-XL : BCL2-like 1
BCNU : BisChloroethyl- Nitroso-Urea
BER : Base Excision Repair
BFL1 : BCL2-related protein A1
BHE : Barrière HématoEncéphalique
Bid : BH3 interacting domain death agonist
Bik : BCL2-interacting killer
Bim : Bcl-2 interacting mediator of cell death
BMF : Bcl2 Modifying Factor
BNIP3 : BCL2/adeNovirus E1B 19kDa Interacting Protein 3
BOK : BCL2-related Ovarian Killer
BRCA1 : BReast CAncer 1
BRCA2 : BReast CAncer 2
CAPP : Ceramide-Activated Protein Phosphatase
CARD : CAspase Recruitement Domain
CD : Cellule Dendritique
CDB : Cssure Double Brin
Cdc25A : Cell Division Cycle 25 homolog A
Cdc25C : Cell Division Cycle 25 homolog C
CDK1 : Cyclin-Dependent Kinase 1
CDK2 : Cyclin-Dependent Kinase 2
CDK4 : Cyclin-Dependent Kinase 4
CDKN2A : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CHK1 : Checkpoint Kinase 1
CHK2 : Checkpoint Kinase 2
CK : Creatine Kinase
CLC : Cardiotrophine-Like Cytokine
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNTF : Ciliary NeuroTrophic Factor
CPAg : Cellule Présentatrice de l'Antigène
CREB : cAMP Responsive Element Binding protein
CSB : Cassure Simple Brin
CT-1 : CardioTrophine-1
Cys : Cystéine
DAB : DiAminoBenzidine
dATP : deoxyAdenosine TriPhosphate
DD : Death Domain
DED : Dead Effector Domain
Diablo : Direct IAP binding protein with low pI
DISC : Death-Inducing Signaling Complex
DM : Double Minute
DNA-PKCS : DNA-activated Protein Kinase
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EndoG : Endonucléase G
ER : Estrogen Receptor
ERCC1 : Excision Repair Cross-Complementing complementation group 1
FADD : Fas-Associated Death Domain
FDG : Fluoro DeoxyGlucose
FGFβ : Fibroblast Growth Factor β
fkh : forkhead
Foxm1 : Forkhead Box m1
Gab1 : Grb-2 associated binder 1
GADD45 : Growth Arrest and DNA-Damage-inducible 45
GBM : Glioblastome
GDP : Guanosine DiPhosphate
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
GR : Glucocorticoid Receptor
Gr : Grossissement
Grb-2 : Growth factor receptor-bound protein 2
GRE : Glucocorticoid Response Element
GTP : Guanosine TriPhosphate
Gy : Grays

H2AX : H2A histone family, member X
HIF1α : Hypoxia Inducible Factor 1 alpha
HK : Hexokinase
hMLH1 : human mutL homolog 1
hPMS1 : human PostMeiotic Segregation increased 1
HR : Homologous Recombination
HRE : Hypoxia Response Element
HRK : harakiri, BCL2 interacting protein
HSP : Heat Shock Protein
hTERT : human TElomerase Reverse Rranscriptase
HTIC : HyperTension IntraCrânienne
HtrA2 : High temperature requirement A2
IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAD : Inhibitor of Caspase Activated DNAse
IFN : Interferon
IGF-1R : Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IGFBP-3 : Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3
IL-6 : Interleukine-6
ILK : Intergin Linked Kinase
IRF-1 : Interferon Regulatory Factor 1
IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique
IκB : Inhibitory kappa B protein
JAK : JAnus Kinase
JNKs : Jun N-terminal Kinases
KDa : Kilo Dalton
KSR : Kinase Suppressor of Ras
LCR : Liquide CéphaloRachidien
LIF : Leukemia Inhibitory Factor
LIFR : Leukemia Inhibitory Factor Receptor
LMDS : Locally Multiple Damage Site
LOH : Loss Of Heterozygosity
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
Mcl-1 : Myeloid cell leukemia 1
MDC1 : mediator of DNA-Damage Checkpoint 1
MGMT : O-6-MethylGuanine-DNA MethylTransferase
mLST8 : mTOR associated protein LST8
MMP9 : Matrix MetalloPoteinase 9
MRE11 : Meiotic REcombination 11
MSH : MutS Homolog
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
mTORC : mammalian Target Of Rapamycin Complex
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NBS1 : Nijmegen Breakage Syndrome 1
NER : Nucleotide Excision Repair
NF1 : NeuroFibromatose 1
NF2 : NeuroFibromatose 2
NF-IL-6 : Nuclear Factor of Interleukin 6
NFκB : Nuclear Factor of kappa B
NHEJ : Non-Homolgous End Joining
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OSM : Oncostatine M
OSMR : Oncostatine M Receptor
PAR : poly (ADP-Ribose)
PARP : poly (ADP-Ribose) Polymerase 1
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDEGF : Platelet Derived Endothelial Growth Factor
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PDGFRA : Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha
PDK1 : Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1
PERP : p53 apoptosis Effector Related to PMP22
PH : Pleckstrin Homology
PHLPP : PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatase
PI3K : PhosphatidylInositol 3-Kinase
PIAS : Protein Inhibitors of Activated STAT
PIG3 : p53-Induced Gene 3 protein
PIP2 : PhosphatIdylinositol 4,5 biPhosphate
PIP3 : PhosphatidylInositol 3,4,5 triPhosphate
PKCζ : Proteine Kinase Cζ
Pol : Polymérase
PP1 : PyroPhosphatase 1
PP2A : Protein Phosphatase 2A
PP2A : Protein Phosphatase 2A
PRAS40 : Proline-Rich Akt Substrate 40 kDa
PTEN : Phosphatase and tensin homolog, deleted on chromosome Ten
PTP : Pore de Transition de Perméabilité
PUMA : BCL2 binding component 3
Raptor : Regulatory associated protein of mTOR
RB : RetinoBlastoma
RBP-Jκ : Recombination signal Binding Protein for Ig kappa J
Rictor : Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RIP : Receptor Interacting Protein
RPA : Replication Protein A
Ser : Sérine
SHP-2 : Src-homology tyrosine phosphatase 2
SMAC : Second Mitochondria Derived Activator of Caspase

SNC : Système Nerveux Central
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SOCS : Suppressor of Cytokine Signaling
SOD : SuperOxyde Dismutase
SOS : Son Of Sevenless
SSA : Single Strand Annealing
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
TAM : Tumor Associated Macrophage
TBP : TATA box Binding Protein
TCR : T Cell Receptor
TEL : Transfert d'Energie Linéique
TEP : Tomographie par Emission de Positron
TFIIH : Transcription Factor IIH
TGF : Transforming Growth Factor
TGFα : Transforming Growth Factor alpha
TGFβ : Transforming Growth Factor beta
Thr : thréonine
TM : TransMembrane
TNFR1 : Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TNFα : Tumor Necrosis Factor alpha
TOPBP1 : TOPoisomerase II Binding Protein 1
TOPI : TOPoisomerase (DNA) I
TRADD : TNF Receptor-Associated Death Domain
TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TSC1 : Tuberous SClerosis 1
TSC2 : Tuberous SClerosis 2
Tyr : Tyrosine
VDAC : Voltage Dependent Anion Channel
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
XPA : Xeroderma Pigmentosum complementation group A
XPC : Xeroderma Pigmentosum complementation group C
XPF : Xeroderma Pigmentosum complementation group F
XPG : Xeroderma Pigmentosum complementation group G
XRCC1 : X-ray Repair Cross Complementing protein 1

SOMMAIRE

Introduction bibliographique 1
I La radioréponse cellulaire 2
1 Introduction 2
2 Généralités sur les radiations ionisantes 4
3 Actions des radiations ionisantes sur la cellule 6
3.1 Les différentes cibles de l'irradiation 6
3.1.1 Lipides et protéines cellulaires 8
3.1.2 L'ADN 8
3.2 Réponse de la cellule aux dommages de l'ADN 12
3.2.1 Signalisation des dommages de l'ADN 14
3.2.2 Mécanismes de réparation des lésions d'ADN 16
3.2.3 Effets sur le cycle cellulaire 22
3.3 Engagement vers les processus de mort cellulaire radio-induits 24
3.3.1 Mort cellulaire immédiate 26
3.3.2 Autophagie 26
3.3.3 Mort mitotique ou catastrophe mitotique 28
3.3.4 Mort apoptotique 28
A Les caspases 30
B Voie intrinsèque ou mitochondriale 32
C Voie extrinsèque, les récepteurs de mort cellulaire 36
D Voie des céramides, une voie intrinsèque et extrinsèque 38
E Mécanismes de résistance à l'apoptose 42
3.4 Radiosensibilité intrinsèque 44
II Les gliomes : aspects cliniques et biologiques 48
1 Histogenèse des cellules gliales 48
2 Histopathologie et classification des tumeurs gliales 48
2.1 Classification de l'OMS 50
2.2 Classification de Saint-Anne 52
2.3 Vers une classification moléculaire des gliomes 54
3 Epidémiologie 58
3.1 Incidence 58
3.2 Facteurs de risques 58

4 Physiopathologie des tumeurs cérébrales 62
4.1 Aspects cliniques 62
4.1.1 Mode de croissance tumorale 62
4.1.2 Conséquences physiopathologiques 62
4.2 Aspects biologiques 64
4.2.1 Cellules d'origine des gliomes 64
4.2.2 Voies de signalisation et croissance tumorale 66
4.2.3 Rôles des microvésicules 68
4.2.4 Immunosuppression locale 68
5 Diagnostic 70
6 Facteurs pronostiques 74
7 Traitements 74
7.1 Traitement symptomatique médical 74
7.2 Chirurgie 76
7.3 Chimiothérapie 76
7.4 Radiothérapie 78
7.5 Thérapies ciblées 80
III Facteurs tissulaires influençant la radioréponse des glioblastomes 82
1 Principes généraux 82
2 Hypoxie 82
3 Angiogénèse 86
4 Réparation des lésions induites et redistribution dans le cycle cellulaire 86
5 Repopulation et ré-oxygénation durant le traitement 88
6 Rôles de l'interleukine-6 dans la radiorésistance des glioblastomes 88
6.1 L'interleukine-6 88
6.1.1 Structure et régulation du gène *IL-6* 90
6.1.2 Le récepteur à l'interleukine-6 92
6.1.3 Signalisation intracellulaire induite par l'IL-6 94
6.2 La voie de survie interleukine-6 dans les gliomes 102
6.2.1 L'interleukine-6 dans les gliomes 102
6.2.2 L'activation des voies AKT et STAT3 dans les gliomes 104
Travaux Personnels 108
Objectif général de l'équipe 110

Article I : Interleukin-6 gene amplification and shortened survival in glioblastoma patients. 112
Article II : Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma. 124
Article III : *In vitro* tolerance of high grade human glioma cells to STAT3 inhibition. 174
Travaux en cours 216
Conclusion Générale et Perspectives 226
Autres Publications 234
Article IV : Low MCL-1 mRNA expression correlates with prolonged survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia 238
Article V : Strong correlation between VEGF and MCL-1 mRNA expression levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia 246
Références Bibliographiques 256

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Les spécificités comportementales de la cellule tumorale. 1
Figure 2. Accélérateur de particules utilisé pour la radiothérapie externe. 3
Figure 3. Distinction entre effets directs, quasi-directs et indirects des rayons gamma vis-à-vis de l'ADN. 5
Figure 4. Défenses cellulaires contre les espèces réactives de l'oxygène. 5
Figure 5. Dommages radio-induits de l'ADN. 7
Figure 6. Divers types d'altérations chromosomiques radio-induites. 9
Figure 7. Vision globale de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. 11
Figure 8. Cascades de signalisation mises en route après endommagement de l'ADN. 13
Figure 9. Réparation des mésappariements. 15
Figure 10. Réparation par excision de nucléotides (NER). 15
Figure 11. Réparation par excision de bases (BER). 17
Figure 12. Réparation des CDB par religation non homologue (NHEJ). 18
Figure 13. Rôles de la protéine PARP dans la réparation des cassures ADN simple et double brins. 19
Figure 14. Réparation des CDB par recombinaison homologue. 19
Figure 15. Mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire suite à la présence de dommages au niveau de l'ADN. 21
Tableau 1. Gènes impliqués dans l'apoptose transactivés par p53. 23
Figure 16. Rôle de PARP dans la mort cellulaire immédiate. 25
Figure 17. Evolution morphologique comparée des cellules subissant une mort cellulaire par apoptose ou par oncose (nécrose). 27
Figure 18. Vision globale des voies d'activation du signal apoptotique après irradiation. 29
Figure 19. Structure des caspases. 29
Figure 20. Structure des protéines de la famille Bcl-2. 31
Figure 21. Rôles de la mitochondrie dans la cascade apoptotique. 33
Tableau 2. Les différents récepteurs de mort cellulaire et leur ligand. 35
Figure 22. Cascades apoptotiques induites par les récepteurs de mort cellulaire. 35
Figure 23. Mécanismes de régulation des voies de récepteurs de mort cellulaire. 37
Figure 24. Modes d'action des céramides. 39
Figure 25. Courbe de survie clonogénique au rayonnement gamma de cellules humaines irradiées en dose unique. 43
Figure 26. Histogenèse des cellules gliales. 47

Figure 27. Organisation et morphologie des différentes cellules gliales. 47
Tableau 3. Classification des astrocytomes diffus selon l'OMS 2000. 49
Tableau 4. Classification des oligodendrogliomes et gliomes mixtes selon l'OMS 2000. 49
Tableau 5. *Grading* de Saint-Anne. 51
Tableau 6. Comparaison des classifications de Saint-Anne et de l'OMS 53
Tableau 7. Fréquence des altérations dans les gliomes 53
Figure 28. Altérations génétiques conduisant au développement des glioblastomes primaires et secondaires. 55
Figure 29. Répartition des tumeurs cérébrales selon le type histologique. 57
Tableau 8. Principaux syndromes familiaux prédisposant aux tumeurs gliales du système nerveux central (SNC). 59
Figure 30. Les cellules dendritiques dans l'immunosuppression locale. 67
Figure 31. Rôles des macrophages associés aux tumeurs (TAM). 69
Figure 32. Aspect en imagerie des tumeurs cérébrales. 71
Figure 33. Système d'immobilisation du patient pendant l'irradiation. 79
Tableau 9. Thérapies ciblées dans les glioblastomes. 79
Figure 34. L'hypoxie dans la radiorésistance tumorale. 81
Figure 35. Gènes cibles de HIF1α. 83
Figure 36. Structure du gène de l'interleukine-6 (*IL-6*). 89
Figure 37. Régulation transcriptionnelle du gène *IL-6*. 89
Figure 38. Cristallisation de l'Interleukine-6. 91
Figure 39. Organisation structurale des récepteurs de la famille des interleukines-6. 91
Figure 40. Voies de signalisation induites par la fixation de l'IL-6 sur son récepteur. 95
Figure 41. Résidus cibles de phosphorylation lors de l'activation de la protéine Akt. 97
Figure 42. Contrôle de l'activation de la voie Akt. 99
Figure 43. Cibles de la voie Akt. 99
Figure 44. Rôles de l'IL-6 dans la progression tumorale. 103
Figure 45. Préparation des ARN totaux pour la réalisation de puces transcriptomiques. 219
Figure 46. Préparation des ADN pour la réalisation de puces génomiques. 219
Figure 47. Profils génomiques des patients atteints de glioblastomes 221
Figure 48. Détection immunohistochimique de pSTAT3 Tyr 705. 223
Figure 49. Détection immunohistochimique de pAkt Ser 473. 223
Figure 50. Rôle de la voie IL-6 sur la cellule tumorale et son micro-environnement. 229
Tableau 10. Cibles moléculaires dans la radiosensibilisation des gliomes. 231

Introduction bibliographique

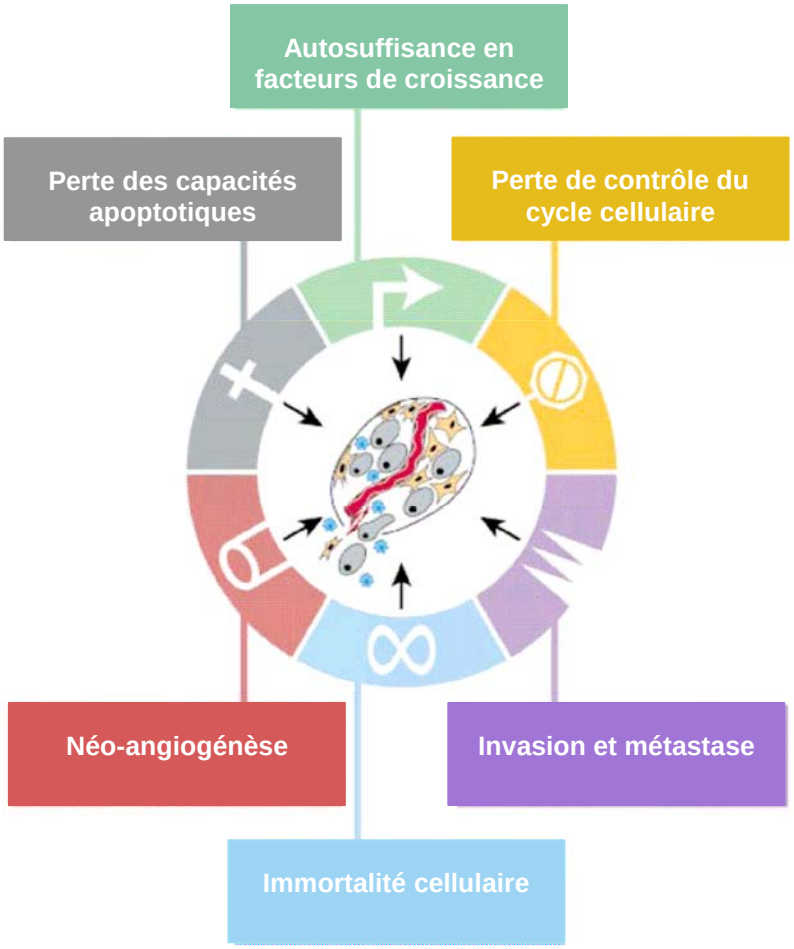


Figure 1. Les spécificités comportementales de la cellule tumorale.
D'après Hanahan and Weinberg 2000.

I La radioréponse cellulaire

1 Introduction

D'après Hanahan et Weinberg, une cellule cancéreuse est une cellule qui a acquis certaines spécificités bien précises suite notamment à une instabilité génétique et à une dérégulation de l'expression de ses gènes.

L'acquisition des six propriétés suivantes signe la transformation tumorale (Figure 1):

- indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération ; ceux-ci sont appelés couramment facteurs de croissance et transmettent l'information à la cellule cible après fixation sur un récepteur membranaire spécifique ;
- perte des capacités de contrôle négatif du cycle cellulaire, autorisant une prolifération accrue des cellules tumorales ;
- perte des capacités de mort cellulaire programmée (apoptose), qui permet à la cellule cancéreuse d'échapper à la destruction ;
- acquisition du phénotype d'immortalité des lignées cellulaires le plus souvent par reprise de l'activité télomérase qui empêche le raccourcissement télomérique à l'origine du vieillissement ;
- développement des capacités d'invasion et de métastase, caractérisé par une série d'évènements coordonnés mettant en jeu toutes sortes de propriétés comme la perte d'adhésion, la protéolyse, la motilité et l'adhésion sur de nouveaux supports ;
- mise en place d'une angiogénèse spécifique nécessaire à la diffusion des nutriments cellulaires et de l'oxygène au sein de la tumeur.

Les progrès dans la compréhension de ces différents mécanismes ont conduit à l'émergence de nouvelles stratégies anticancéreuses appelées les thérapies ciblées.

Le développement de ces nouvelles approches permet d'envisager de les combiner aux traitements actuels afin de tenter d'obtenir un effet synergique. La radiothérapie est une option thérapeutique très fréquente en cancérologie mais elle n'est malheureusement pas tout le temps curative. Un des moyens pour optimiser le traitement par radiations ionisantes réside dans la capacité à identifier une cible dont la neutralisation n'impacte que modérément le



Figure 2. Accélérateur de particules utilisé pour la radiothérapie externe.
(Site internet VARIAN© : www.varianinc.com)

comportement des cellules mais qui associée à la spécificité géographique de l'irradiation permet d'obtenir un effet antitumoral plus important.

2 Généralités sur les radiations ionisantes

Les radiations ionisantes sont des rayonnements capables de créer des ionisations dans la matière en arrachant des électrons aux atomes des molécules du milieu. Les rayonnements utilisés peuvent être des flux de particules chargées (électrons, protons) ou neutres (neutrons) ou bien des particules sans masse non chargées, les photons, qui sont des rayonnements électromagnétiques. L'effet biologique de l'irradiation résulte de la dose utilisée, du débit de dose, mais aussi de l'absorption d'énergie dans les structures cellulaires à l'intérieur desquelles l'énergie est distribuée de manière non uniforme. Pour apprécier cette distribution deux approches complémentaires existent : le transfert d'énergie linéique ou TEL, et la microdosimétrie. Pour un paramètre biologique donné, l'efficacité biologique relative (EBR) augmente avec le TEL jusqu'à une valeur maximum de 100keV.μm^{-1}.

En radiothérapie, la dose d'irradiation est la quantité de rayonnement introduit dans l'organisme de manière à obtenir un effet anticancéreux. La dose d'irradiation s'exprime en grays, 1 gray (1 Gy) correspond à une quantité d'énergie absorbée de 1 joule/kg La dose se répartit également différemment dans les tissus vivants selon le mode d'administration des radiations ionisantes. En radiothérapie externe, le rayonnement issu d'une source radioactive ou d'un accélérateur de particules (Figure 2) traverse la peau puis s'atténue progressivement dans les tissus pour atteindre la zone que l'on souhaite traiter. En curiethérapie, le rayonnement issu des sources radioactives placées près de ou dans la tumeur diffuse en s'atténuant rapidement.

La radiothérapie fractionnée est la modalité d'irradiation la plus pratiquée en radiothérapie externe. Le fractionnement de la dose est à l'origine de l'effet différentiel plus favorable aux tissus sains qu'à la tumeur. Il n'existe ainsi pas de véritable sélectivité des radiations ionisantes vis-à-vis des cellules tumorales par rapport aux cellules normales, mais ces dernières se défendent bien mieux contre l'irradiation que les cellules tumorales. La différence est assez subtile et ce sont les modalités de la radiothérapie qui vont élargir cet effet différentiel afin d'obtenir l'effet souhaité. D'abord, on n'irradie que le volume nécessaire (volume cible), et surtout l'irradiation (60 Gy) est fractionnée en un grand nombre de séances délivrant chacune une dose de l'ordre de 2 Gy. Ainsi de séance en séance s'accroît la différence recherchée entre les tissus sains et la tumeur permettant d'obtenir ainsi l'effet thérapeutique.

Effet direct

$$\mathbf{ADN} \xrightarrow{\gamma} \mathbf{ADN^{\cdot +}} + \mathbf{e^-}$$

Effet quasi-direct

$$H_2O \xrightarrow{\gamma} H_2O^{\cdot +} + e^-$$

$$\mathbf{H_2O^{\cdot +} + ADN} \longrightarrow \mathbf{ADN^{\cdot +} + H_2O}$$

Effet indirect

$$H_2O \xrightarrow{\gamma} H_2O^{\cdot +} + e^-$$

$$H_2O^{\cdot +} + H_2O \longrightarrow H_3O^+ \cdot OH$$

$$\mathbf{\cdot OH + ADN} \longrightarrow \mathbf{ADN^{\cdot +} + {}^-OH}$$

Figure 3. Distinction entre effets directs, quasi-directs et indirects des rayons gamma vis-à-vis de l'ADN.
D'après Gardès-Albert 2008.

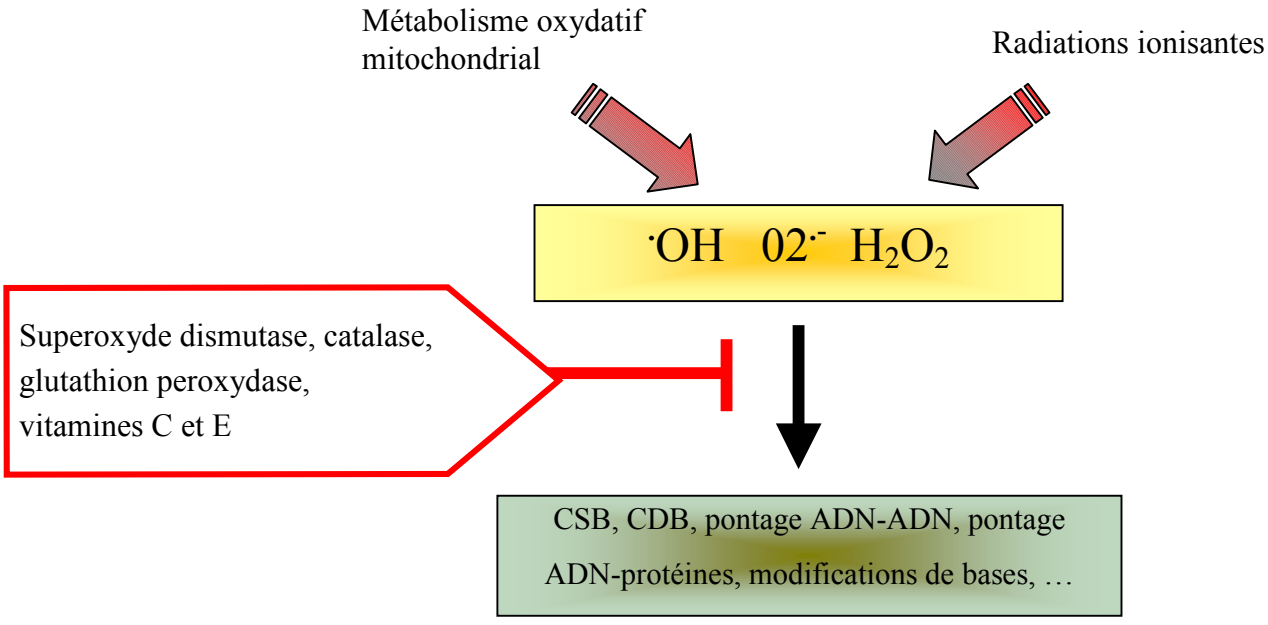


Figure 4. Défenses cellulaires contre les espèces réactives de l'oxygène.

Le phénomène primaire d'ionisation qui se produit en quelque 10^{-16} seconde, correspond à l'arrachement d'un électron au cortège électronique et conduit à l'apparition d'un radical libre qui est une espèce généralement très réactive, quelle que soit la cible moléculaire visée. Les radicaux ainsi formés (comme les cations $eau^{\cdot+}$, $ADN^{\cdot+}$, $protéines^{\cdot+}$) résultent de ces effets directs des rayonnements. On distingue également les effets dits « quasi-directs » qui découlent de l'interaction des radicaux $eau^{\cdot+}$ avec des biomolécules proches. Enfin, les effets indirects résultent de l'action des espèces réactives de l'oxygène provenant de la radiolyse de l'eau : radicaux hydroxyles ($^{\cdot}OH$), radicaux superoxydes ($O2^{\cdot-}$) et eau oxygénée (H_2O_2); dont les effets sont très délétères vis-à-vis des cibles biologiques et notamment au niveau de l'ADN (Figure 3, Gardès-Albert 2008).

L'ensemble des radicaux produits suite à l'irradiation s'ajoute aux radicaux libres qui sont également produits à un niveau plus faible par le métabolisme oxydatif se déroulant dans les mitochondries. L'ensemble des lésions induites par l'irradiation crée donc un stress oxydatif supplémentaire à celui préexistant dans la cellule.

Les cellules sont soumises en permanence à des stress endogènes et exogènes et l'ajout d'une agression telle que l'irradiation va déclencher en plus de lésions irréversibles, des mécanismes de défense (Figure 4). Les cellules eucaryotes sont notamment capables d'éliminer les espèces oxygénées réactives grâce à des enzymes de détoxication comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase ou à des piégeurs de radicaux libres comme le glutathion, la vitamine C et la vitamine E (Valko *et al.* 2006).

3 Actions des radiations ionisantes sur la cellule

3.1 Les différentes cibles de l'irradiation

Les espèces réactives de l'oxygène d'origine endogène ou produites suite à l'irradiation, peuvent endommager tous les composants de la cellule mais ce sont les lésions au niveau de l'ADN qui sont les plus délétères car elles peuvent induire des effets mutagènes et létaux.

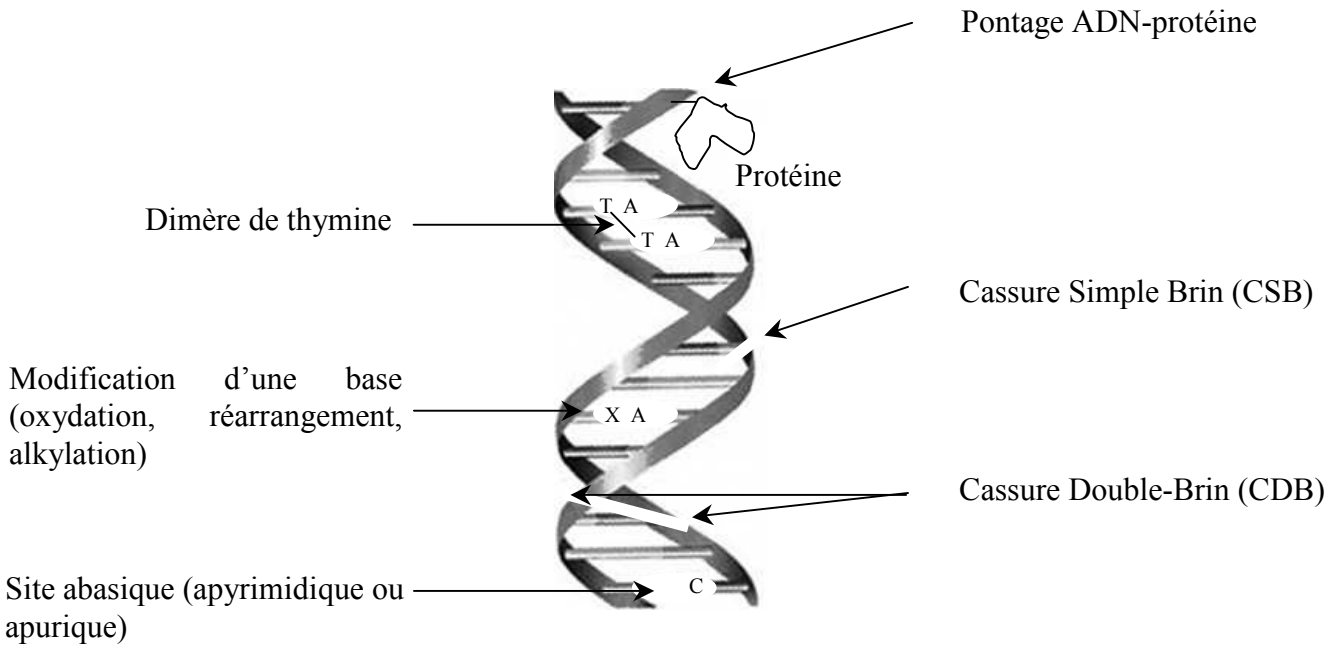


Figure 5. Dommages radio-induits de l'ADN.

3.1.1 Lipides et protéines cellulaires

Les radicaux hydroxyles peuvent réagir avec les acides gras poly-insaturés des phospholipides membranaires et des lipoprotéines, initiant ainsi des chaînes de peroxydation lipidique. Ce phénomène est à l'origine de la diminution de la fluidité membranaire (Albanese and Dainiak 2003).

De même, les acides aminés constitutifs des protéines sont très sensibles à l'attaque des radicaux hydroxyles. En outre, lorsqu'une protéine possède une fonction enzymatique, ces radicaux sont susceptibles d'inactiver, tout au moins en partie, son site actif. Ils sont non seulement à l'origine de phénomènes d'oxydation des acides aminés mais aussi de processus de fragmentation de la chaîne polypeptidique (en présence d'oxygène) ou au contraire de polymérisation (en absence d'oxygène) avec formation d'agrégats résultant de réactions biradicalaires intra et inter-protéiques (Gardès-Albert 2008).

L'irradiation peut induire une activation de certains récepteurs membranaires comme EGFR ou bien DR4 (récepteur de TRAIL, TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand, Guan *et al.* 2001; Schmidt-Ullrich *et al.* 1996). Le rayonnement conduit également à une augmentation de l'expression de ligands de récepteurs membranaires comme les interleukines 1,6 et 8 ; le TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α), le TGF-β, le FAS ligand (Guan *et al.* 2001; Verrelle and Bourhis 1997; Yang *et al.* 2006). Ces effets transcriptionnels sont la conséquence des cascades de signalisation induites par les récepteurs membranaires. L'activation d'EGFR conduit à l'activation de la voie de survie PI3K/Akt mais aussi à la libération de TGFα via l'activation de la voie des MAP kinases. Le TGFα présente une dualité d'action car il peut à la fois être à l'origine de l'activation d'enzymes impliquées dans la mort cellulaire (procaspase) mais aussi de l'élévation du facteur de transcription NFκB qui a, quant à lui, une action cytoprotectrice (Lehnert 2008a). Certaines enzymes comme les sphingomyélinases vont aussi être activées par les radiations ionisantes (Kolesnick and Fuks 2003).

3.1.2 L'ADN

Les altérations génomiques qui découlent de l'irradiation sont des modifications des bases (déamination, oxydation, et méthylation), des créations de sites abasiques, des cassures simple brin (CSB), des cassures double-brin (CDB) ainsi que des pontages ADN-ADN et ADN-protéines (Figure 5).

Par ailleurs un autre type de lésion radio-induite est constitué par les lésions multiples localisées ou LMDS (Locally Multiple Damage Site). Celles-ci sont composées de cassures de

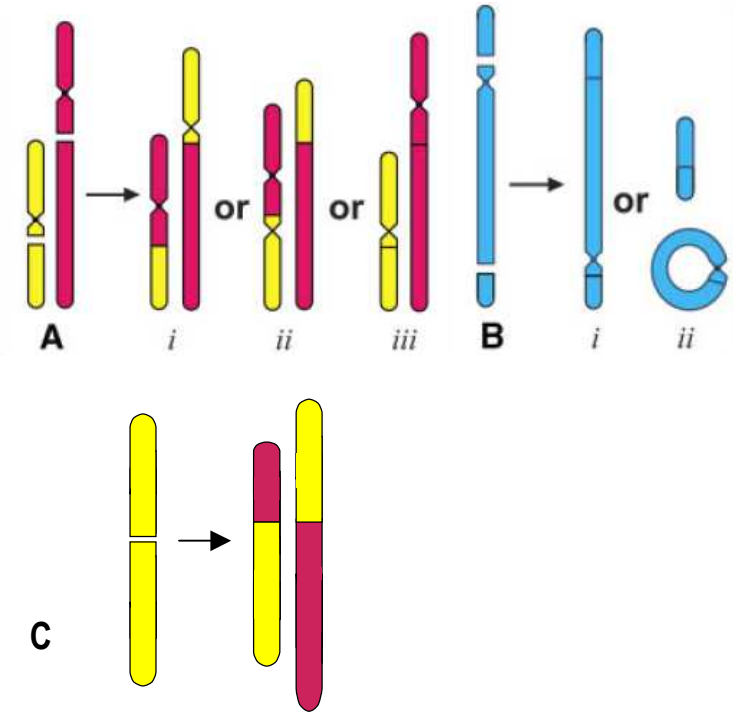


Figure 6. Divers types d'altérations chromosomiques radio-induites.
A, une seule cassure sur 2 chromosomes différents peut donner lieu à une translocation (i); à la formation d'un chromosome dicentrique (ii) ou bien à une réparation à l'identique (iii). *B*, Formation d'un anneau ou inversion consécutive à la présence de 2 cassures sur le même chromosome. *C*, Altération suite à une recombinaison homologue. D'après Hlatky *et al.* 2002.

l'ADN associées à des dommages oxydatifs de bases sur une distance de 10 à 20 nucléotides (Ward 1988). Ces lésions, en raison de leur complexité, sont difficiles à réparer et sont le plus souvent létales ou bien liées à des instabilités génétiques pouvant conduire à la cancérogenèse.

L'impact et les conséquences d'une irradiation par rayonnements ionisants sur la cellule eucaryote peuvent aussi être appréciés au niveau des chromosomes. On retrouve notamment des anomalies de structure, ou aberrations, et très rarement des modifications du nombre de chromosomes. Une aberration chromosomique survient lorsque au minimum deux fragments double-brin sans homologie de séquence provenant ou non du même chromosome se relient par une jonction fautive. Il existe deux théories principales concernant les mécanismes de formation de ces altérations chromosomiques.

Le premier modèle admet que suite à l'irradiation, les différentes cassures générées vont créer des fragments chromosomiques ou chromatidiens avec des extrémités libres. Ces extrémités sont capables d'interagir avec d'autres éléments du même type pour reformer des fragments identiques, ou bien différents des chromosomes originaux. Ces fragments vont provoquer l'apparition d'aberrations.

Le deuxième modèle, lui, soutient l'idée que les réarrangements se font entre des zones chromosomiques qui étaient déjà en contact physique préalablement à l'irradiation (Cornforth 2006).

On distingue les aberrations chromosomiques (touchant les 2 chromatides) qui peuvent être induites avant la phase S et qui seront dupliquées sur la deuxième chromatide, des aberrations mono-chromatidiennes qui peuvent survenir au cours de la phase G2.

Les remaniements observés après irradiation sont très divers. Une cassure de deux chromosomes peut être réparée soit à l'identique, soit après échanges interchromosomiques aboutir à des translocations ou à un chromosome possédant deux centromères c'est à dire dicentrique (Hlatky *et al.* 2002). Deux cassures sur le même chromosome peuvent donner lieu à la formation d'un anneau ou à une inversion (Figure 6A et B).

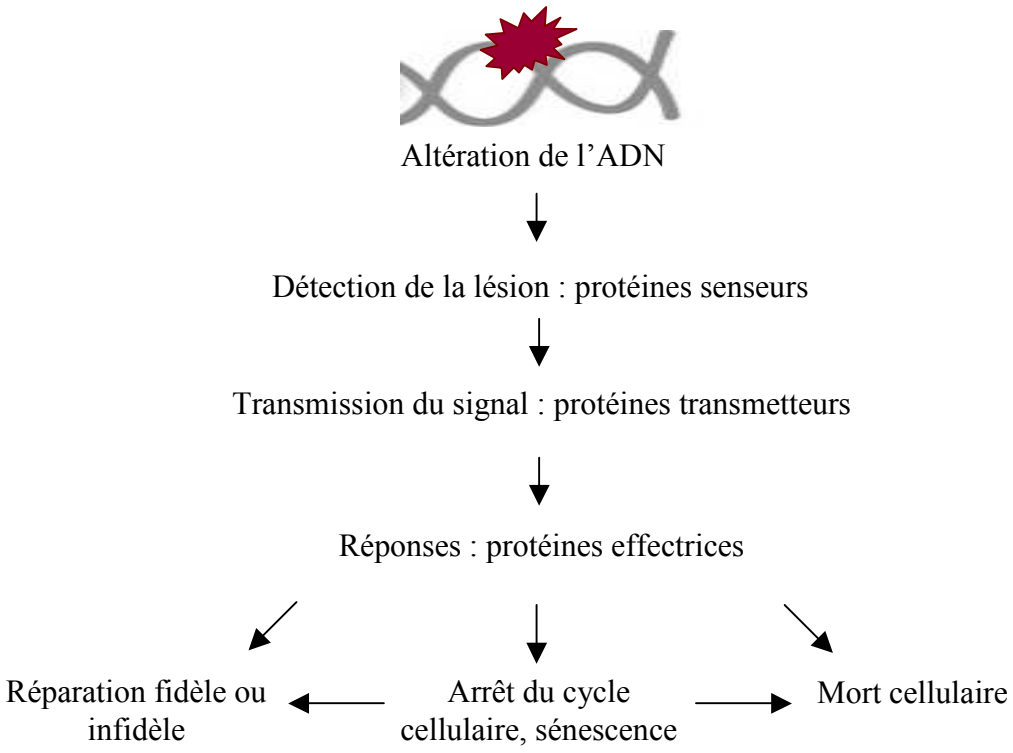


Figure 7. Vision globale de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN.

L'implication d'un nombre élevé de chromosomes ne comportant qu'une seule cassure conduit à une multiplicité de combinaisons possibles par translocation. Les échanges deviennent encore plus complexes si le nombre de cassures par chromosome augmente. Les altérations chromosomiques impliquant plus de deux chromosomes ne se forment pas au hasard mais dépendent de la proximité spatiale des chromosomes à l'intérieur du noyau (Cremer *et al.* 1996).

Un autre modèle propose qu'un fragment d'ADN puisse interagir avec un site-cible non-endommagé du génome par homologie de séquence et permette la création d'une altération par recombinaison homologue (Figure 6C)

En l'absence de toute agression exogène, l'ADN des cellules est altéré par les radicaux libres formés par le métabolisme oxydatif. Ce stress endogène crée par jour beaucoup plus de lésions qu'une dose d'irradiation de 1 Gy. Il s'agit principalement de lésions simples de type modifications de bases et de sucres puis CSB. En revanche, l'irradiation induit beaucoup plus de lésions complexes comme les CDB et les LMDS qui peuvent être plus concentrées dans l'espace et dans le temps en fonction de la dose d'irradiation.

3.2 Réponse de la cellule aux dommages de l'ADN

En réponse aux altérations de l'ADN, des cascades de signalisation vont être mises en jeu avec successivement l'intervention de protéines détectrices ou senseurs (Valko *et al.* 2006), de protéines de transduction du signal, et d'effecteurs terminaux permettant une réponse au stress détecté (Figure 7). Tout d'abord, les lésions de l'ADN et de la chromatine vont être reconnues par des protéines détectrices. L'information de l'existence de la lésion emprunte ensuite les voies de signalisation avec notamment l'intervention de protéines transmetteurs de la famille des phospho-inositidyl-3 kinases comme ATM, ATR et la DNA-PK_{CS}. La transduction de ce signal va aboutir à la mobilisation de protéines effectrices qui vont définir le devenir de la cellule entre un arrêt du cycle cellulaire, la réparation ou bien la mort cellulaire (Borges *et al.* 2008).

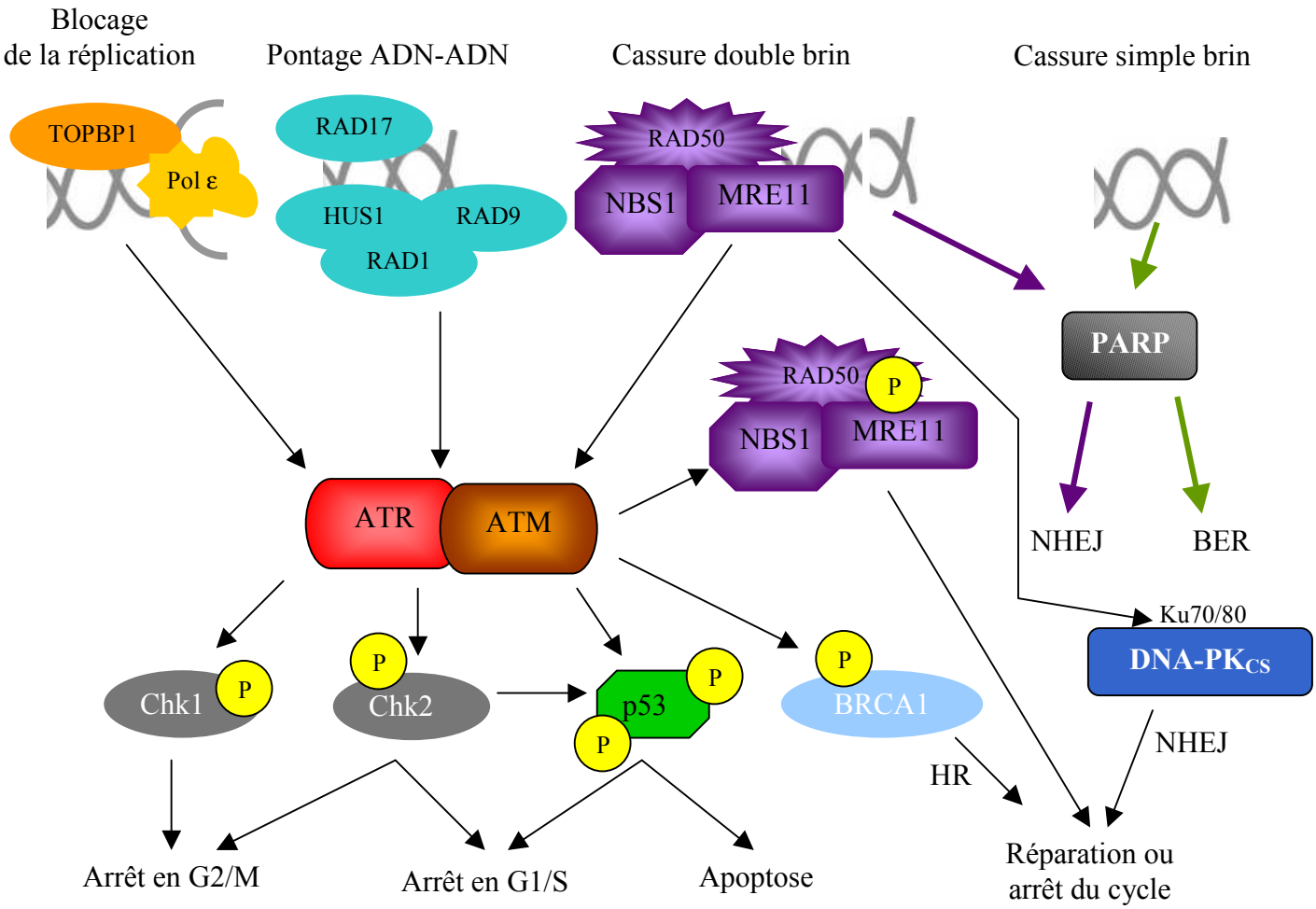


Figure 8. Cascades de signalisation mises en route après endommagement de l'ADN.
D'après Nyberg *et al.* 2002; Vidakovic *et al.* 2005.

3.2.1 Signalisation des dommages de l'ADN

La détection des dommages est assurée par diverses protéines en fonction de l'altération présente sur l'ADN. Le blocage de la fourche de réplication consécutive notamment à la présence de CSB est détecté par les protéines TOPBP1 et le complexe de la polymérase ε. RAD17 et le complexe RAD9/HUS1/RAD1 sont impliqués dans la reconnaissance des jonctions mono- et double-brin de l'ADN. Le complexe RAD50/NBS1/MRE11 assure quant à eux la détection des CDB. La protéine PARP permet d'identifier les cassures simple et double brin (Figure 8, Nyberg *et al.* 2002). Les CDB peuvent également être reconnues par les protéines Ku70/80.

La 1ère étape dans la transmission du signal est réalisée par les protéines ATM et ATR (ATM and RAD3-related). La protéine ATR est activée plutôt en cas de blocage de la réplication ou de lésions encombrantes comme des pontages intra-brins.

En revanche, la protéine ATM est activée en réponse aux CDB qui entraînent des modifications de la conformation de la chromatine et l'apparition de complexes de certaines protéines de détection des CDB comme MRE11. ATR peut aussi être activée consécutivement à l'activation d'ATM (Abraham 2003).

A l'étape suivante, les protéines ATM et ATR activent les protéines dites effectrices telles que des protéines de contrôle du cycle cellulaire comme Chk1 et Chk2 qui permettent un arrêt du cycle en G2/M et en G1/S, le suppresseur de tumeur p53, les protéines impliquées dans les mécanismes de réparation telles que BRCA1 et DNA-PK$_{CS}$ (Figure 8).

Les voies mises en jeu suite à la détection d'un dommage, notamment au niveau de l'ADN, aboutissent à la mise en œuvre de différents systèmes de réparation ou à la mort de la cellule par apoptose ou par mort mitotique. Un disfonctionnement de cette signalisation est la cause d'instabilités génétiques favorables au développement de cancers.

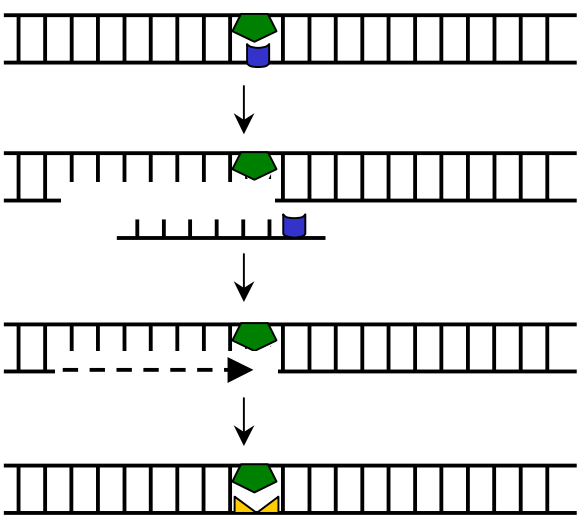


Figure 9. Réparation des mésappariements.
D'après Averbeck 2008.

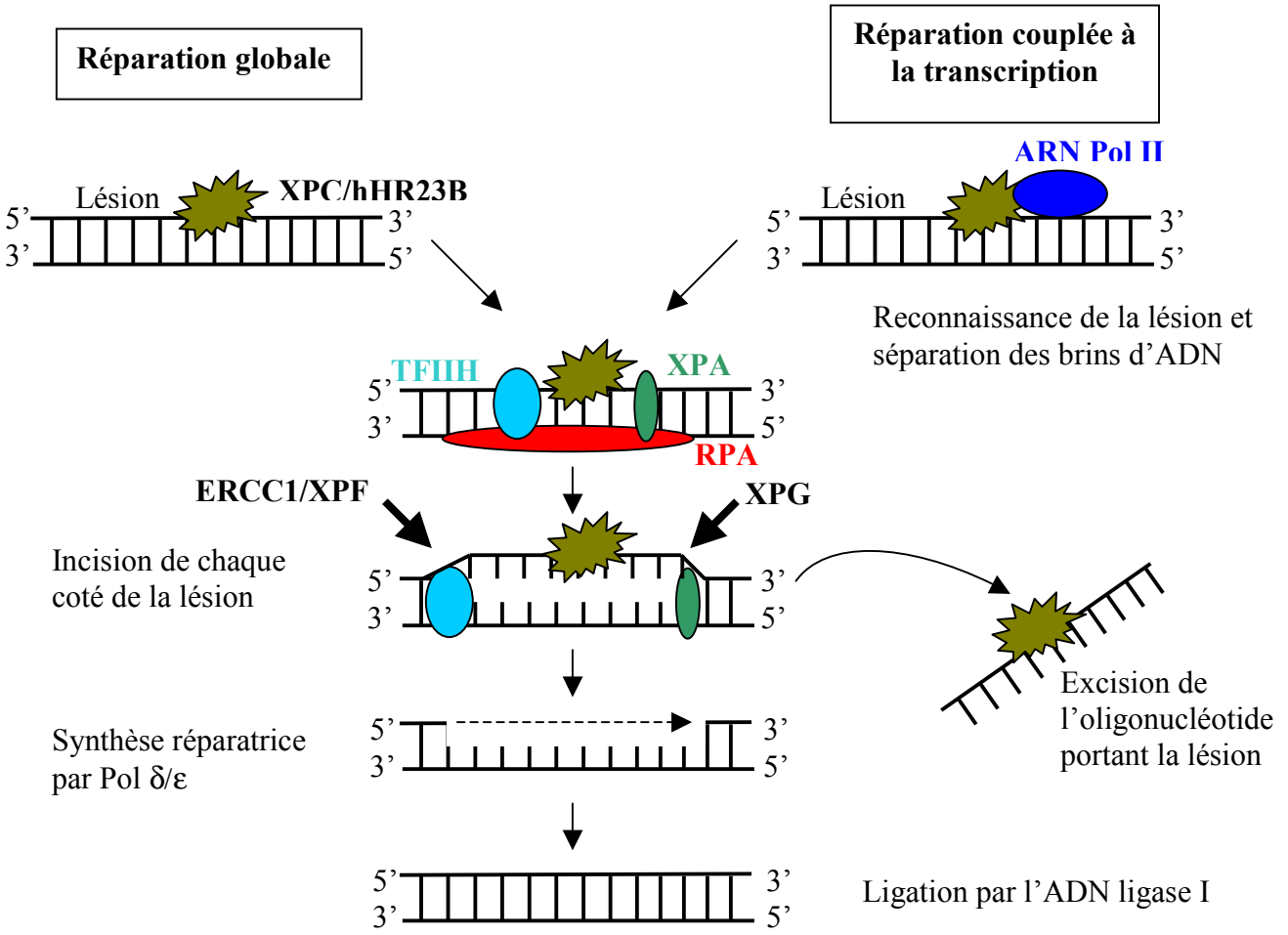


Figure 10. Réparation par excision de nucléotides (NER).
D'après Leibeling *et al.* 2006.

3.2.2 Mécanismes de réparation des lésions d'ADN

Après irradiation ionisante, la ligation de certains fragments d'ADN simple brin portant des groupements 3'-OH peut être effectuée directement par l'ADN ligase I. Les alkylations de bases radio-induites comme la présence d'un groupement méthyl placé en position O^6 de la guanine peuvent être enlevées par la MGMT (alkyltransférase).

L'oxydation et l'enlèvement du groupe méthyl sur la 1-méthyladénine ou la 3-méthylcytosine peuvent être effectués par les protéines ABH2 et ABH3 (Mishina *et al.* 2004).

La reconnaissance d'une base mésappariée est réalisée par les complexes hMUTSα (hMSH2/hMSH6) et hMUTSβ (hMSH2/hMSH3). Ces complexes reconnaissent notamment la présence de 8-oxoguanine induite par les radiations ionisantes. L'élimination de la base est assurée par le complexe hMLH1/hPMS1. La polymérase δ puis l'ADN ligase IV vont ensuite permettre de reconstituer l'intégrité de la structure de l'ADN (Figure 9).

Le système par excision de nucléotides (ou NER), répare les lésions qui génèrent de fortes distorsions de l'ADN mais aussi certaines lésions induites par les rayonnements ionisants comme les dommages oxydatifs tels que les glycols de thymine. Après détection de la lésion par le complexe XPC/hHR23B ou par le blocage de l'ARN polymérase II, la lésion est reconnue et délimitée par les protéines XPA, TFIIH et RPA, avant d'être excisée sur une longueur d'environ 24 à 32 nucléotides par les endonucléases ERCC1/XPF et XPG. Les polymérases δ et ε associées aux facteurs de réplication permettent de combler la brèche. La réparation est finalisée par l'ADN ligase I (Leibeling *et al.* 2006; Sakaguchi *et al.* 2009, Figure 10).

Avec le système d'excision de bases (ou BER), les CSBs sont reconnues par les deux protéines de la famille PARP qui s'y fixent sous la forme d'un dimère actif PARP-1/PARP-2. Ce complexe va ensuite s'auto-modifier pour pouvoir recruter les partenaires spécifiques comme XRCC1, PCNA et l'ADN ligase III par des motifs ADP-ribosyl (Malanga and Althaus 2005). Ces acteurs interagissent ensuite avec une polymérase δ/ε qui va réaliser une synthèse d'ADN réparatrice (Figure 11 et Figure 13, voie 1, Vidakovic *et al.* 2005).

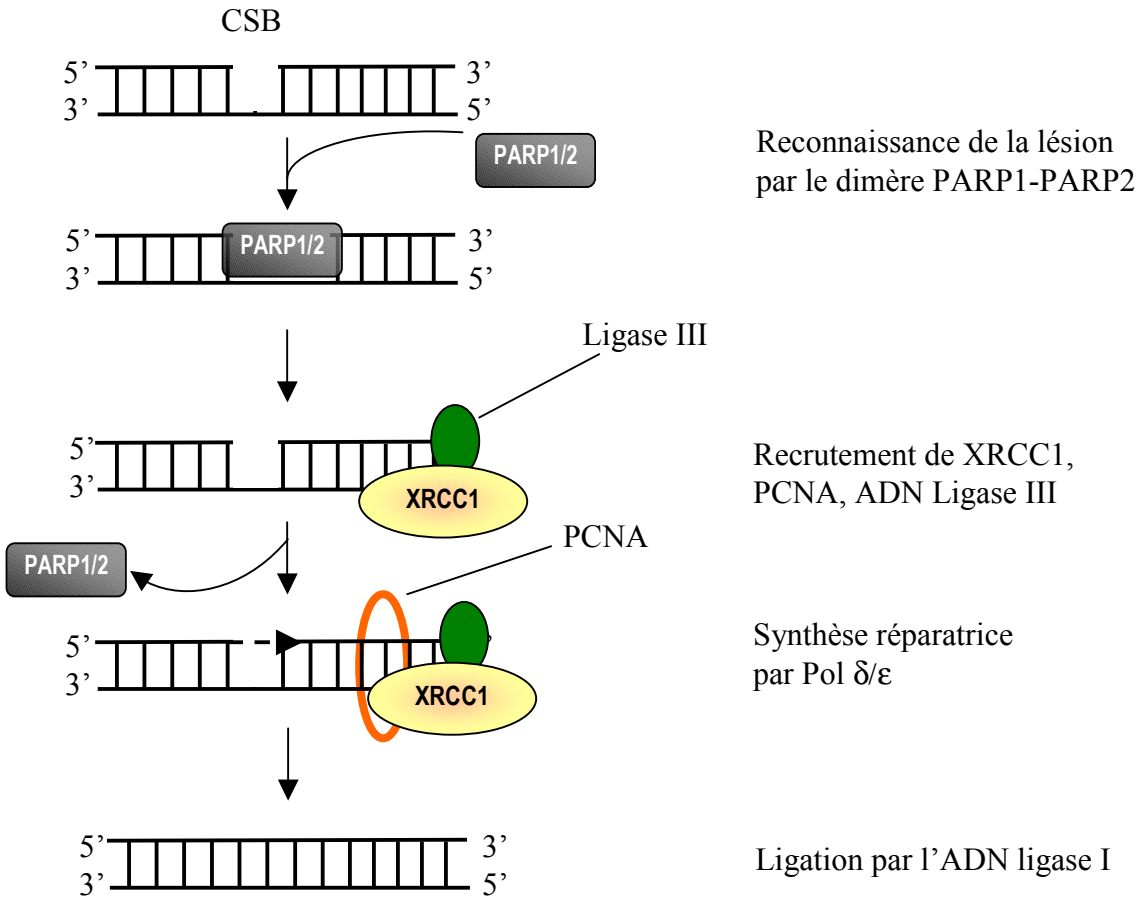
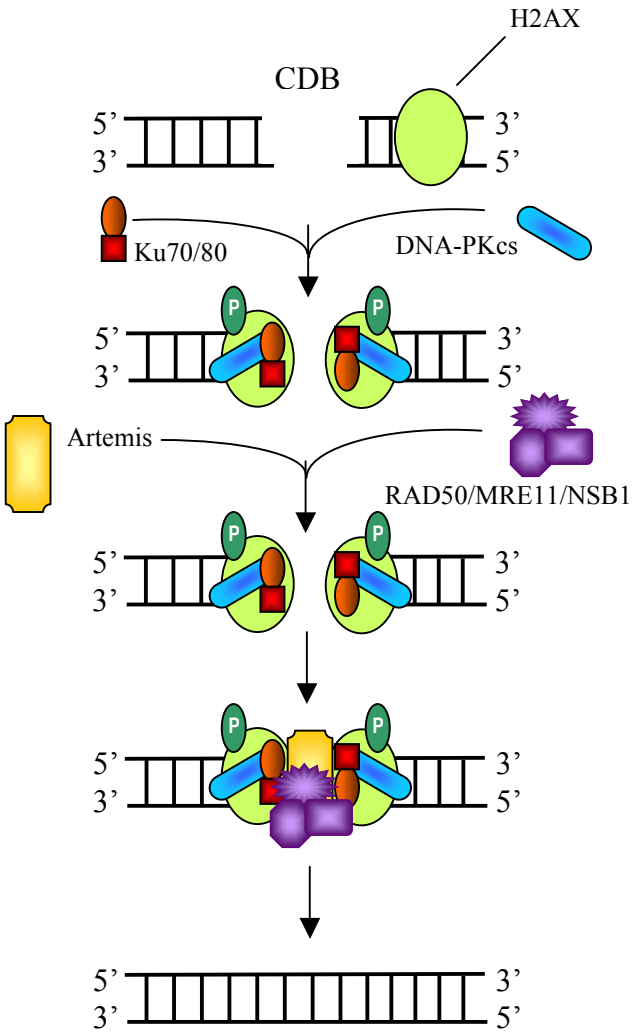


Figure 11. Réparation par excision de bases (BER).
D'après Averbeck 2008.



Présence de la protéine H2AX au sein du nucléosome

Phosphorylation d’H2AX par DNA-PK, ATM, ou ATR et reconnaissance de la lésion

Recrutement de plusieurs protéines dont 53BP1, MDC1, Artemis et le complexe RAD50/MRE11/NBS1

Façonnage par l’endonucléase Artemis et/ou le complexe RAD50/MRE11/NSB1

Recrutement de l’ADN ligase IV, de XRCC4, du facteur protéique Cerunnos, et d’une polymérase β-like

Ligation et reconstitution non fidèle de la continuité de l’ADN

Figure 12. Réparation des CDB par religation non homologue (NHEJ).
La DNA-PK est composée d’une sous-unité régulatrice (hétérodimère Ku70/80) et d’une sous-unité catalytique (DNA-PKcs). D’après Averbeck 2008; Bonner *et al.* 2008; Lehnert 2008c.

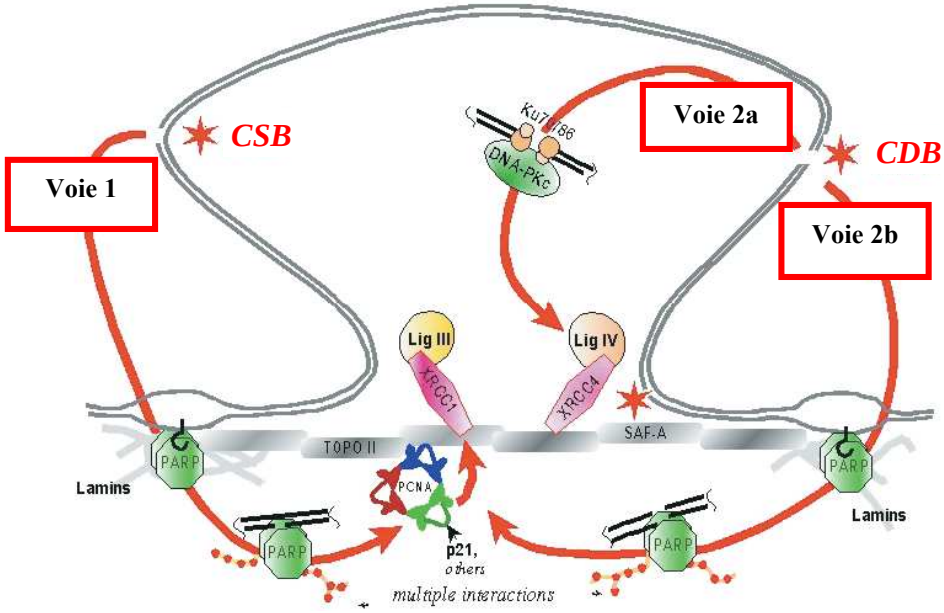


Figure 13. Rôles de la protéine PARP dans la réparation des cassures ADN simple et double brins.
La voie 1 est impliquée dans le système d'excision de base (BER), les voies 2a et 2b interviennent quant à elles dans la recombinaison non homologue (NHEJ). D'après Vidakovic *et al.* 2005.

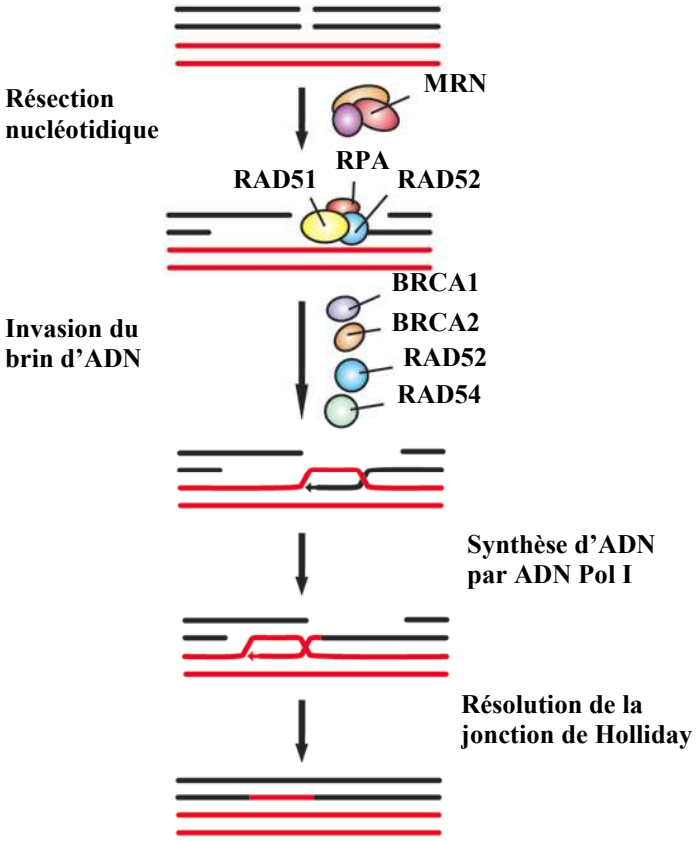


Figure 14. Réparation des CDB par recombinaison homologue.
D'après Weterings and Chen 2008.

Les cassures double-brin peuvent être prises en charge par trois mécanismes de réparation distincts : la recombinaison homologue, la suture des cassures simples brins (ou Single Strand Annealing, SSA) et la ligation non homologue (Non Homologous End-Joining, NHEJ). La recombinaison homologue utilise l'identité de séquences entre les chromatides sœurs afin de parvenir à une reconstruction fidèle de l'information génétique. Après signalisation par les protéines ATM et ATR, les CDB sont détectées par le complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1) qui après une résection nucléotidique va permettre le recrutement successif de RAD51/RAD52/RPA puis de BRCA1 et BRCA2 (Figure 14). La protéine RPA reconnaît la région simple brin et permet la polymérisation de RAD51. Les protéines RAD52 et RAD54 facilitent la recherche d'homologie et l'invasion du brin d'ADN. L'ADN polymérase I assure la re-synthèse du brin endommagé et la résolution de la jonction de Holliday. La reconstitution de l'ADN est assurée par l'ADN ligase I (Weterings and Chen 2008). Cette méthode de réparation est surtout utilisée en fin de phase S et durant la phase G_2 du cycle cellulaire.

En revanche les CDB induites en phase G1 sont réparées par la religation non homologue ou NHEJ. La reconnaissance des CDB est assurée par les protéines H2AX qui interagissent ensuite avec de nombreux partenaires parmi lesquels la DNA-PK. Les extrémités des fragments d'ADN sont ensuite façonnées par l'endonucléase Artémis et/ou le complexe RAD50/MRE11/NBS1. Le recrutement d'une polymérase β-like permet la synthèse non fidèle réparatrice d'ADN puis la protéine XRCC4 et l'ADN ligase IV interviennent ensuite pour assurer la reconstitution non homologue de l'ADN (Figure 12 et Figure 13 voie 2a, Vidakovic *et al.* 2005).

Il existe une voie alternative pour la réparation des CDB passant par la protéine PARP qui fait également intervenir les protéines XRCC1 et l'ADN ligase III (Figure 13, voie 2b, Audebert *et al.* 2006).

Lorsque la cassure se produit au niveau de séquences répétées, une réparation de CDB peut avoir lieu par un processus de soudure des fragments ou SSA qui ré-associe de manière infidèle les deux brins. Cela est sans conséquence car il s'agit en général de séquences non codantes (Jackson 2002).

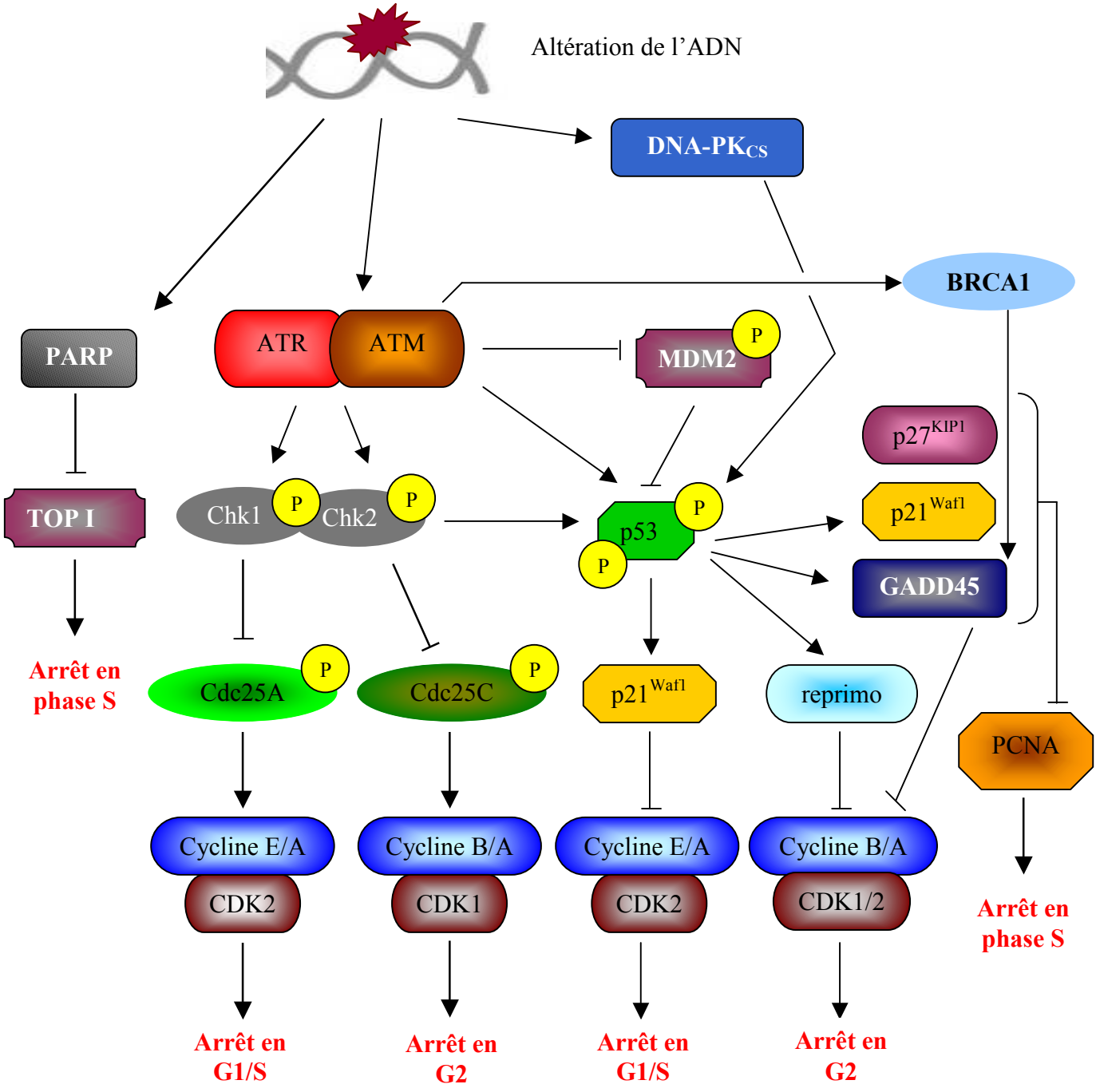


Figure 15. Mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire suite à la présence de dommages au niveau de l'ADN.
D'après Lan *et al.* 2004; Lukas *et al.* 2004.

3.2.3 Effets sur le cycle cellulaire

La sensibilité des cellules aux radiations ionisantes n'est pas linéaire au cours du cycle cellulaire. Ainsi, les cellules sont plus radiosensibles en phase G2 ou M qu'en phase S (Sinclair and Morton 1966; Terasima and Tolmach 1963). Il n'existe pas de variation de l'incidence des lésions d'ADN au cours du cycle cellulaire, la sensibilité est donc fonction de la réparation de ces lésions. Au cours de la phase S, la capacité élevée à réaliser la recombinaison homologue, facilite la réparation et permettrait donc une résistance accrue aux rayonnements.

L'exposition des cellules aux radiations ionisantes altère la progression du cycle cellulaire, phénomène aussi appelé redistribution radio-induite. On distingue une voie rapide et une voie lente pouvant conduire à un arrêt du cycle cellulaire. La première est rapide mais transitoire alors que la deuxième, dépendante de la stabilisation de la protéine p53, est lente mais plus soutenue (Lukas *et al.* 2004).

La voie rapide permettant un arrêt en G1/S fait suite à la dégradation de Cdc25A favorisée par sa phosphorylation par Chk1/Chk2. MDM2, phosphorylée par ATM, conduit à la mise en jeu de la voie lente par accumulation de la protéine p53. Cette dernière peut alors être activée par ATM et conduire à la transactivation de $p21^{Waf1}$. L'accumulation de $p21^{Waf1}$ conduit à l'inhibition des hétérodimères de CDK2 contrôlant la transition G1/S (Figure 15). Si l'arrêt en G1 devient irréversible, événement dépendant de l'accumulation de $p21^{WAF1}$, on parle alors de sénescence.

Les dommages de l'ADN conduisent à un arrêt en phase S après activation de PARP qui permet une inhibition immédiate mais transitoire de la topoisomérase I par ADP-ribosylation (Lan *et al.* 2004). A plus long terme, l'activation d'ATM stimule la transcription de $p21^{Waf1}$ via la stabilisation de p53 et celle de GADD45 via l'activation de l'oncogène BRCA1. GADD45 et dans une moindre mesure $p21^{Waf1}$ et $p27^{KIP1}$ sont capables d'inhiber PCNA et donc de conduire également à un arrêt en phase S.

Nom du gène	**Fonction du produit du gène**
Bax	Protéine du pore mitochondrial
PUMA	Protéine du pore mitochondrial
NOXA	Protéine du pore mitochondrial
p53AIP1	Dissipation du potentiel mitochondrial membranaire
Killer/DRS	Récepteur de mort cellulaire
PIDD	Protéine DD (death domain)
PERP	Protéine transmembranaire pro-apoptotique
Apaf-1	Activateur de la caspase 9
NF-κB	Médiateur de la signalisation de TNF
Fas/APO1	Récepteur de mort
PIG3	Contrôle de l'oxydation/réduction mitochondriale
PTEN	Réduit le niveau de la protéine anti-apoptotique PIP_3
Bcl-2	Répression de l'expression de p53
IGF-1R	Répression de l'expression de p53
IGFBP-3	Protéine séquestrant IGF-1

Tableau 1. Gènes impliqués dans l'apoptose transactivés par p53.
D'après Weinberg 2007b.

De la même manière, la phosphorylation de Cdc25C par Chk1/Chk2 favorise sa dégradation ce qui inhibe la transition G2/M. La voie de blocage en G2 dépendante de p53 passe par $p21^{Waf1}$ et GADD45. La protéine reprimo dont l'expression est sous le contrôle de p53 intervient aussi pour bloquer le passage vers la mitose.

p53 peut aussi être activée par DNA-PK_{CS} suite à la reconnaissance par cette dernière de lésion double brin en partenariat avec Ku70.

3.3 Engagement vers les processus de mort cellulaire radio-induits

La radiosensibilité des cellules humaines varie en fonction de nombreux paramètres parmi lesquels l'intégrité des gènes codants les systèmes de réparation, la qualité (TEL) du rayonnement, le débit de dose mais aussi le type cellulaire. On observe d'ailleurs une relation assez étroite entre la radiosensibilité d'un tissu sain et son homologue tumoral.

Les différents mécanismes de surveillance du cycle cellulaire permettent à la cellule de réparer les lésions induites pas les radiations ionisantes. Si la cellule retrouve l'intégrité de son information génétique, elle peut à nouveau entrer en cycle. Toutefois selon la quantité et le degré de sévérité des altérations (notamment des CDB et des LMDS) le devenir de la cellule peut être mis en jeu avec l'engagement vers un processus de mort cellulaire.

La proportion des différents modes de mort cellulaire est fonction de la dose de rayonnement et de l'expression de certains gènes. Elle dépend au premier chef de l'intégrité du gène suppresseur de tumeur p53 dont le rôle est décisif dans l'induction de l'apoptose radio-induite. Il n'a toutefois pas été démontré de relation entre la radiosensibilité intrinsèque et le statut de la protéine p53. La protéine p53 agit comme facteur de transcription pour activer l'expression de nombreux gènes afin de réguler l'engagement vers l'apoptose (Tableau 1).

Suite à l'irradiation la cellule peut être détruite par plusieurs mécanismes de mort cellulaire. On distingue la mort cellulaire immédiate, l'autophagie, la mort mitotique ou catastrophe mitotique et enfin le mécanisme de l'apoptose radio-induite.

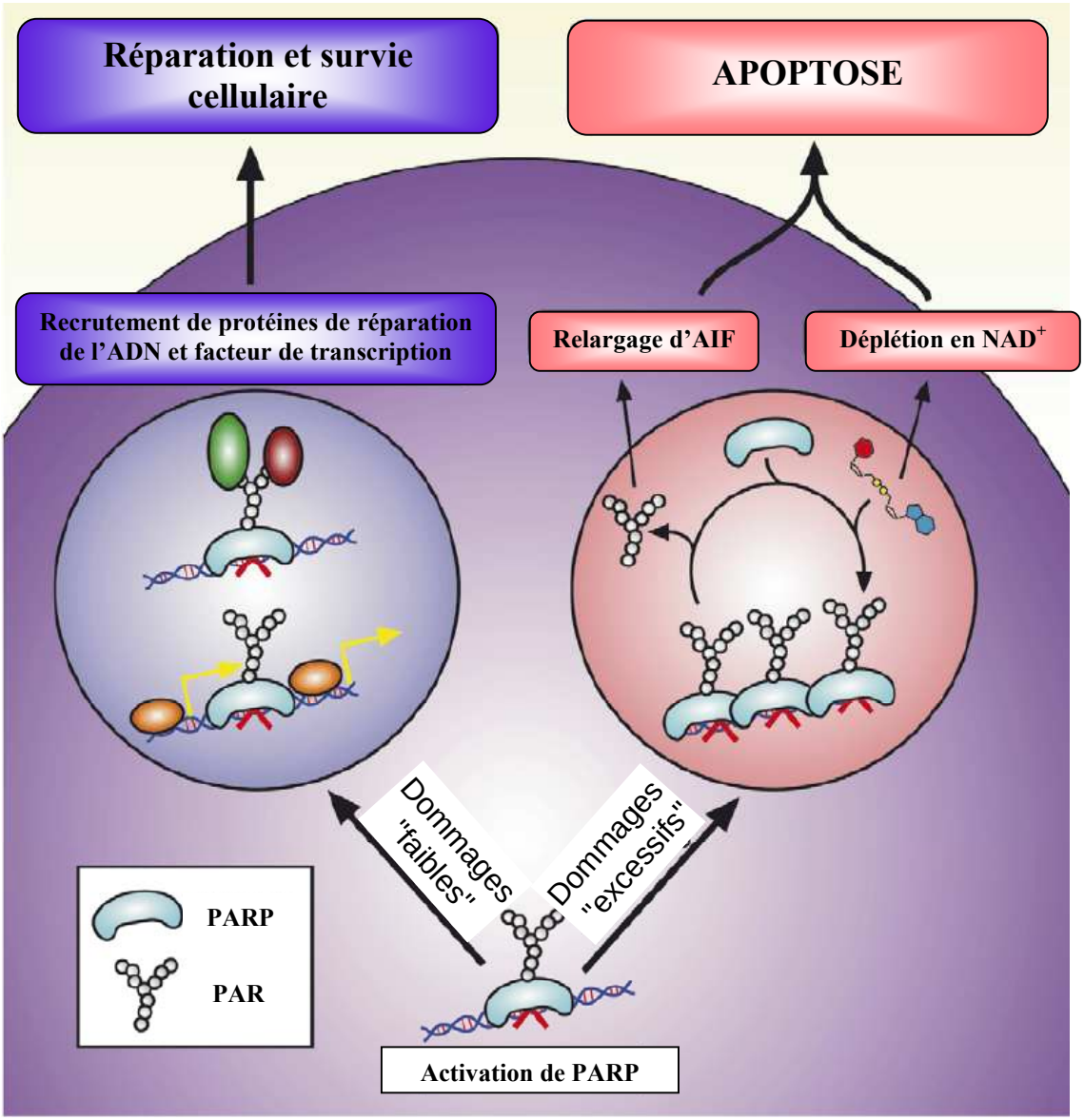


Figure 16. Rôle de PARP dans la mort cellulaire immédiate.
D'après Heeres and Hergenrother 2007.

3.3.1 Mort cellulaire immédiate

La mort cellulaire immédiate survient quelques minutes à quelques heures après une forte dose de rayonnement. Celle-ci met en jeu la protéine PARP1 impliquée dans la reconnaissance des cassures simple et double brin (cf Figure 13).

La protéine PARP1 utilise le réservoir de NAD^+ comme substrat afin de réaliser une ADP-ribosylation sur elle-même (auto-modification) ou bien sur d'autres protéines qui acceptent des groupements poly ADP-rybosyl (PAR). Dans le cas d'une suractivation de PARP1, il y a un phénomène d'épuisement du stock de NAD^+ par génération de nombreux groupements PAR qui s'accumulent dans le cytoplasme, sous forme libre ou bien associés à d'autres protéines (Figure 16, Heeres and Hergenrother 2007).

L'accumulation de PAR dans le cytoplasme conduit à la libération du facteur Apoptosis-Inducing Factor (AIF) par la mitochondrie. Ce facteur va alors migrer dans le noyau et induire une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN conduisant à une mort cellulaire rapide. Celle-ci se manifeste par la perte de l'intégrité membranaire, l'activation des lysosomes et une dégradation rapide des organites intracellulaires et en particulier des mitochondries. Les cellules présentent alors des caractères morphologiques semblables à ceux observés lors de l'oncose (nécrose).

3.3.2 Autophagie

L'autophagie est un processus caractérisé par l'involution des corps de Golgi, des polyribosomes, du réticulum endoplasmique et des mitochondries. Elle met en œuvre les cathepsines et requiert l'activation des lysosomes (Bursch *et al.* 2000). Comme pour l'apoptose, elle résulte d'un programme coordonné. A la différence de ce qui est observé dans l'apoptose, le cytosquelette est préservé jusqu'à des stades avancés pour permettre le bon déroulement du processus d'autophagie.

L'autophagie aurait une dualité de fonction puisque selon le contexte elle peut être cytotoxique ou bien cytoprotectrice (Kourtis and Tavernarakis 2009). Dans le premier cas, il s'agit d'un mécanisme de mort cellulaire après exposition à un stress oxydant important tel qu'il peut être observé après exposition aux radiations ionisantes, un peu comme dans le cas de la mort cellulaire immédiate. Dans certaines conditions de stress comme l'hypoxie, elle

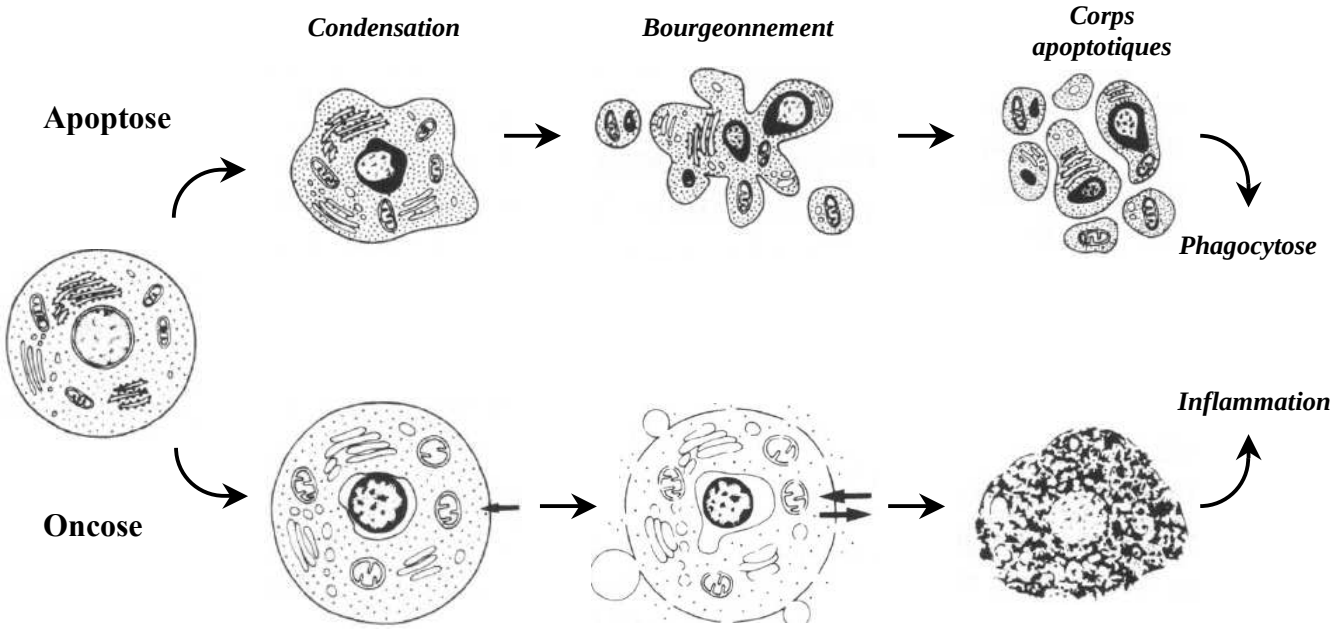


Figure 17. Evolution morphologique comparée des cellules subissant une mort cellulaire par apoptose ou par oncose (nécrose).
D'après Majno and Joris 1995.

serait favorable à la survie de la cellule en générant des métabolites permettant une adaptation.

3.3.3 Mort mitotique ou catastrophe mitotique

La mort mitotique ou catastrophe mitotique est associée à la présence de lésions chromosomiques importantes non réparées qui conduisent à la perte de la faculté d'accomplir avec succès une mitose symétrique. Elle survient quelques minutes à quelques heures après une forte dose de rayonnement. Une altération des protéines de régulation du checkpoint G2/M peut aussi conduire des cellules fortement endommagées à rentrer en mitose et donc à se diriger inévitablement vers un processus de mort mitotique. La mort mitotique a lieu pendant la métaphase pour éviter de donner naissance à des cellules filles anormales, avec par exemple un nombre asymétrique de chromosomes (aneuploïdie) ou une anisocytose (hétérogénéité de taille des cellules) et encore une anisocaryose (hétérogénéité au niveau du ratio noyau/cytoplasme). Le phénomène d'anisocaryose est à l'origine de l'observation de cellules « géantes ».

D'un point de vue mécanistique, les altérations chromosomiques et notamment les chromosomes acentriques aboutissent à la formation de micronoyaux. Les micronoyaux sont des éléments contenant de la chromatine et formés lorsque des fragments de chromosomes ou des chromosomes ne sont pas incorporés dans le noyau des cellules filles lors de la division. Leur perte par exocytose entraîne une perte de matériel génétique. Les étapes suivantes sont caractérisées par un gonflement cytoplasmique, une perméation membranaire et une lyse cytoplasmique avec destruction des organites intracellulaires. La mort mitotique s'achève par une dégradation de l'ADN (Vakifahmetoglu ***et al.*** 2008).

3.3.4 Mort apoptotique

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un phénomène physiologique fondamental permettant le contrôle du développement et le maintien de l'homéostasie tissulaire. L'apoptose constitue un mode actif de suicide cellulaire en réponse à des agressions telles que les radiations ionisantes afin d'éliminer les cellules anormales ou endommagées.

Les cellules apoptotiques sont caractérisées par une condensation périnucléaire de la chromatine suivie d'un bourgeonnement de la membrane plasmique associé à une vésiculisation du cytoplasme (Figure 17). Ces évènements sont suivis par une fragmentation caractéristique de l'ADN et par un morcellement cellulaire donnant lieu à la formation de

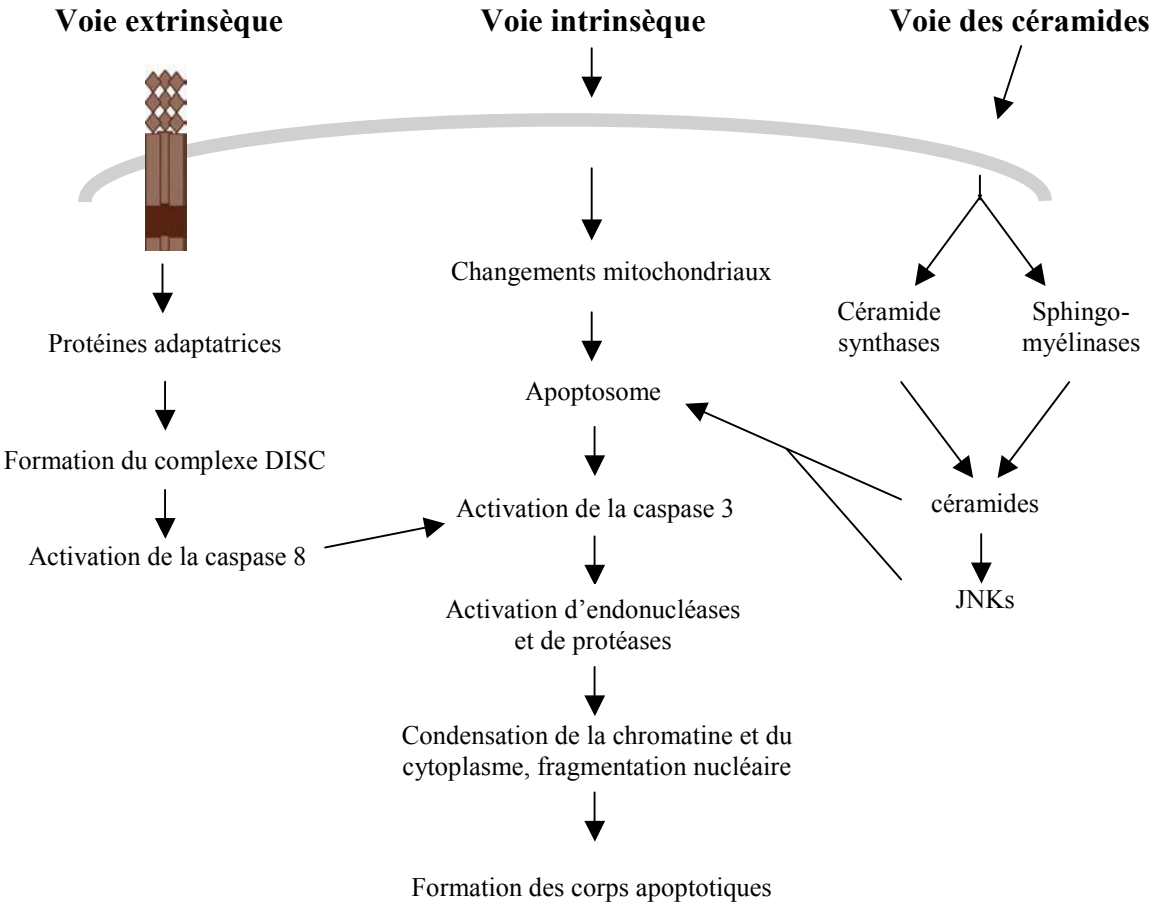


Figure 18. Vision globale des voies d'activation du signal apoptotique après irradiation.
D'après Elmore 2007; Lahiri and Futerman 2007.

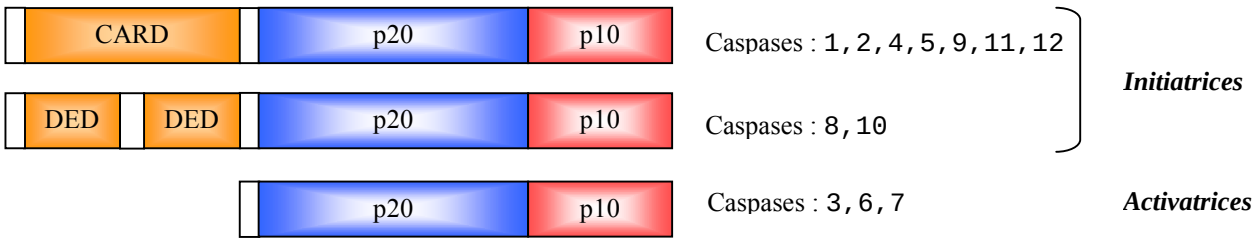


Figure 19. Structure des caspases.
CARD : CAspase Recruitment Domain, DED : Death Effector Domain, d'après Li and Yuan 2008.

corps apoptotiques. Les organites intracellulaires contenus dans les corps apoptotiques sont structurellement intacts. Dans les tissus, les cellules apoptotiques mourantes et les corps apoptotiques sont phagocytés par les cellules avoisinantes, ce qui explique l'absence de réaction inflammatoire (Baatout *et al.* 2002).

L'apoptose doit être distinguée de la nécrose (ou oncose) qui aboutit à l'éclatement de la cellule suivie d'une réaction inflammatoire locale. Dès lors, l'apoptose, processus par lequel la cellule dirige activement sa propre élimination, est en général opposée à l'oncose, phénomène dégénératif, passif, toujours accidentel et pathologique (Majno and Joris 1995)

Il existe plusieurs voies de signalisation conduisant à l'engagement de la cellule dans un processus apoptotique suite à l'irradiation (Figure 18). On distingue ainsi 3 voies principales que sont la voie des récepteurs de mort cellulaire ou voie extrinsèque, la voie mitochondriale ou voie intrinsèque et la voie des céramides. Elles aboutissent toutes à l'activation de la caspase-3 qui est le premier maillon commun de la voie des caspases effectrices. La caspase-3 peut alors transformer l'endonucléase ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNAse) inactive en une forme fonctionnelle, CAD. Cette dernière va induire la dégradation de l'ADN nucléaire ainsi que la condensation de la chromatine. La caspase-3 conduit aussi à une réorganisation du cytosquelette, suivie d'une désintégration de la cellule et de la formation de corps apoptotiques (Elmore 2007).

A Les caspases

Les caspases (cysteinyl aspartate-specific proteinases) font partie des acteurs majeurs de la cascade apoptotique et peuvent être classées en 2 groupes de protéines selon leur longueur et les domaines qu'elles comportent (Figure 19).

Cette classification distingue les caspases initiatrices ou activatrices (caspase-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12) et les caspases effectrices (caspase-3, -6, -7). Les caspases initiatrices possèdent un long pro-domaine comprenant un des deux domaines d'interactions protéines-protéines : le domaine DED (Death Effector Domain) ou le domaine CARD (CAspase Recruitment Domain) ; et sont impliquées dans l'interaction avec les protéines adaptatrices situées en amont. Les caspases effectrices, avec un pro-domaine plus court, sont rendues

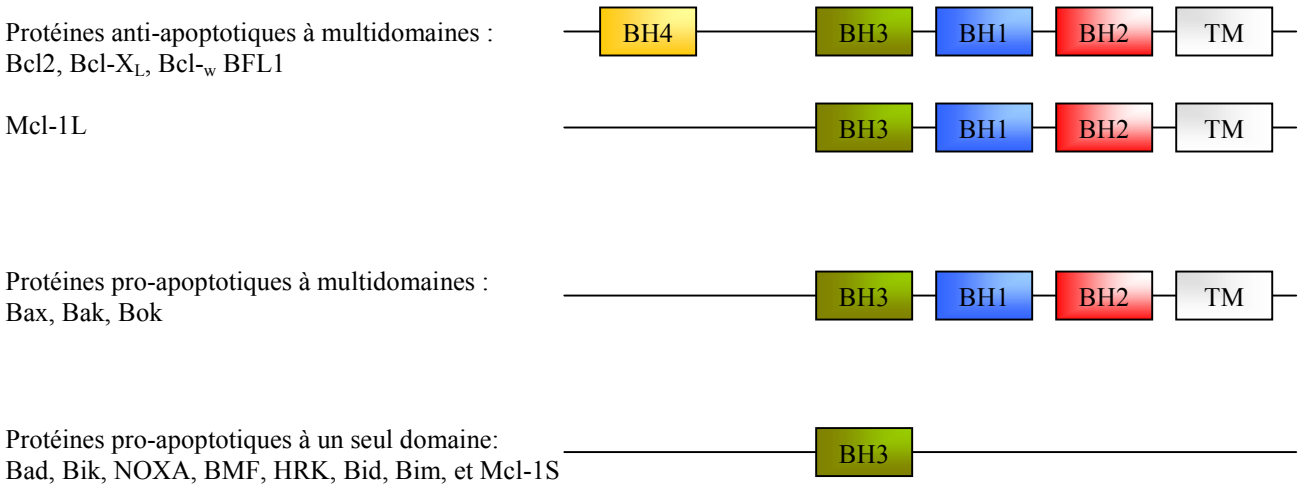


Figure 20. Structure des protéines de la famille Bcl-2.
TM : domaine transmembranaire ; BH_{1-4} : Domaines d'homologie à Bcl-2 ; d'après Letai 2008; Michels *et al.* 2005.

actives par les caspases initiatrices et vont assurer la transmission du signal apoptotique aux acteurs situés en aval en clivant une gamme large de substrats. L'activation des pro-caspases ou forme zymogène en caspases actives se fait par clivage protéolytique du pro-domaine. Elle conduit à la libération des deux sous-unités p10 et p20, cette dernière contenant le domaine catalytique (Li and Yuan 2008).

B Voie intrinsèque ou mitochondriale

La mitochondrie est un organite intracellulaire impliqué dans de nombreux processus biologiques dont la production d'énergie et le métabolisme, la modulation du statut redox, et le contrôle de l'homéostasie du Ca^{2+}. Elle est aussi impliquée dans le processus apoptotique soit en tant qu'acteur majeur dans la voie intrinsèque soit dans l'amplification d'un signal apoptotique issu d'autres voies.

La mise en jeu de la voie apoptotique intrinsèque dépend de la stabilisation de la protéine p53 par inhibition de sa dégradation par le protéasome et d'évènements localisés au niveau de la mitochondrie. Elle est reliée à la phosphorylation activatrice de p53 en réaction à la détection des altérations de l'ADN (cf Figure 15).

Le point de non-retour qui signe définitivement l'engagement de la mitochondrie dans la cascade apoptotique est constitué par la mise en place du pore de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Cet événement est sous le contrôle des protéines de la famille Bcl-2. Celle-ci contient 3 groupes distincts qui sont classés en fonction de leurs rôles et leur organisation structurale (Figure 20):

- les protéines anti-apoptotiques à multi-domaines,
- les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines,
- les protéines pro-apoptotiques contenant un seul domaine (BH3).

En réponse aux signaux initiateurs d'agressions cellulaires, les protéines de la famille Bcl-2 contenant uniquement un domaine BH3 vont être activées. Cette activation peut revêtir divers aspects comme l'augmentation de la transcription, la stabilisation de la protéine ou bien des modifications post-traductionnelles (Letai 2008).

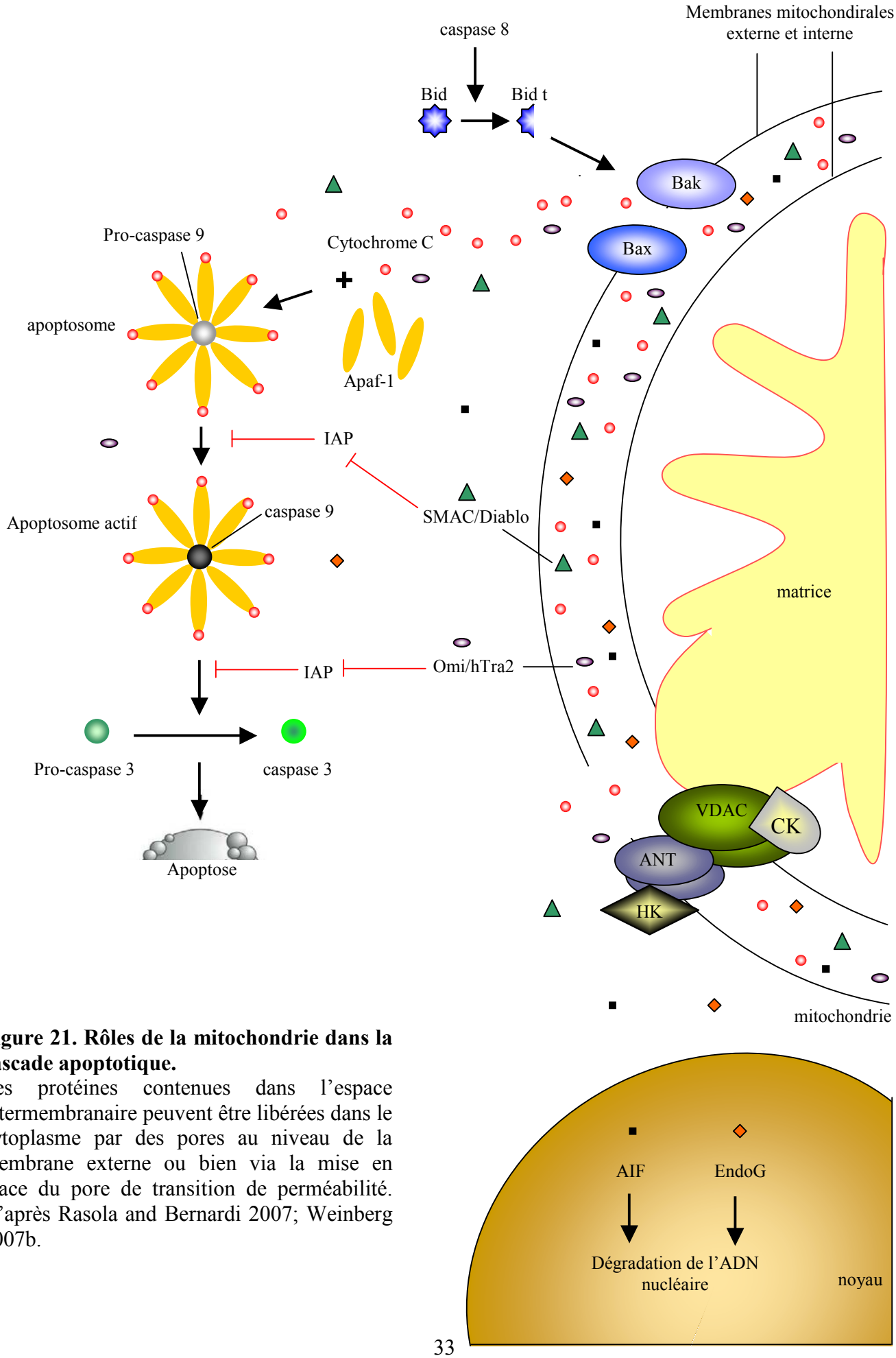


Figure 21. Rôles de la mitochondrie dans la cascade apoptotique.
Les protéines contenues dans l'espace intermembranaire peuvent être libérées dans le cytoplasme par des pores au niveau de la membrane externe ou bien via la mise en place du pore de transition de perméabilité. D'après Rasola and Bernardi 2007; Weinberg 2007b.

L'espace inter-mitochondrial est un véritable réservoir de nombreux acteurs clés dans le rôle de cet organite dans la mort cellulaire par apoptose. En effet, celui-ci contient du cytochrome C, le facteur AIF (Apoptosis-Induced Factor), l'endonucléase G, la protéine HtrA2/Omi (high temperature requirement A2), et la protéine SMAC/Diablo (Second Mitochondria Derived Activator of Caspase/Direct IAP binding protein with low pI). Puisque la taille de ces éléments est supérieure à la taille des pores de la membrane mitochondriale, la mise en jeux d'autres canaux est nécessaire pour leur libération dans le cytoplasme. Deux modèles, dont la mise en jeu est sous le contrôle des signaux apoptotiques amonts, sont actuellement admis (Figure 21). En plus des signaux apoptotiques dépendant de p53 (transcativation de BAX), le stress oxydant élevé induit par l'irradiation conduit à l'activation de certaines caspases qui vont signer l'engagement dans un processus apoptotique.

Le premier est une modification des pores présents au niveau de la membrane externe mitochondriale. La caspase 8 est capable de cliver la protéine Bid qui est un membre de la famille Bcl-2. En conséquence la protéine Bid tronquée (tBid) va migrer de sa localisation cytoplasmique vers la mitochondrie et favoriser l'association des protéines Bax et Bak sur les pores de la membrane externe mitochondriale. Il en résulte une ouverture plus importante de ces mêmes pores favorables à la libération des éléments de l'espace intermembranaire vers le cytoplasme. Le cytochrome c ainsi libéré forme l'apoptosome en s'associant avec les protéines Apaf-1, la pro-caspase 9 et du dATP. Ce dernier réalise l'activation de la caspase 9, qui va convertir les pro-caspases 3, 6 et 7 en caspases actives. Ces caspases effectrices vont alors déclencher les modifications intracellulaires conduisant à l'apoptose.

L'endonucléase G et le facteur AIF, qui utilisent le même canal pour être libérer dans le cytoplasme, vont se diriger vers le noyau pour induire la dégradation de l'ADN nucléaire et la condensation de la chromatine. Le mécanisme d'action du facteur AIF est assez mal caractérisé car celui-ci ne contient pas d'activité nucléase intrinsèque (van Loo *et al.* 2002). Les protéines HtrA2/Omi et SMAC/Diablo participent à la régulation de l'apoptose en inhibant l'action des protéines inhibitrices de la famille des IAPs (Inhibtors of Apoptosis Protein). Les IAPs empêchent notamment la formation d'un apoptosome actif et la conversion de la pro-caspase 3.

Le pore de transition de perméabilité ou PTP est à la base du deuxième modèle du relargage des protéines de l'espace intermembranaire vers le cytoplasme. Si son existence est bien reconnue, sa composition protéique exacte est encore très discutée. Il serait constitué à la

Noms du récepteur	Noms du ligand
FAS/APO-1/CD95	FasL/CD95L
TNFR1	TNF- α
DR3/APO-3/SWL-1/TRAMP	APO3L
DR4/TRAIL-R1	APO2L/TRAIL
DR5/TRAIL-R2/KILLER	APO2L/TRAIL

Tableau 2. Les différents récepteurs de mort cellulaire et leur ligand.
D'après Weinberg 2007b.

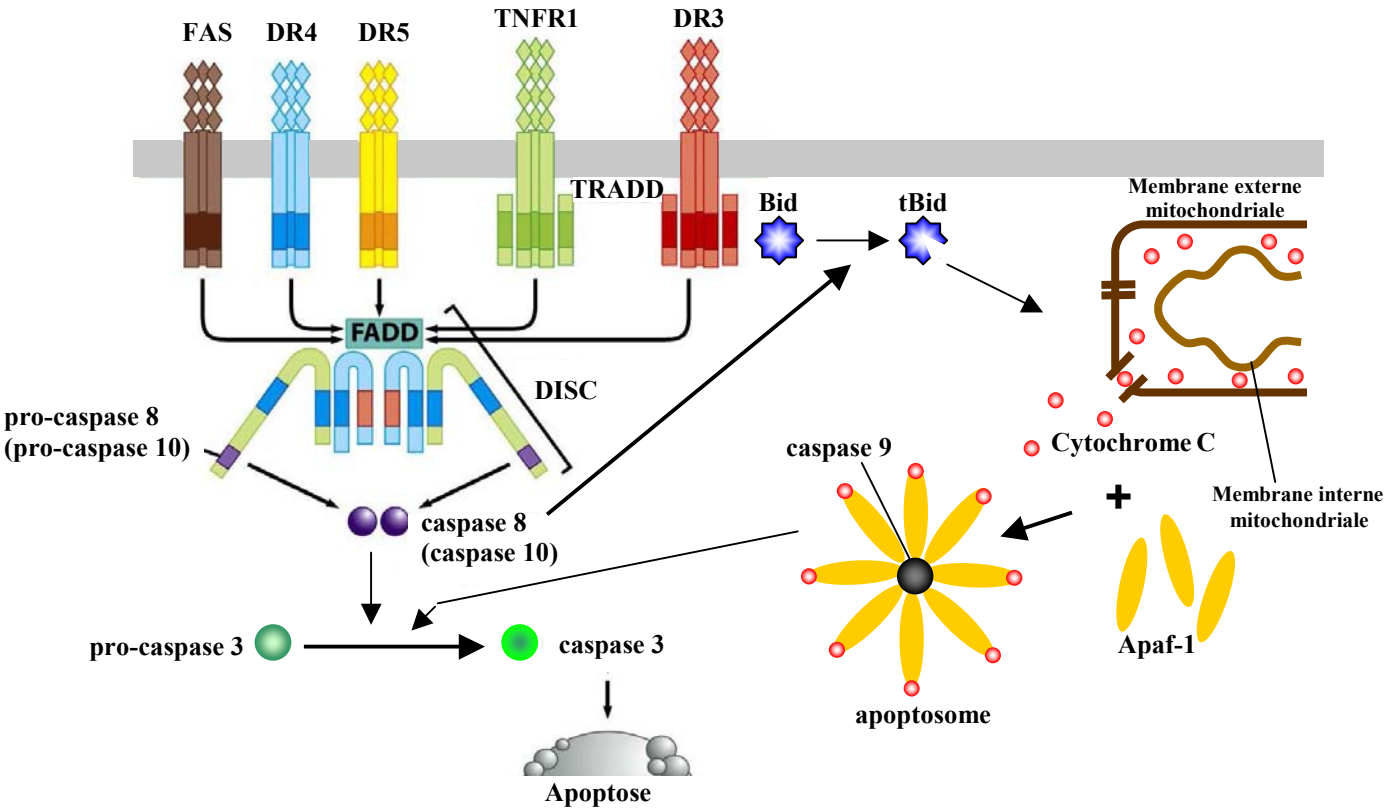


Figure 22. Cascades apoptotiques induites par les récepteurs de mort cellulaire.
D'après Weinberg 2007b.

fois de protéines associées à la membrane interne : l'ANT (Adenine Nucléotide Translocator), la Créatine Kinase (CK) et le complexe I de la chaîne respiratoire ; à la matrice : la cylophiline D ; et d'autres à la membrane externe mitochondriale : Voltage Dependent Anion Channel (VDAC) et Hexokinase (HK) (Rasola and Bernardi 2007).

La mise en place du PTP conduit à une augmentation de la perméabilité de la membrane interne aux composés osmotiques d'un poids inférieur à 1500 Da. Ceci a pour conséquence la dissipation du gradient de potentiel transmembranaire (delta psi M), et une entrée d'eau massive dans la matrice. L'appel d'eau est généré par la présence dans la matrice de protéines de poids moléculaire supérieures à 1500Da qui ne peuvent pas diffuser. Ce mécanisme de gonflement conduit à une rupture de la membrane externe qui possède une surface plus faible que la membrane interne permettant la libération des protéines contenues dans l'espace intermembranaire vers le cytoplasme (Green and Kroemer 2004). Le PTP est régulé par certains membres de la famille Bcl-2. Les protéines Bax, Bak, Bid et Noxa sont favorables au PTP alors que Bcl-2 et Bcl-X_L (Rasola and Bernardi 2007) s'opposent à sa mise en place.

C Voie extrinsèque, les récepteurs de mort cellulaire

Chez les mammifères l'engagement dans le processus d'apoptose peut se faire suite à l'activation des récepteurs de mort cellulaire. Les différents couples ligand-récepteur sont présentés dans le Tableau 2. Parmi les 5 couples ligand-récepteur, ce sont majoritairement le TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) et Fas qui sont impliqués dans l'apoptose radio-induite (Guan *et al.* 2001; Muller and Meineke 2007; Yang *et al.* 2006).

L'interaction des couples ligand-récepteur entraîne le recrutement de protéines adaptatrices et notamment TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain) par les ligands DR3 et TNFR1, puis FADD (Fas-Associated Death Domain) par l'ensemble des ligands, ainsi que la protéine RIP (Receptor Interacting Protein). FADD, la pro-caspase 8 et le récepteur associé à son ligand interagissent pour former un complexe d'induction de mort cellulaire ou DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Ces protéines adaptatrices sont capables d'interagir avec la partie intracytoplasmique des récepteurs de mort cellulaire par l'intermédiaire de domaines DD (Death Domain). Le complexe DISC est impliqué dans la conversion des pro-caspases 8 et 10 en caspases actives avec qui il interagit via un domaine DED (Death Effector Domain). Ces deux dernières sont ensuite capables de recruter la

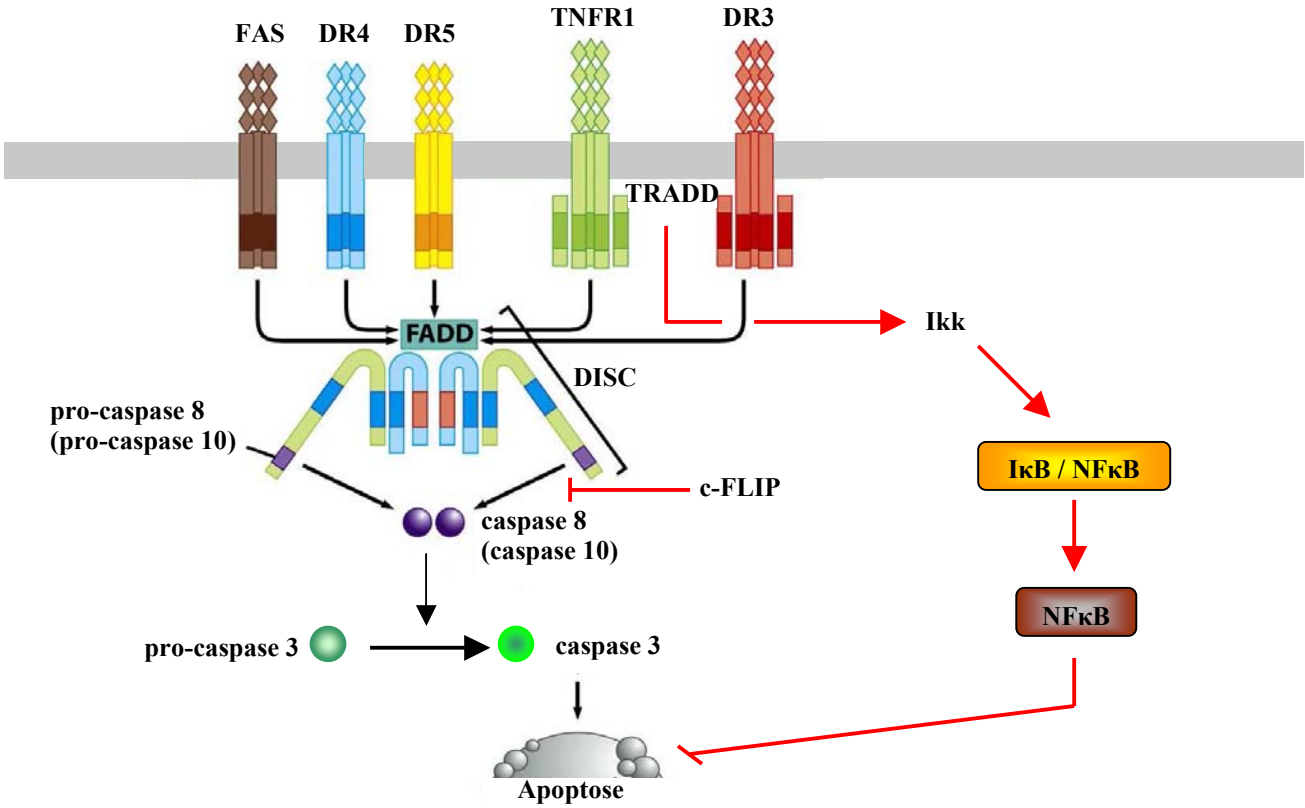


Figure 23. Mécanismes de régulation des voies de récepteurs de mort cellulaire.
D'après Gloire *et al.* 2008; MacFarlane 2003; Mahalingam *et al.* 2008.

caspase 3, caspase effectrice, pour la convertir en une forme active et enclencher la cascade apoptotique (Figure 22).

Parallèlement, la caspase 8 activée va également participer à une amplification du signal apoptotique passant par la mitochondrie, en clivant la protéine Bid.

Un homologue de la procaspase 8, c-FLIP peut être présent sous forme complète (c-FLIPL, pour long) ou bien sous forme plus courte (c-FLIPS, pour short) après un épissage alternatif. Sous ces deux formes, la protéine c-FLIP protège les cellules de la mort cellulaire induite par les ligands TRAIL et à un moindre degré FAS (MacFarlane 2003). C-Flip agit en entrant en compétition avec la pro-caspase 8 pour la liaison au complexe DISC.

Une autre voie de régulation implique l'activation de la voie NFκB, qui transactive des gènes anti-apoptotiques. Cette voie de régulation qui module l'effet des ligands TRAIL (MacFarlane 2003) et TNFα (Baker and Reddy 1998) est dépendante de l'intervention de la protéine RIP (Figure 23).

D Voie des céramides, une voie intrinsèque et extrinsèque

Les céramides sont des lipides complexes appartenant à la famille des sphingolipides et entrent dans la composition des membranes cellulaires. Une accumulation de céramides est observée dans les minutes qui suivent l'irradiation suite à l'activation des sphingomyélinases pouvant être acides (Gulbins and Kolesnick 2002) ou neutres (Andrieu-Abadie and Levade 2002). Cette activation se ferait *via* une interaction avec la membrane cellulaire (Kolesnick and Fuks 2003).

Quelques heures après l'irradiation, une seconde vague d'accumulation des céramides est constatée après activation des céramides synthases qui sont, elles, dépendantes de l'action de la protéine ATM (Vit and Rosselli 2003). Les récepteurs de mort TNFα et Fas sont aussi capables d'induire une élévation du pool de céramides (Lahiri and Futerman 2007).

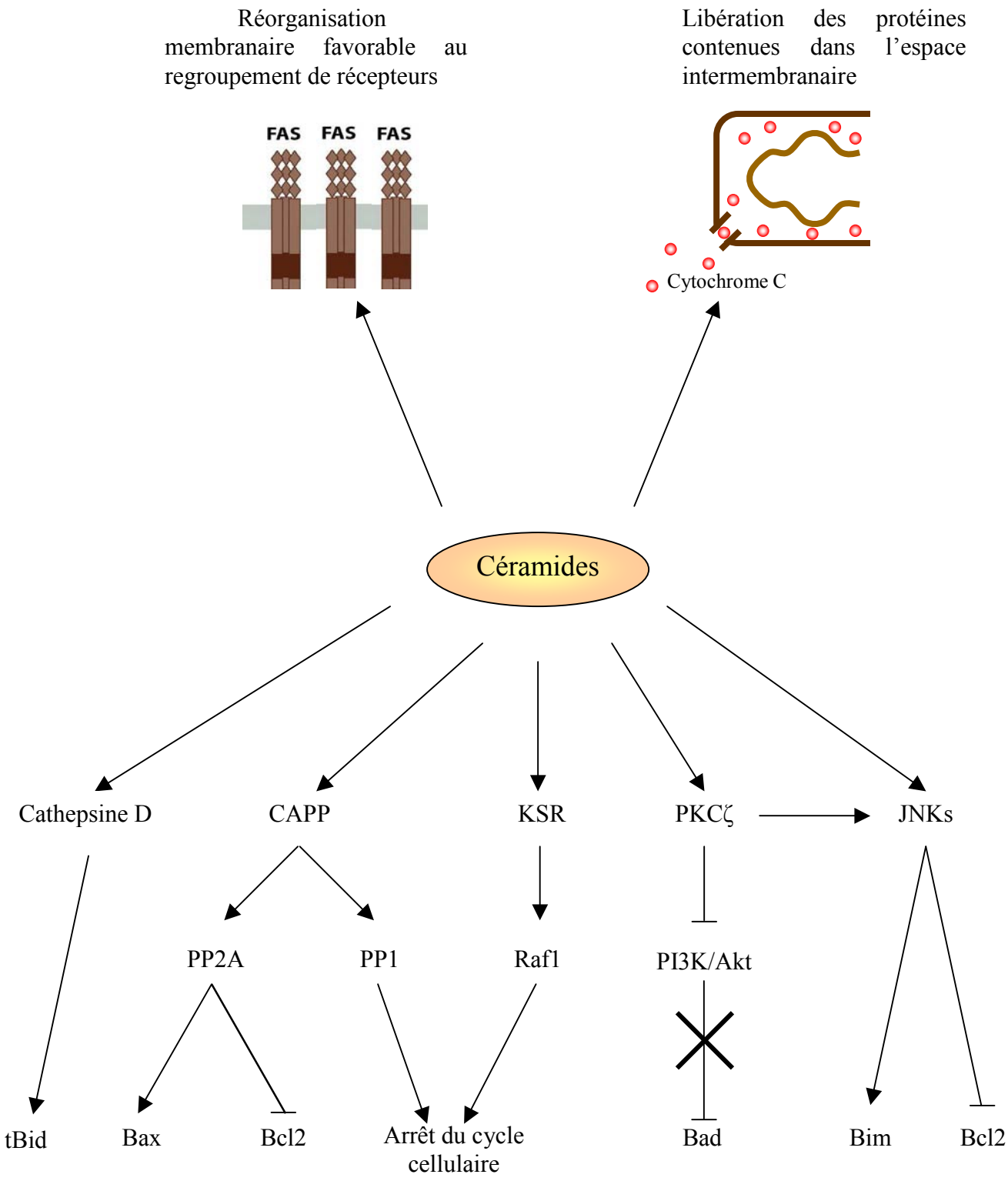


Figure 24. Modes d'action des céramides.
Les céramides peuvent agir directement sur la mitochondrie, favoriser le recrutement de récepteur de mort tel que Fas, ou bien agir en tant que second messager intracellulaire. D'après Lahiri and Futerman 2007; Ruvolo 2003.

Un premier modèle décrit les céramides comme un second messager dans une cascade de signalisation aboutissant à l'apoptose (Morales *et al.* 2007). Ils vont activer différents acteurs en aval comme CAPP (Ceramide-Activated Protein Phosphatase), la cathepsine D, KSR (Kinase Suppressor of Ras), JNKs (Jun-N-terminal Kinases) et la PKCζ (Proteine Kinase Cζ) (Lahiri and Futerman 2007).

L'activation de la cathepsine D conduit au clivage de Bid et induit donc la cascade apoptotique mitochondriale. La protéine CAPP induit à son tour l'activation de PP2A et PP1. PP2A déphosphoryle Bax et Bcl2 leur donnant respectivement une action pro-apoptotique et une incapacité à agir en tant que facteur anti-apoptotique. L'activation de PP1 comme celle de KSR conduit à un arrêt du cycle cellulaire. La voie de signalisation PI3K/Akt a été décrite comme phosphorylant la protéine Bad pour bloquer son action pro-apoptotique (del Peso *et al.* 1997). En inactivant la voie PI3K/Akt, la PKCζ régule indirectement l'apoptose passant par l'action de la protéine Bad. Les JNKs permettent d'une part la translocation de la protéine pro-apoptotique Bim vers la mitochondrie et d'autre part une hyperphosphorylation de Bcl2 qui va le rendre inactif mais qui n'est pas suffisante pour être apoptotique (Ruvolo 2003) .

Dans un second modèle, les céramides agiraient directement en tant que molécules de signalisation :

- soit en se localisant à la membrane sous forme de plateformes favorables au recrutement et à la séquestration de récepteurs comme dans le cas de Fas (Bollinger *et al.* 2005)
- soit au moyen d'une interaction directe avec la mitochondrie pour former au niveau de la membrane externe mitochondriale des pores suffisamment larges pour permettre de libérer les protéines contenues dans l'espace intermembranaire tel que le cytochrome c activant ainsi la voie apoptotique intrinsèque (Siskind *et al.* 2002; Siskind *et al.* 2006).

E Mécanismes de résistance à l'apoptose

Des voies de signalisation, induites par l'irradiation (cf 3.1.1) ou bien suractivées à l'état basal dans les cellules tumorales, sont à l'origine de mécanismes anti-apoptotiques. Leur action peut, en partie, être expliquée par le fait que les voies de signalisation contrôlant la croissance et la survie interfèrent fortement avec les voies régulant l'apoptose.

Parmi ces voies, on peut citer notamment le rôle majeur joué par les voies PI3K/Akt, MAPK, JAK/STAT et JNK. L'activation de la voie Akt, suite par exemple à l'autophosphorylation d'EGFR conduit à l'augmentation de l'expression de gènes anti-apoptotiques comme BCL-$_{XL}$ ou les IAPs. La protéine Bad et la pro-caspase 9 sont par ailleurs rendues inactives suite à leur phosphorylation par Akt (Li *et al.* 2001). Cette kinase inactive le facteur de transcription forkhead (fkh) qui induit des gènes pro-apoptotiques comme le ligand Fas-L. Elle active aussi NFκB qui contrôle quant à lui l'expression de gènes anti-apoptotiques (Lehnert 2008b).

Par ailleurs des isoformes de la famille des GTPase Ras sont également impliquées dans la balance apoptose/survie cellulaire. Si l'expression de l'isoforme Ha-Ras augmente la résistance à l'irradiation via l'activation de la voie PI3K/Akt, l'isoforme Ki-Ras induit un comportement inverse. La forte expression de cette deuxième isoforme a en effet été associée à une activation élevée de la P38 MAPK et à une sensibilité accrue à la radiothérapie (Lehnert 2008a). Ki-Ras favoriserait la translocation de Bax au sein de la membrane mitochondriale. Les données de la littérature concernant la régulation de la P38 MAPK par l'irradiation restent très discutées. Selon les auteurs, cette kinase est : non activée (Kim *et al.* 2002), faiblement activée (Taher *et al.* 2000), ou très fortement activée (Lee *et al.* 2002) par les radiations ionisantes.

Une altération de la fonction de p53 ou de son expression, de même qu'une altération de l'expression de MDM2 sont des paramètres qui vont empêcher le bon fonctionnement de la cascade apoptotique. Ce type d'altération est d'ailleurs très fréquent dans les cellules tumorales. Des facteurs extracellulaires comme l'erythropoïétine, le FGFβ mais aussi les interleukines 3 et 6 ont également des fonctions anti-apoptotiques (Lehnert 2008b).

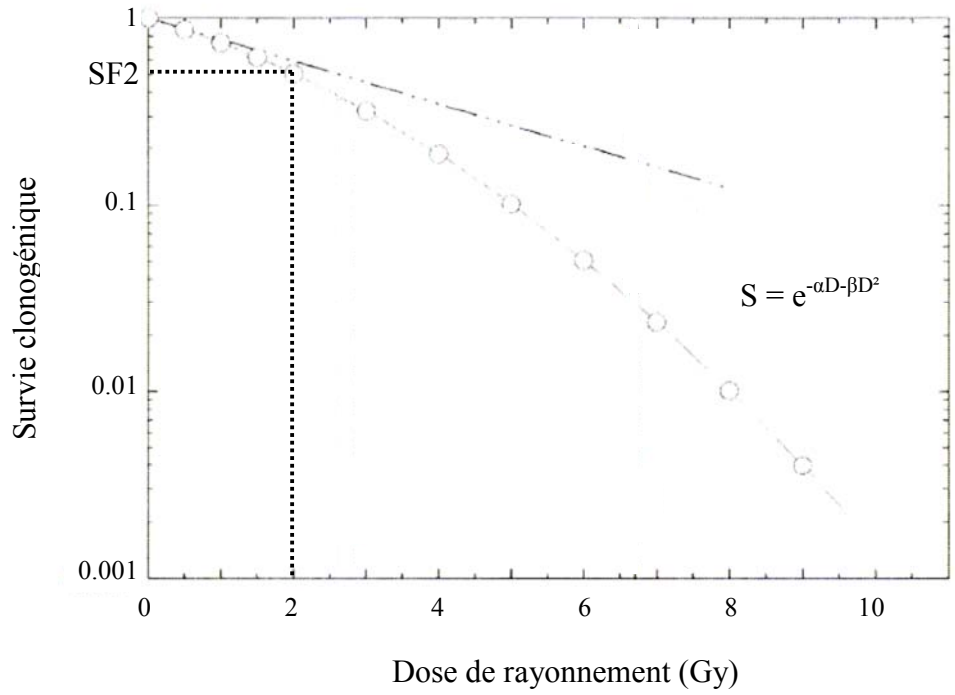


Figure 25. Courbe de survie clonogénique au rayonnement gamma de cellules humaines irradiées en dose unique.
D'après Favaudon 2008.

3.4 Radiosensibilité intrinsèque

En radiobiologie, les réponses cellulaires à l'irradiation *in vitro* sont étudiées principalement grâce au test de survie clonogénique. Les cellules sont mises en culture à très faible densité avant (ou après) irradiation et le nombre de colonies est dénombré. Par définition, une colonie correspond à un ensemble d'au moins 50 cellules regroupées entre elles, ensemble qui est issu d'une cellule ayant survécu au traitement et dont les descendantes se sont divisées au moins 6 fois. Ce délai permet d'exclure les cellules en voie de mort mitotique. Le nombre de colonies comptées est proportionnel au nombre de cellules clonogènes au départ et permet de déterminer le coefficient de clonage. Le taux de survie est mesuré par le rapport entre le coefficient de clonage après traitement (irradiation) et le coefficient de clonage sans traitement (dose zéro). La diminution du taux de survie pour des doses croissantes d'irradiation est exprimée par une courbe de survie cellulaire (Figure 25).

La courbe en dose unique, tracée dans un système de coordonnées semi-logarithmiques, montre une incurvation continue, et peut être ajustée au modèle linéaire quadratique : $S = e^{-\alpha D-\beta D^2}$; où S est la survie et D la dose de rayonnement. Le paramètre α décrit la tangente à l'origine de la courbe (droite en pointillés) et représente la contribution des lésions létales d'emblée c'est à dire des dommages non réparables tels que des aberrations chromosomiques. Le paramètre β détermine la mortalité liée au carré de la dose (facteur quadratique). Ce deuxième paramètre a été, en partie, associé à la présence de lésions sub-létales telles que deux cassures chromosomiques relativement proches ($\leq 0.01\mu m$) favorisant une altération létale pour la cellule. Une saturation du système de réparation est une autre explication envisagée pour expliquer le paramètre β.

Le protocole le plus habituel en radiothérapie consiste à délivrer une dose de 2Gy par jour, 5 jours par semaine, jusqu'à atteindre la dose maximale tolérée par les tissus sains. La corrélation entre la valeur de la survie à 2Gy (SF2) et la réponse à la radiothérapie est donc directe.

La dose moyenne d'inactivation $\overline{D}$, c'est à dire l'intégrale de l'aire située sous la courbe de survie ou AUC (Area Under Curve) est un autre paramètre étudié en radiobiologie. Lorsque la courbe de survie obéit au modèle linéaire quadratique, l'aire sous la courbe est définie par l'intégrale : $\overline{D} = \int_0^\infty e^{-\alpha D-\beta D^2}.dD$.

La réponse des cellules à l'irradiation peut être considérée comme étant la résultante de deux mécanismes : la résistance intrinsèque liée à la cellule elle-même, et l'influence des interactions entre la tumeur et son micro-environnement. Les caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales seraient le déterminant principal de la radiorésistance. En effet, il a été démontré que les lignées cellulaires dérivant de tumeurs radiocurables étaient radiosensibles *in vitro* alors que des lignées issues de tumeurs moins curables présentaient une résistance élevée à l'irradiation *in vitro* (Fertil and Malaise 1985).

La capacité de réparation des lésions de l'ADN dans les cellules tumorales entre les séances d'irradiation ainsi que la prolifération sont des sources de radiorésistance. Il a été observé des variations notables de sensibilité entre des cellules tumorales de même type histologique (variabilité de réparation d'une lignée à l'autre). Les cellules saines de même type ont en revanche des sensibilités voisines chez tous les sujets sauf, chez les sujets porteurs d'un défaut génétique du système de réparation de l'ADN qui présentent une augmentation de la radiosensibilité.

Les cellules cancéreuses (avec une prolifération rapide) ont globalement moins de capacités de réparation que les cellules normales. Le fractionnement de dose permet donc de meilleures réparations au sein des populations cellulaires saines. En réalité, le fractionnement protège sélectivement les organes sains par rapport aux tumeurs. L'accumulation de lésions non réparées dans la cellule tumorale peut conduire soit à la mort cellulaire soit à l'émergence de clones encore plus résistants aux effets des rayonnements. Des altérations génétiques peuvent conduire à un blocage des voies apoptotiques favorisant ainsi la survie cellulaire.

D'autre part, certains auteurs ont mis en évidence un rôle des jonctions intercellulaires dans la radiorésistance (Guichard *et al.* 1983). Leur mauvais fonctionnement expliquerait l'exceptionnelle sensibilité de certaines lignées cellulaires saines comme les cellules souches de la moelle. Ces jonctions intercellulaires seraient par ailleurs une des voies de transport d'un messager qui conduit les cellules situées au voisinage immédiat de cellules irradiées à présenter les mêmes problèmes en terme d'aberrations chromosomiques, de délétions géniques voire d'engagement vers des processus de mort cellulaire. Ce phénomène est plus connu sous le nom d' « effet bystander », littéralement « effet de proximité ». Il permet d'expliquer pourquoi il a été observé qu'une population cellulaire plus large que la population irradiée présentait les effets létaux de l'irradiation. La nature de ce(s) messager(s) est encore méconnue mais il pourrait s'agir d'espèces réactives de l'oxygène, de l'oxyde nitrique, de cytokines ou d'inducteurs d'apoptose comme le cytochrome C ou encore une caspase (Favaudon 2008).

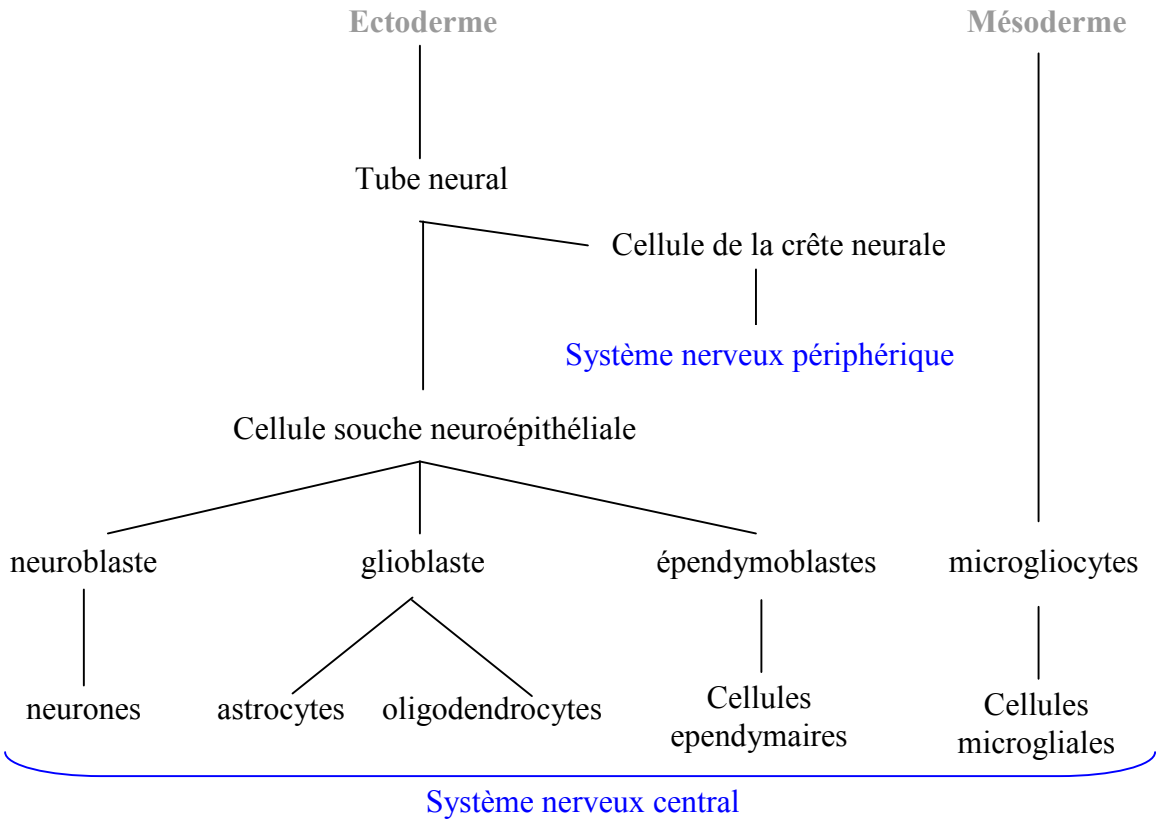


Figure 26. Histogenèse des cellules gliales.

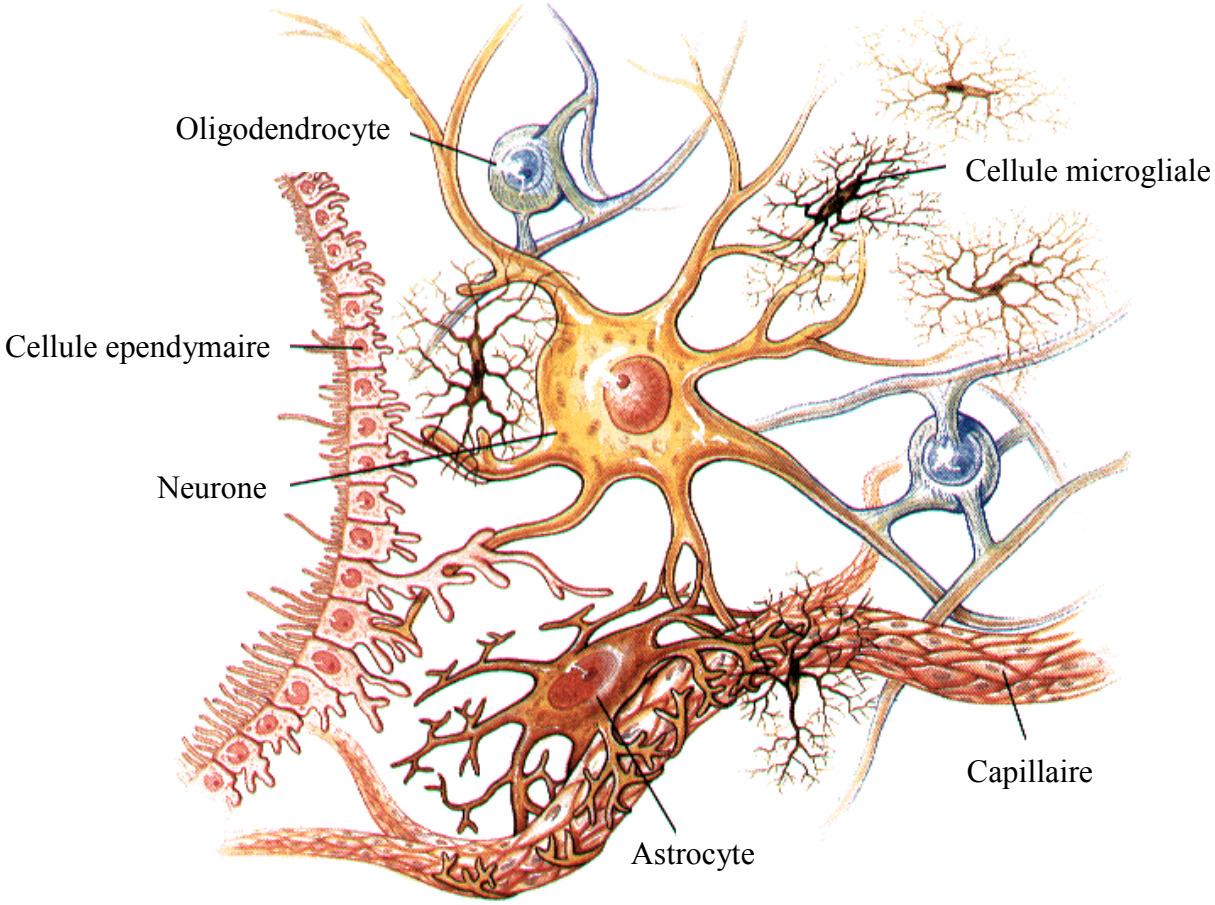


Figure 27. Organisation et morphologie des différentes cellules gliales.
Dessins Pascal Fya.

II Les gliomes : aspects cliniques et biologiques

1 Histogenèse des cellules gliales

La glie est un terme qui demande à être précisé car selon certains auteurs ce terme peut rassembler l'ensemble des cellules de soutien des neurones (glie fonctionnelle) c'est à dire les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules microgliales, et les cellules ependymaires ; or sur un plan strictement histogénétique, toutes ces cellules n'ont pas la même origine (Morest and Silver 2003; Figure 26).

Une cellule souche neuro-épithéliale présente au niveau du tube neural peut donner par différenciation 3 types de cellules : les neuroblastes qui seront à l'origine des neurones ; les glioblastes qui donneront les astrocytes et les oligodendrocytes ; et enfin les ependymoblastes qui donneront les cellules ependymaires. Les cellules microgliales dérivent quant à elles des microglyocytes qui sont d'origine mésodermique. Certaines cellules de la crête neurale, après migration, participeront à la formation du système nerveux périphérique en générant les neurones périphériques et les cellules de Schwann (Morest and Silver 2003).

2 Histopathologie et classification des tumeurs gliales

Histologiquement parmi les descendants des glioblastes, on peut distinguer (Figure 27):

- les astrocytes : petites cellules de forme étoilée présentes dans tout le système nerveux avec de nombreux prolongements terminés par des renflements formant les pieds astrocytaires. On les caractérise avec un anticorps dirigé contre la protéine GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). En fonction de l'abondance en GFAP, on distingue les astrocytes de types I avec peu de GFAP qui sont dans la substance blanche et forment une barrière anatomique entre le sang et les neurones. Les astrocytes de type II, eux, sont très riches en GFAP et localisés dans la substance grise ; ils sont en contact avec plusieurs régions neuronales et participent à plusieurs fonctions dont la conduction nerveuse des potentiels d'actions (dépolarisation transitoire de la membrane plasmique des neurones), la

Astrocytomes	Différenciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération vasculaire
Astrocytomes diffus de grade II - fibrillaires - gémistocytiques - protoplasmiques (rares)	Haut degré de différenciation	Modérée	Occasionnelles	Absente ou une mitose	Absente	Absente
Astrocytomes anaplasiques de grade III	Anaplasie focale ou dispersée	Augmentée diffusément ou focalement	Présentes	Présente	Absente	Absente
Glioblastomes de grade IV	Faible	Elevée	Marquées	Marquée	Présente	Présente

Tableau 3. Classification des astrocytomes diffus selon l'OMS 2000.
D'après Figarella-Branger and Bouvier 2005.

Oligodendrogliomes et gliomes	Différenciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération vasculaire
Oligodendrogliomes de grade II	Bien différencié	Modérée	**Possiblement marquées**	Absente ou occasionnelle	Absente ou peu conséquente	Non proéminente
Oligo-astrocytomes de grade II	Bien différencié	Faible ou modérée	?	Absente ou faible	Absente	Absente
Oligodendrogliomes anaplasiques de grade III	Anaplasie focale ou diffuse	Eventuellement augmentée	Eventuellement marquées	Eventuellement forte	Possible	Possible
Oligo-astrocytomes anaplasiques de grade III	?	Eventuellement forte	Eventuellement présentes	Eventuellement forte	Possible	Possible

Tableau 4. Classification des oligodendrogliomes et gliomes mixtes selon l'OMS 2000.
D'après Figarella-Branger and Bouvier 2005.

recapture des neurotransmetteurs, le développement du cerveau et un rôle de Cellule Présentatrice d'Antigène (CPAg) dans le SNC.

- les oligodendrocytes, présents dans tout le SNC, assurent la myélinistion des axones.

A l'état normal, cellules progénitrices et cellules adultes n'ont qu'une activité de multiplication très faible, limitée au renouvellement des cellules gliales lésées. La reprise d'une prolifération plus soutenue au sein de ces populations cellulaires normalement quiescentes pourrait être à l'origine de la tumorogénèse. Parmi les gliomes, on distingue selon leur origine cellulaire les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes.

2.1 Classification de l'OMS

La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), actuellement utilisée internationalement, subdivise les tumeurs gliales selon leur aspect histologique et leur degré de ressemblance à la cellule originelle dont elles sont supposées dériver (Kleihues and Cavenee 2000). La deuxième notion de cette classification est représentée par le *grading* histopronostique : à chaque tumeur est attribué un grade de gravité allant de I à IV (Tableau 3 & Tableau 4). Les grades sont définis par une évolution successive vers une perte de l'état différencié, une élévation de la densité cellulaire, des atypies nucléaires, une activité mitotique, de la nécrose et de la prolifération vasculaire.

Ainsi cette classification distingue, parmi les gliomes astrocytaires, les grades I qui sont des gliomes circonscrits (astrocytome pilocytique, astrocytome à cellules géantes sous ependymaires), des grades II, III et IV observés essentiellement dans le cadre des astrocytomes diffus. Les gliomes diffus de l'adulte se caractérisent par un grand pouvoir invasif et par un passage inéluctable à l'anaplasie. La notion de bénignité et de malignité histologique, telle qu'elle est envisagée dans d'autres organes ne peut s'appliquer dans le cas des gliomes diffus.

Selon la classification de l'OMS, les oligodendrogliomes sont divisés en deux grades : II et III, et sont composés de cellules normales arrondies à noyaux réguliers, présentant souvent un halot clair périnucléaire et un cytoplasme clarifié avec un aspect caractéristique dit en nid d'abeille et. Ils comportent généralement des zones microkystiques, des calcifications et leur vascularisation est représentée par un réseau dense de capillaires fins et branchés (Figarella-Branger and Bouvier 2005). Les principaux critères de diagnostic des astrocytomes diffus, oligodendrogliomes et gliomes mixtes sont

Oligodendrogliome et oligoastrocytome de grade A	Absence d'hyperplasie endothéliale et de prise de contraste en imagerie
Oligodendrogliome et oligoastrocytome de grade B	Présence d'hyperplasie endothéliale et/ou de prise de contraste en imagerie

Tableau 5. *Grading* de Saint-Anne.
Daumas-Duport *et al.* 1997

rapportés dans les tableaux 1 et 2. La forme la plus sévère est le glioblastome (GBM), les oligoastrocytomes et oligodendrogliomes peuvent également évoluer vers le stade GBM. L'inconvénient majeur de cette classification est son manque de reproductibilité inter et intra-observateur (Coons *et al.* 1997; Mittler *et al.* 1996). D'autre part, elle ne tient pas compte des données de la clinique et de l'imagerie.

2.2 Classification de Saint-Anne

Parallèlement une autre classification, celle de l'hôpital Saint Anne, fait une corrélation entre les données histologiques et les données d'imagerie. Cette classification repose essentiellement sur les concepts suivants (Daumas-Duport *et al.* 2000) :

- les gliomes communs ont une structure spatiale infiltrante solide ou mixte.
    - la forme infiltrante est composée de cellules tumorales isolées au sein d'un parenchyme nerveux présent tant sur le plan fonctionnel que morphologique,
    - la forme solide est constituée de cellules tumorales en contact les unes avec les autres sans parenchyme résiduel,
    - le passage d'une forme infiltrante à une forme solide s'accompagne d'une microangiogénèse qui constitue l'élément clé du *grading* de cette classification. Le marqueur histologique de la micro-angiogénèse est représenté par l'hyperplasie endothéliale et constitue l'unique paramètre histologique du *grading*. Sa traduction radiologique est la prise de contraste en imagerie (scanner ou IRM). Ainsi le *grading* de Saint-Anne est histo-radiologique et son utilisation ne peut s'envisager que si l'on dispose du dossier radiologique du patient. Il s'agit d'un système simple d'application et reproductible.

- Le *grading* distingue 2 catégories (Tableau 5) :
    - l'oligodendrogliome et l'oligoastrocytome de grade A définis par l'absence d'hyperplasie endothéliale et de prise de contraste,
    - l'oligodendrogliome et l'oligoastrocytome de grade B définis par la présence d'une hyperplasie endothéliale et/ou d'une prise de contraste.

Grade OMS	Désignation OMS	Désignation Saint-Anne	Critères histologiques
I	Astrocytome pilocytique		
II	Astocytome diffu		1 critère : atypies nucléaires
III	Astrocytome anaplasique		2 critères : atypies nucléaires et activité mitotique
IV	Glioblastome	Glioblastome	3 critères : atypies nucléaires, mitoses, prolifération endothéliale et/ou nécrose

Tableau 6. Comparaison des classifications de Saint-Anne et de l'OMS

Gènes	Siège	Fonction	Principale altération	Incidence astrocytomes (%)	Incidence oligodendrogliomes (%)
TP53	17p	Cycle, apoptose, réparation	Mutation	40	10
P16/CDKN2A	9p	Cycle	Délétion	50	20
$P14^{ARF}$	9p	Cycle	Méthylation	20	20
RB	13q	Cycle	Mutation	20	-
PTEN	10q	Transduction, invasion	Mutation	20	-
EGFR	7q	Transduction	Amplification/délétion	40	0-20
MDM2	12q	Cycle	Amplification	10	-
CDK4	12q	Cycle	Amplification	5-10	-
PDGFRA	4q	Transduction	Amplification	5-10	5-10
?	1p	?	LOH	10	50-80
?	19q	?	LOH	40	50-80
?	10q	?	LOH	80	30
?	22q	?	LOH	25	25

Tableau 7. Fréquence des altérations dans les gliomes
LOH : Loss Of Heterozygosity. Hoang-Xuan *et al.* 2005; Ohgaki and Kleihues 2007.

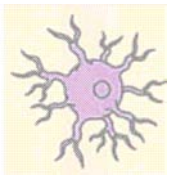
Les tumeurs astrocytaires diffuses classées dans la classification de l'OMS en grade II ou grade III (astrocytome anaplasique) ne sont pas reconnues par le système de Saint-Anne et sont considérées comme des tumeurs oligoastrocytaires ou oligodendrogliales. Les seules tumeurs astrocytaires reconnues comme telles sont les glioblastomes (Tableau 6). Un sous-groupe particulier de tumeurs malignes, caractérisé par une double différenciation gliale et neuronale, est dénommé tumeur glio-neuronale maligne.

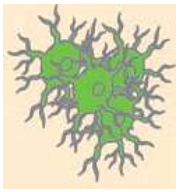
2.3 Vers une classification moléculaire des gliomes

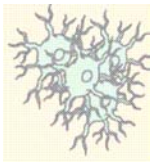
La classification histologique de l'OMS qui est la plus souvent utilisée par les neuropathologistes en pratique courante, est pourtant, très loin d'être satisfaisante avec un taux de discordance diagnostic élevé dû à la subjectivité des critères exclusivement morphologiques utilisés. La confrontation de cette classification avec les données macroscopiques issues de l'imagerie (classification de Saint Anne) a constitué une amélioration majeure même si elle n'est pas encore reconnue sur le plan international. Au cours des dernières années, des progrès importants ont été réalisés dans le recensement des altérations moléculaires retrouvées dans les gliomes. L'élaboration de certains profils d'altérations et leur mise en relation avec les critères histologiques et cliniques contribuent à l'amélioration de la classification histopronostique des gliomes. Les principales altérations et leurs fréquences respectives sont rassemblées dans le Tableau 7.

Les premières altérations décrites dans les astrocytomes ont été l'amplification associée dans 50% des cas à un réarrangement génique du proto-oncogène *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor) et des altérations par mutation du gène *p53* et/ou accumulation de la protéine p53. Ces deux altérations n'ont toutefois pas été retrouvées associées (Bouvier-Labit *et al.* 1998; Reifenberger *et al.* 1996; Watanabe *et al.* 1996). Par la suite, ont été identifiées les altérations homozygotes du gène suppresseur de tumeur P16/CDKN2A, (Schmidt *et al.* 2002; Ueki *et al.* 1996), des mutations ponctuelles des gènes suppresseurs RB (Ueki *et al.* 1996) et PTEN/MMAC1(Zhou *et al.* 1999) des méthylations de la région promotrice de $P14^{ARF}$ (Nakamura *et al.* 2001), une amplification des proto-oncogènes PDGFRA (Fleming *et al.* 1992), CDK4 (Schmidt *et al.* 2002), et MDM2 (Newcomb *et al.* 1998; Reifenberger *et al.* 1993). Les délétions chromosomiques récurrentes et notamment 10q, 19q et 22q laissent supposer l'existence de gènes suppresseurs de tumeurs non identifiés à ce jour dans les astrocytomes (Hoang-Xuan *et al.* 2001; Lin *et al.* 1998; von Deimling *et al.* 1994). Le fait que l'amplification d'*EGFR* soit quasi-exclusivement observée dans les glioblastomes

Astrocyte ou cellule souche précurseur



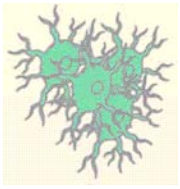




Glioblastome Primaire ou *de novo* (Grade IV- OMS)
Délétion en 10q (70%) et 10p
Mutation de PTEN (25%)*
Amplification (36%)*, surexpression ou altération d'EGFR
Délétion de p16INK4a (28%)
Altération de la voie P53
Amplification, surexpression de MDM2
Altération de RB

Astrocytome de bas grade (Grade II - OMS)
Délétion 17p, Mutation de P53 (59%)
Surexpression PDGFRα
Délétion 22q

Astrocytome Anaplasique (Grade III - OMS)
Délétion 17p, Mutation de P53 (53%)
Délétion 13q, mutation RB
Délétion 19q
Délétion 9p, INF-α –β, p16
Amplification CDK4
Amplification MDM2



Glioblastome Secondaire (Grade IV - OMS)
Délétion 10q (63%), 10p
Amplification d'EGFR (8%)
Délétion p16INK4α (19%)
Mutation P53 (65%)*
Mutation PTEN (4%)
Surexpression PDGFA/B
Amplification PDGFRα

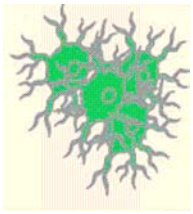


Figure 28. Altérations génétiques conduisant au développement des glioblastomes primaires et secondaires.
*Altérations significativement différentes en fréquence entre glioblastomes primaires et secondaires (Kleihues and Cavenee 2000; Shapiro and Shapiro 2006).

suggère qu'il s'agit d'un événement tardif dans la progression tumorale. L'équipe de (Canute *et al.* 1996) a montré que les amplicons contenant le gène *EGFR* étaient situés à l'intérieur de fragments d'ADN extra-chromosomiques que sont les double minute (DM). A l'inverse, les altérations de p53, observées dans tous les grades de malignité indiquent qu'elles ont lieu plus précocement dans la tumorigénèse. Ainsi plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse de l'existence d'au moins deux voies de tumorigénèse au sein des tumeurs astrocytaires (Figure 28) conduisant au glioblastome primaire ou bien au glioblastome secondaire (Hoang-Xuan *et al.* 2005; Shapiro and Shapiro 2006).

Les oligodendrogliomes se distinguent par la rareté des mutations du gène *p53* (Biernat *et al.* 1997; Hoang-Xuan *et al.* 2001; Tohma *et al.* 1998) et par la présence de délétions chromosomiques récurrentes 1p et 19q (Reifenberger *et al.* 1994). Ces dernières qui sont toujours associées, sont observées quel que soit le grade, ce qui les rattache aux évènements précoces de la tumorogénèse. Les gènes suppresseurs de tumeurs situés dans ces régions restent encore à identifier. D'autres altérations, moins fréquentes, sont également observées : inactivation du gène $P14^{ARF}$ (Nakamura *et al.* 2001), délétions homozygotes de P16/CDKN2A, amplification d'*EGFR* (Hoang-Xuan *et al.* 2001), délétion en 10q (Sasaki *et al.* 2001), amplification de *PDGFRA* (Smith *et al.* 2000). Les différents profils moléculaires (délétion 1p/19q ou combinaison des autres altérations) sont associés à des voies de tumorigénèse distinctes. Récemment une équipe a montré une association entre la codélétion 1p/19q dans les oligodendrogliomes et un profil d'expression neuronal suggérant que la cellule progénitrice initiale devait être capable de former des neurones et des oligodendrocytes (Ducray *et al.* 2008).

Concernant les oligoastrocytomes, il n'y a actuellement que peu d'études moléculaires disponibles. Ils posent de grosses difficultés diagnostiques avec les oligodendrogliomes et les astrocytomes « purs » car il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus clair sur la proportion minimale de chacun des deux contingents cellulaires pour établir un diagnostic de gliome mixte. Cette difficulté implique que selon les études les profils moléculaires soient plus proche des oligodendrogliomes (perte 1p/19q) ou des astrocytomes (mutation P53) selon la proportion relative de chaque type cellulaire (Maintz *et al.* 1997).

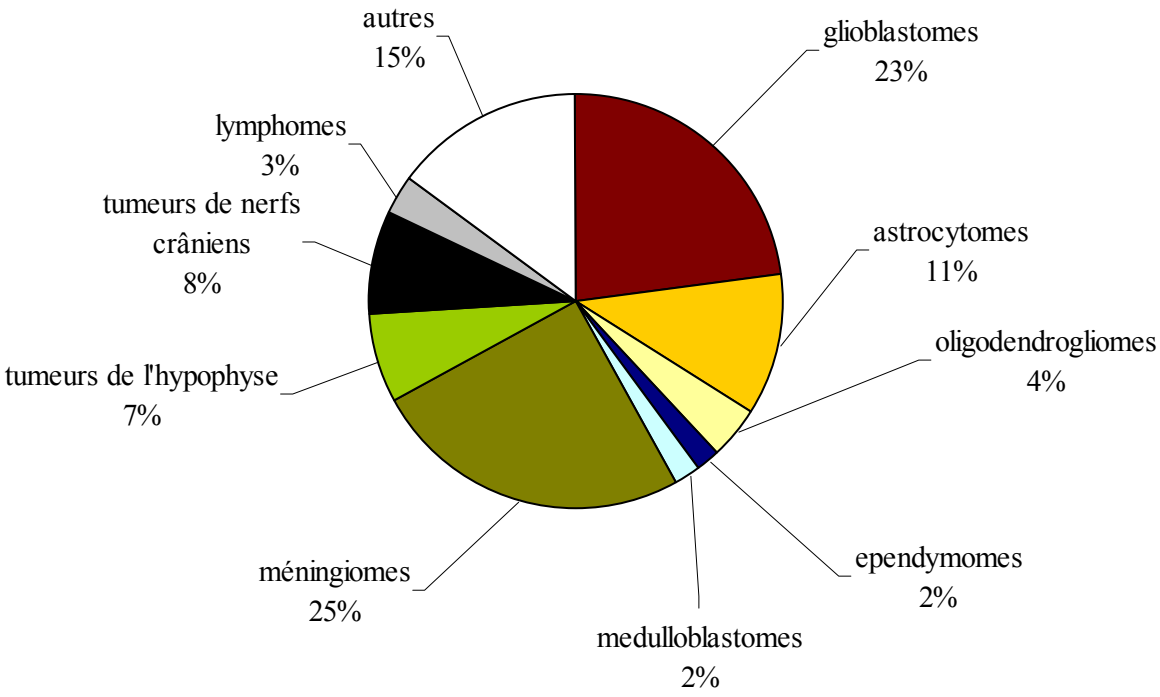


Figure 29. Répartition des tumeurs cérébrales selon le type histologique.
Adapté d'après Abrey and Mason 2003.

3 Epidémiologie

3.1 Incidence

L'incidence des tumeurs cérébrales est difficile à estimer précisément car les séries de la littérature sont très hétérogènes (hôpitaux généraux ou spécialisés, séries neurochirurgicales ou neuropathologiques, séries géographiques, séries pédiatriques ou bien concernant uniquement des adultes) (Vallat *et al.* 1997). Les chiffres habituellement fournis situent l'incidence des tumeurs cérébrales autour de 10 à 20 pour 100 000 personnes par an (Bondy *et al.* 2008; Wen and Kesari 2008). L'apparente augmentation d'incidence des tumeurs cérébrales au cours des deux dernières décennies, observée par certains auteurs semble principalement liée à l'amélioration du diagnostic précoce due à l'introduction du scanner et de l'IRM (Lantos *et al.* 1997).

Les gliomes sont les tumeurs primitives du système nerveux central les plus fréquentes (Figure 29) et leur incidence est de 5 à 10 pour 100 000 habitants (Behin *et al.* 2003). On estime qu'environ 50% des astrocytomes de bas grade, à l'exception des astrocytomes pilocytiques, dégénèrent en grade III ou IV après 7-8 ans d'évolution. Les glioblastomes apparus suite à cette évolution sont dits secondaires en opposition aux glioblastomes primaires ou *de novo*. Le glioblastome ou astrocytome de grade élevé (IV), a une incidence de 3 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants avec une fréquence plus importante entre 45 et 70 ans. Les glioblastomes qui constituent la majeure partie des tumeurs gliales (Buckner *et al.* 2007) ont une incidence légèrement plus élevée chez l'homme que chez la femme (1.5 :1). La répartition des différents types de gliomes varie en fonction de l'âge : chez les enfants (0-15 ans) il existe une majorité d'astrocytomes, alors qu'après 15 ans les glioblastomes sont plus fréquents. D'autre part, les métastases cérébrales sont une complication observée dans 25% des cancers systémiques avec un risque plus élevé notamment pour les cancers du poumon, du sein et pour les mélanomes (Boch 2004).

3.2 Facteurs de risques

Les causes des tumeurs cérébrales restent aujourd'hui inconnues. De très nombreuses études ont été menées, le plus souvent cas-témoin et exploratoires avec des résultats contradictoires ne permettant pas d'établir de lien de causalité entre un facteur et la pathologie. Cependant plusieurs facteurs environnementaux et génétiques ont été retrouvés

Syndrome	Gène	Localisation	Prédispositions
Neurofibromatose 1 (Recklinghausen)	NF1	17q11.2	Neurofibromes, tumeurs malignes du SN périphérique, astrocytomes, gliomes du nerf optique
Neurofibromatose 2	NF2	22q12	Schwannomes, épendymomes, astrocytomes
Sclérose tubéreuse de Boureville	TSC1 TSC2	9p34 16p13	Subépendymome à cellules géantes
Turcot, type 1	hMLH1 hPSM2	3p21,2p16 et 7p22	Glioblastome Médulloblastome
Turcot, type 2	APC	5q21	

Tableau 8. Principaux syndromes familiaux prédisposant aux tumeurs gliales du système nerveux central (SNC).
D'après Boch and Menei 2004.

par des études différentes et leur implication semble donc pertinente.

- Facteurs de risques environnementaux :

Radiations ionisantes : Les enfants exposés *in utero* ont une surmortalité par tumeurs du SNC, de même pour les enfants atteints de la teigne du cuir chevelu et traités par irradiations. Les critères retenus pour considérer qu'une tumeur est radio-induite sont l'existence d'une latence (de 1 à 26 ans ; 10 ans et demi en moyenne), la localisation de la tumeur dans le champ d'irradiation, et enfin le fait que la nature histologique de la tumeur soit différente de celle de la lésion pour laquelle le patient a été irradié (Gray *et al.* 2004).

L'exposition aux dérivés de la famille des N-nitroso-urées est considérée comme un facteur de risque avéré même si actuellement ce résultat expérimental reste sans confirmation épidémiologique. Il est difficile de lister d'autres facteurs de risques environnementaux avec certitude car les résultats publiés sont non ou peu significatifs, contestables et non convaincants. Ainsi ont été mis en cause, sans preuve indiscutable, les traumatismes crâniens, l'épilepsie, la proximité de lignes électriques à haute tension, des facteurs nutritionnels, infectieux ou hormonaux, le tabac, l'alcool, les barbituriques, l'exposition professionnelle à différents toxiques comme le chlorure de vinyle et les dérivés du pétrole (Baldi *et al.* 2000). Enfin une corrélation entre les tumeurs et l'utilisation de téléphones portables est actuellement très discutée (Hardell *et al.* 2009; Inskip *et al.* 2001). Seule une exposition aux champs magnétiques de basse fréquence est un facteur favorisant démontré (Minder and Pfluger 2001).

- Facteurs génétiques

Les tumeurs humaines surviennent le plus souvent de façon sporadique. Parfois l'agrégation anormale de tumeurs dans une même famille suggère une prédisposition génétique (Sanson 1996). Il existe des facteurs héréditaires (Tableau 8) comme la maladie de Von Recklinghausen et la maladie de Li Fraumeni (mutation de p53 dans la lignée germinale) favorisant la prédisposition des cancers du cerveau (Malkin and Friend 1992; Srivastava *et al.* 1990). La sclérose tubéreuse de Bourneville, et le syndrome de Turcot semblent être également des terrains favorables au développement des tumeurs cérébrales gliales.

4 Physiopathologie des tumeurs cérébrales

4.1 Aspects cliniques

4.1.1 Mode de croissance tumorale

Quel que soit le type histologique de départ, l'évolution des tumeurs cérébrales va se faire par une augmentation de volume progressive. Celle-ci n'est pas toujours linéaire et peut rester stable plusieurs années avant une aggravation brutale. Le cerveau et l'ensemble du système physique qu'il compose avec ses enveloppes, sont extraordinairement tolérants à des processus expansifs d'évolution lente. Une tumeur dont le temps de croissance se mesure en années entraîne des déplacements de structures importants, voire des distorsions spectaculaires, sans grands désordres cliniques. Les phénomènes d'hypertension intracrânienne pouvant être absents ou très tardifs (Philippon 2004). A l'inverse, une lésion développée en quelques semaines n'entraîne que peu de déplacements parenchymateux mais est souvent associée à un oedème considérable. Elle est dans ce cas mal tolérée sur le plan fonctionnel et s'accompagne précocement de phénomènes d'hypertension intracrânienne importants.

L'angiogénèse est indispensable à la continuité de la croissance tumorale. Dans le cas des glioblastomes, ce processus est particulièrement actif avec l'intervention de nombreux facteurs tels que le FGF, le VEGF, le TNFα, les TGFα et β, le PDEGF, le PDGF et l'interleukine-8 (Del Maestro 1999). Dans le cas d'une croissance rapide, la tumeur est centrée par une zone de nécrose correspondant à une hypoxie des cellules tumorales non irriguées par la vascularisation entièrement située à sa périphérie.

4.1.2 Conséquences physiopathologiques

La barrière hémato-encéphalique (BHE), localisée au niveau de la paroi capillaire cérébrale, est constituée de cellules endothéliales qui à la différence du reste de l'organisme ne sont pas jointives mais reliées par des jonctions serrées. Dans le cas des tumeurs cérébrales, il n'y a pas de destruction de la BHE mais une rupture de ces jonctions serrées,

accompagnée d'une fenestration capillaire et d'une augmentation du transport au travers des cellules endothéliales vasculaires (activité vésiculaire pinocytique).

Cette élévation de la perméabilité vasculaire cérébrale entraîne le passage dans l'espace extracellulaire d'un filtrat plasmatique riche en protéines, sa rétention au sein de cet espace est à l'origine de la formation d'un œdème vasogénique (Cloughesy and Black 1999).

Certains facteurs produits par la tumeur, comme le VEGF, participent de manière active à l'amplification de ce phénomène. La conséquence principale de l'œdème péritumoral associé à l'effet de masse de la tumeur est le développement d'une hypertension intracrânienne (HTIC).

Une hydrocéphalie causée par un blocage des voies d'écoulement du liquide céphalo-rachidien lié au développement de la tumeur peut également participer à l'HTIC. La cavité crânienne est multicompartimentale. Lorsqu'il existe un gradient de pression entre deux compartiments communiquant par un passage rétréci, des structures parenchymateuses, prédisposées par leur situation anatomique normale, peuvent être poussées au contact du bord puis au travers de l'orifice dans lequel elles "s'engagent". Ce phénomène d'engagement se traduit par des atteintes neurologiques variables en fonction de la localisation.

4.2 Aspects biologiques

4.2.1 Cellules d'origine des gliomes

La cellule d'origine des gliomes reste inconnue et des travaux ont montré que l'induction de l'expression d'oncogènes entraîne la formation de gliomes que ce soit dans des cellules souches neurales, des progéniteurs gliaux ou bien des cellules gliales matures (Sanson *et al.* 2004).

Des cellules souches cancéreuses ont été identifiées au sein des glioblastomes, il s'agit de cellules tumorales qui expriment des marqueurs de cellules souches neurales normales (CD133, Prominin 1 ; Singh et al. 2003). Cela n'implique pas forcément qu'elles dérivent de

cellules souches neurales, et on peut envisager qu'elles proviendraient de la dédifférenciation de cellules plus matures (Stiles and Rowitch 2008).

L'intérêt pour ces cellules provient des expériences de xénogreffes qui ont montré que seules les cellules souches tumorales avaient la capacité d'induire une tumeur chez l'animal. De ces expériences découle l'hypothèse selon laquelle les cellules souches tumorales seraient à l'origine de la croissance de l'ensemble de la tumeur et également à l'origine des rechutes. Si cette hypothèse était validée, ce qui n'est pas encore formellement le cas, les cellules souches tumorales représenteraient alors une cible thérapeutique fondamentale (Ducray 2008).

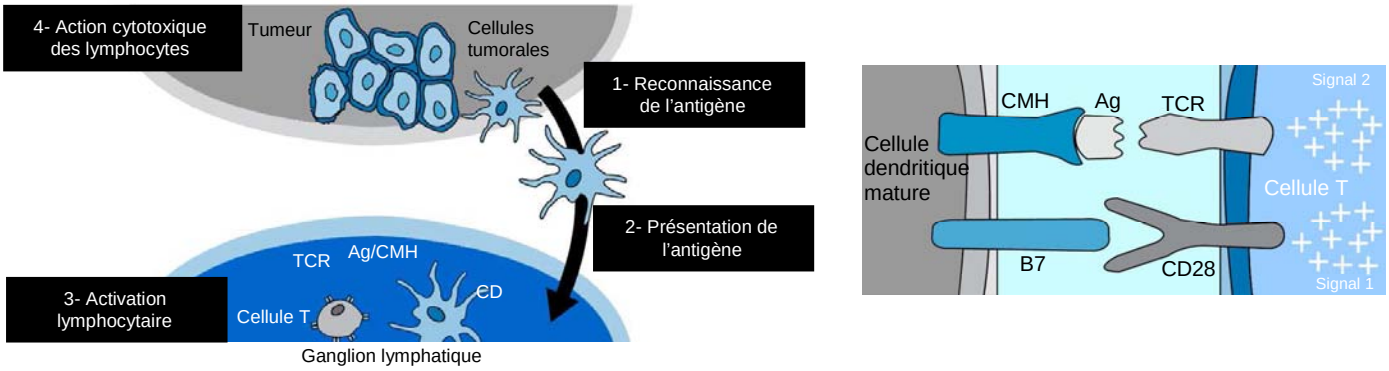
Des travaux ont également montré que ces cellules souches tumorales (CD133 positives) étaient plus résistantes à la radiothérapie et la chimiothérapie que les autres cellules tumorales (Bao *et al.* 2006a; Blazek *et al.* 2007; Liu *et al.* 2006). De plus, les cellules souches pourraient intervenir dans la promotion de l'angiogénèse via la sécrétion de VEGF (Bao *et al.* 2006b) et participer ainsi de manière active au développement tumoral. En accord avec ces données, l'équipe de (Blazek *et al.* 2007) a décrit que dans des conditions hypoxiques, il y avait un enrichissement en cellules exprimant le marqueur CD133.

Enfin, la capacité de différenciation variable des cellules souches tumorales des glioblastomes permettrait aussi de comprendre le caractère « multiforme » de ces tumeurs et pourquoi, certaines ont un phénotype plus astrocytaire, d'autres plus oligodendrogliale et d'autres enfin, expriment des marqueurs neuronaux (Ducray 2008).

4.2.2 Voies de signalisation et croissance tumorale

De nombreuses voies de signalisation sont suractivées et/ou surexprimées et participent activement à la prolifération, à l'agressivité et à la résistance aux différents traitements des glioblastomes. Parmi celles-ci, les voies JAK/STAT3 et PI3K/Akt, semblent jouer un rôle majeur dans la progression tumorale des glioblastomes. Ces voies sont mises en jeu suite à l'activation de divers récepteurs membranaires parmi lesquels EGFR, PDGFR, VEGFR, et le récepteur à l'interleukine-6 (IL-6).

A. Réponse anti-tumorale



B. Contournement par la cellule tumorale

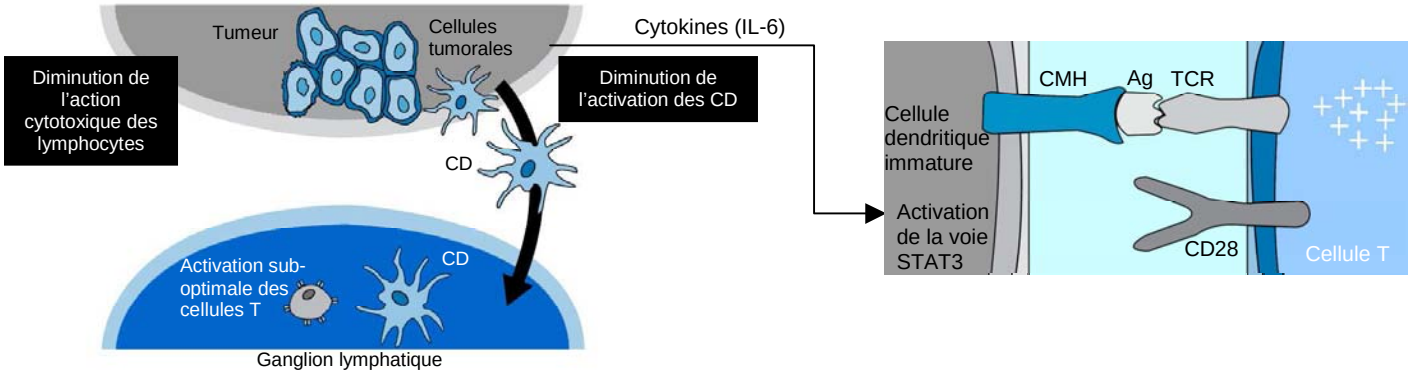


Figure 30. Les cellules dendritiques dans l'immunosuppression locale.
CD : cellule dendritique, CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité, Ag : Antigène, TCR : T Cell Receptor. D'après O'Neill *et al.* 2004.

4.2.3 Rôles des microvésicules

Il a été récemment décrit que les cellules de glioblastomes pouvaient relarguer des microvésicules qui contiennent de nombreux ARN messagers, des micro-ARN et des protéines angiogéniques (Skog *et al.* 2008). Les cellules au voisinage de la tumeur vont être réceptrices du contenu de ces microvésicules et les ARN tumoraux vont utiliser la machinerie de la cellule réceptrice pour être traduit en protéine. Parmi ces transcrits on note la présence de l'IL-6 mais aussi d'EGFR et d'EGFRvIII, son variant constitutivement activé, ce qui permet à la tumeur d'influencer son milieu environnant. Ce phénomène pourrait expliquer l'effet bystander en absence de contact cellulaire.

Ces microvésicules contiennent aussi EGFR, EGFRvIII et TGFβ sous forme protéique. Ces vésicules ont la capacité de franchir la barrière hématoencéphalique ce qui laisse penser que leur contenu peut agir dans la totalité de l'organisme une fois déversé dans la circulation sanguine systémique (Al-Nedawi *et al.* 2008; Graner *et al.* 2008).

4.2.4 Immunosuppression locale

Les tumeurs expriment des antigènes en conséquence des modifications génétiques et épigénétiques qui sont associées à la cancérogenèse. La présence d'antigènes sur le site tumoral conduit au recrutement de monocytes qui peuvent se différencier en macrophage ou en cellule dendritique (Gordon and Taylor 2005).

En conditions normales au niveau du SNC, les cellules dendritiques jouent un rôle de cellule présentatrice d'antigènes aux cellules T. Il y a une co-stimulation de la cellule T par les cellules dendritiques concomitante à la présentation de l'antigène. Celle-ci passe par l'expression du facteur B7 sur la membrane de la cellule dendritique et par son interaction avec le marqueur CD28 affiché par la cellule T. L'activation lymphocytaire qui suit va déclencher la libération de molécules activant la cascade apoptotique conduisant à la mort de la cellule (Figure 30A).

Ce processus se produit en réalité que très rarement sur le plan clinique car la cellule tumorale contourne ce mécanisme de défense immunitaire. Une sécrétion de cytokines et notamment d'IL-6 par la tumeur, active la voie de signalisation STAT3 dans les cellules dendritiques, ce qui a pour effet de diminuer la co-stimulation des cellules T en dessous de leur seuil d'activation (Figure 30B). On observe une absence d'expression de B7 sur la membrane des cellules dendritiques. La cellule tumorale se protège ainsi des actions cytotoxiques du système immunitaire de l'hôte (O'Neill *et al.* 2004).

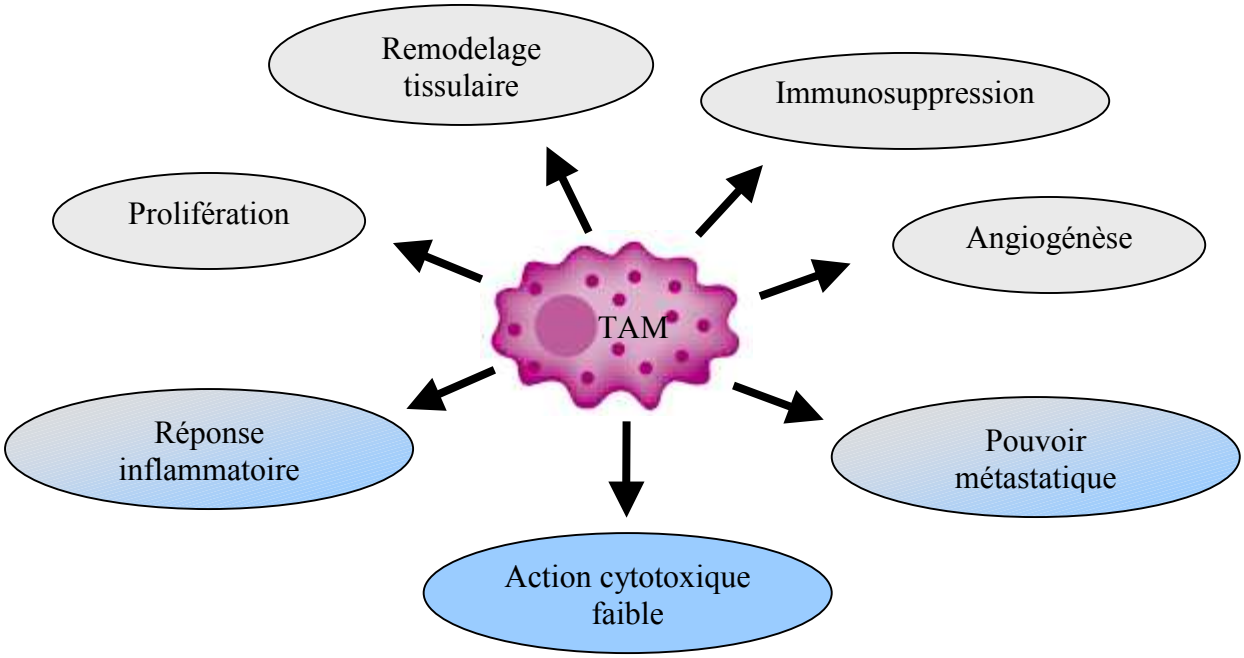


Figure 31. Rôles des macrophages associés aux tumeurs (TAM).
Fonctions des TAM-1 (bleu) et TAM-2 (gris), d'après Mantovani *et al.* 2002.

Les macrophages qui sont recrutés sur le site tumoral ou TAM (Tumor Associated Macrophages) peuvent évoluer en fonction des différents facteurs sécrétés par la tumeur ou le stroma. On distingue ainsi les TAM-1 qui auront au final des propriétés cytotoxiques faibles et une forte capacité de production de cytokines pro-inflammatoires des TAM-2 qui eux sont impliqués dans les processus de réponse inflammatoire, d'immunité adaptative, d'angiogénèse, de prolifération, et de remodelage et réparation tissulaire (Hussain *et al.* 2006; Mantovani *et al.* 2002; Van Ginderachter *et al.* 2006).

Les TAM agiraient aussi en augmentant le potentiel métastatique de la tumeur en produisant des enzymes et des régulateurs de la digestion des matrices extracellulaires (Figure 31).

Par ailleurs, la production d'interleukine 1β par le compartiment microglial conduit à une augmentation de la transcription de TGF-β par les cellules tumorales qui en retour contribue à l'immunosuppression (Grauer *et al.* 2007), à l'augmentation de l'expression et la sécrétion de VEGF (angiogénèse) et d'EGFR (prolifération cellulaire), mais aussi de MMP9 (matrix metalloproteinase 9, impliqué dans l'invasion (Watters *et al.* 2005), favorisant ainsi le phénotype malin des cellules tumorales (Hoelzinger *et al.* 2007).

5 Diagnostic

La découverte d'une tumeur cérébrale se fait par l'intermédiaire des signes cliniques. Ceux-ci dépendent de la localisation, ils correspondent à une souffrance du tissu cérébral et des nerfs crâniens.

Il peut s'agir d'une paralysie temporaire d'une partie du corps, crises d'épilepsie, troubles de la vue, perte de connaissance, troubles de l'équilibre, modifications inexpliquées de l'humeur et du comportement ou encore des maux de tête avec vomissements, troubles de la parole, surdité unilatérale, faiblesse, troubles de la coordination des bras, troubles de la sensibilité (Abrey and Mason 2003; Snyder *et al.* 1993).

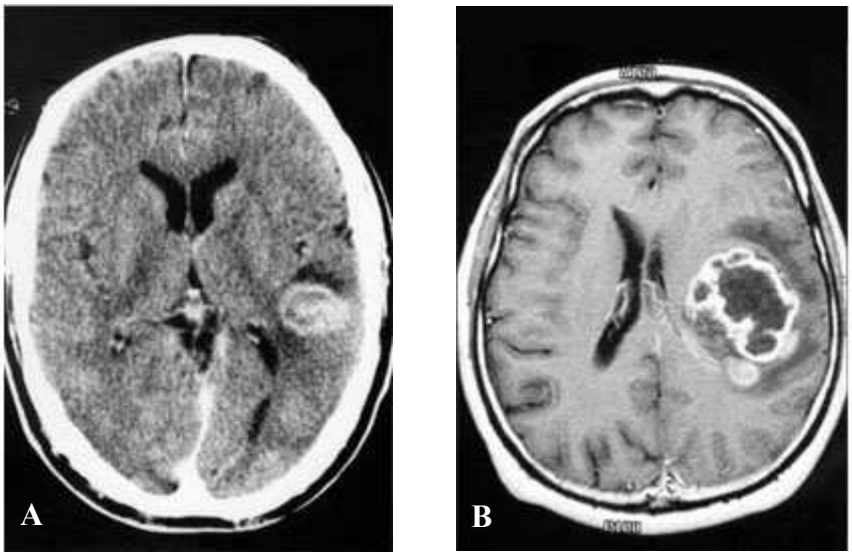


Figure 32. Aspect en imagerie des tumeurs cérébrales.
A, Scanner cérébral après injection de produit de contraste iodé. Le scanner permet de voir la tumeur qui apparaît clairement et concentre souvent le produit iodé. *B,* IRM ou Imagerie par Résonance Magnétique cérébrale après injection de produit de contraste : le gadolinium, qui s'accumule également sur le site tumoral. (Site Internet de l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs Cérébrales, www.artc.asso.fr).

Les crises d'épilepsie surviennent sans facteur déclenchant. Celles-ci révèlent la moitié des gliomes : 70% des patients porteurs d'un gliome de bas grade présentent une épilepsie contre 30% dans les glioblastomes. Il y a donc moins d'épilepsie dans les tumeurs de grade élevé. L'hypertension intra-crânienne (HTIC) se manifeste par des céphalées permanentes, rétro-orbitaires surtout le matin, des vomissements, une photophobie, un oedème papillaire du fond de l'œil, et des troubles de la vigilance. Plus de 50% des patients souffrant d'une tumeur cérébrale sont atteints d'HTIC. Les principaux signes focaux observés sont l'hémiplégie et l'aphasie, d'installation progressive et quelquefois sujet à une aggravation brutale à cause de saignements intratumoraux, d'une poussée d'œdème péritumoral ou du blocage de l'écoulement du LCR avec HTIC brutale. Chez les enfants, on observe le plus souvent une ataxie, des crises d'épilepsie et des céphalées dues à un syndrome d'HTIC.

A l'apparition de ces signes ou suite à une aggravation récente des troubles, un examen d'imagerie (scanner cérébral ou IRM, Figure 32) est réalisé afin de déceler la présence d'une masse anormale. Si les données d'imagerie permettent de suspecter une tumeur alors une biopsie est effectuée afin de confirmer le diagnostic et de préciser le type histologique tumoral. Il existe différentes techniques d'imagerie dont l'utilisation couplée permet d'obtenir différentes informations sur la tumeur. Le scanner sans ou après injection montre les tumeurs car elles prennent le contraste grâce à leur vascularisation, et à l'œdème péritumoral fréquent dans le cas des tumeurs cérébrales. Pour visualiser une hypervascularisation tumorale, le praticien peut aussi faire appel à l'angiographie (IRM ou scanner). L'IRM avec ou sans injection de galodinium va permettre de préciser le caractère unique ou multiple de la tumeur.

Afin de différencier les radionécroses des récidives (métaboliquement plus actives) une exploration du métabolisme glycolytique des gliomes est rendue possible par Tomographie par Emission de Positons (TEP) par l'intermédiaire du 18 fluoro-déoxyglucose (FDG). L'accroissement de la captation tumorale du FDG est corrélé à la capacité de prolifération cellulaire et au degré d'atypie ou de malignité. Au contraire des tumeurs de bas

grade et autres lésions bénignes, des cicatrices, des nécroses; les gliomes de haut grade (III et IV) présentent une captation importante du FDG. La TEP peut être employée pour assister les chirurgiens dans la réalisation de biopsies stéréotaxiques afin de cibler l'endroit où l'on a observé la plus haute concentration de FDG. Les gliomes les plus fixants sont ceux de plus haut grade et de plus mauvaise évolution : récidives accrues, survie moindre (Lomeña 2008).

6 Facteurs pronostiques

Certaines variables, les facteurs pronostiques, sont des indicateurs puissants de l'évolution de la maladie. Le diagnostic histologique et les difficultés qui lui sont associées principalement au niveau de la variabilité intra et inter-observateurs rendent délicates les informations obtenues sur la survie et le grade tumoral. Cependant il a été démontré que les patients atteints de glioblastome avaient une médiane de survie inférieure à celle des patients atteints de gliomes anaplasiques. Contrairement à la plupart des autres cancers, la taille d'un gliome malin, qui peut être déterminée grâce aux techniques d'imagerie, n'a que peu d'influence sur le pronostic. De toutes les variables étudiées, l'âge du patient, est celle qui souffre le moins de discussion. La médiane de survie des patients atteints d'un gliome malin passe ainsi de 31,7 mois avant 40 ans à 11,2 mois entre 40 et 60 ans ; enfin à 8,4 mois au-delà de 60 ans (Chang *et al.* 1983). Dans cette même étude, les auteurs ont montré une association entre l'âge et le grade histologique. L'état fonctionnel du patient est également une donnée pronostique importante qui va orienter l'approche thérapeutique envisagée. Bien que la survie des patients soit dépendante de nombreuses variables (âge, localisation tumorale, traitement,…) il a été décrit que la survie est supérieure à 5 ans pour les astrocytomes de grade II, de 3 à 5 ans pour les astrocytomes de grade III et voisine de 1 an pour la majorité des glioblastomes (grade IV, Kleihues P 2000).

7 Traitements

7.1 Traitement symptomatique médical

Les premiers objectifs du traitement médical sont de traiter les symptômes afin d'améliorer le confort de vie des patients en ciblant notamment l'HTIC et l'épilepsie. Les

corticoïdes sont également très souvent utilisés par le corps médical. Leur efficacité, basée sur une amélioration clinique dans les 24 heures suivant l'administration, passerait par l'augmentation de la clairance de l'œdème cérébral.

7.2 Chirurgie

Dans le cas des gliomes la chirurgie d'exérèse tumorale est communément admise puisqu'elle possède au moins le mérite de réduire non seulement l'hypertension intracrânienne mais aussi l'éventuel déficit neurologique induit par l'effet de masse. La décision d'un traitement chirurgical d'une tumeur cérébrale se fonde sur des éléments multiples prenant en compte l'histoire clinique, l'examen neurologique, les données d'explorations radiologiques. La complexité de cette décision est encore accrue par la nécessité d'évaluer les risques propres de l'intervention et le bénéfice que le patient peut en retirer sachant qu'elle peut conduire à la guérison dans le cas des tumeurs bénignes et à l'allongement de la survie s'il s'agit d'une tumeur maligne.

Si une exérèse chirurgicale complète est le plus souvent possible dans les tumeurs bénignes extracérébrales (méningiomes), elle ne peut que rester subtotale ou partielle dans le cas des tumeurs gliales. Ainsi, en dehors du cas des astrocytomes pilocytiques qui présentent une interface très nette avec le tissu voisin, les autres tumeurs gliales se caractérisent par une infiltration plus ou moins élevée dans le parenchyme cérébral. La réalisation de biopsie stéréotaxique permet d'obtenir une certitude diagnostique. Elle représente la solution dans le cas de contre-indication à une intervention d'exérèse. Cette dernière technique permet de définir la position d'une structure grâce à un système de coordonnées dans l'espace et de l'atteindre pour procéder à un traitement ou un prélèvement.

7.3 Chimiothérapie

Le traitement de référence des gliomes malins associe l'exérèse chirurgicale et la radiothérapie. La chimiothérapie se fait après la chirurgie, en complément de la radiothérapie ou seule, mais son efficacité n'est pas maximale. Cela est à rapprocher du caractère hautement chimiorésistant de ces tumeurs mais aussi du franchissement de la barrière hémato-encéphalique.

Le manque d'effet significatif a justifié différentes stratégies pour l'administration de la chimiothérapie. Celle-ci peut être réalisée immédiatement après la chirurgie et la radiothérapie (adjuvante) soit en cas de récidive soit en première intention dans le cas de tumeurs inopérables avant la radiothérapie (néo-adjuvante). Jusqu'à très récemment les agents les plus utilisés en conditions adjuvantes étaient les nitroso-urées BCNU et PCV (CCNU-procarbazine-vincristine). Les médianes de survie des patients n'étaient pas augmentées de manière significative ou bien seulement dans des proportions modestes (2001).

Un essai clinique récent avec le témozolomide, agent alkylant de dernière génération, associé à une radiothérapie concomitante, a mis en évidence un gain de médiane de survie (12.1 *vs* 14.6 mois) et un gain de survie à 2 ans (10 *vs* 27%) chez les patients atteints de GBM (Stupp *et al.* 2005). Aussi l'utilisation du temozolomide associée à la radiothérapie est devenue le standard dans le traitement des GBM

A la différence des glioblastomes qui répondent mal à la chimiothérapie, l'utilisation de PCV permet d'obtenir 75% de réponse dans les oligodendrogliomes anaplasiques et une réponse complète dans 38% des cas. Cette chimiosensibilité a été corrélée à la perte des chromosomes 1p et 19q (Bauman *et al.* 2000; Cairncross *et al.* 1998; Giannini *et al.* 2008).

7.4 Radiothérapie

Elle est utilisée dans le traitement des tumeurs aussi bien bénignes que malignes. La tolérance des tissus sains voisins est une limite à la prescription d'une dose suffisamment élevée pour être tumoricide.

Le bénéfice apporté par radiothérapie dans le traitement des glioblastomes a été établi il y a environ 30 ans (Walker *et al.* 1980; Walker *et al.* 1979). Le fractionnement classique, de 1.8 à 2 Gy par séance et de 5 séances par semaine, établi empiriquement est encore la référence pour maîtriser l'effet différentiel. Depuis une dizaine d'années, la mise au point de la technique de radiothérapie conformationnelle permet de réduire l'irradiation des tissus sains tout en autorisant de bons critères d'homogénéité requis à l'intérieur du volume cible (Pontvert *et al.* 2004). Cette homogénéité dans le volume cible distingue la radiothérapie fractionnée de la radiochirurgie et de la curiethérapie qui sont, elles, associées à une variabilité à l'intérieur de ce volume.

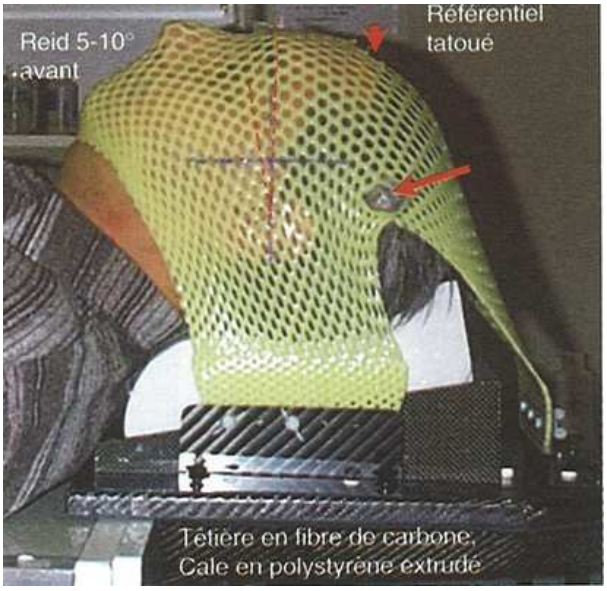


Figure 33. Système d'immobilisation du patient pendant l'irradiation.
Le masque thermoformé sur une têtière en fibre de carbone fixée en bout de table et l'utilisation d'un référentiel tatoué sur la partie haute du crâne permettent un maintien reproductible de la position du patient (Pontvert *et al.* 2004).

Cibles	Fonction	Agent	Phase de développement clinique
Intégrines	Angiogénèse	Cilengitide	1/2
VEGF	Angiogénèse	Bevacizumab Vatalanib Cediranib	1/2/3 1/2 1/2/3
PKC	Angiogénèse	Enzastaurin	1/2/3
PDGF	Angiogénèse	Imatinib Sunitimib	2/3 2
EGFR	Prolifération, survie	Gefitinib,Erlotinib	1/2
mTOR	Progression du cycle cellulaire, croissance tumorale	Sirolimus Temsirolimus Everolimus	1/2 1/2 2

Tableau 9. Thérapies ciblées dans les glioblastomes.
D'après Mladkova and Chakravarti 2009.

La radiochirurgie est une approche en plein développement dans le traitement des tumeurs cérébrales. Par la radiothérapie fractionnée, on tend à palier le fait que le tissu tumoral est plus résistant à l'irradiation que les structures cérébrales impliquées dans le champ d'irradiation par une sélectivité biologique (fractionnement). Au contraire, avec la radiochirurgie, c'est la sélectivité topographique où l'essentiel de l'énergie est délivré à la structure cible qui tend à épargner les structures saines adjacentes.

Un des points clé de la bonne réalisation du traitement de radiothérapie des tumeurs cérébrales passe par le système d'immobilisation du patient qui se doit d'être reproductible tout en étant confortable. Celui-ci est basé sur l'utilisation d'un masque thermoformé et d'une cale adéquate pour faire reposer la tête (Figure 33). La définition des volumes cibles est ensuite réalisée grâce aux données issues de l'imagerie.

7.5 Thérapies ciblées

On assiste à l'émergence de nouvelles stratégies anticancéreuses dans les glioblastomes. Ces thérapies ciblées découlent d'une meilleure connaissance des voies de signalisation et des acteurs moléculaires impliqués dans l'oncognénèse des gliomes. Toutefois l'ensemble des signaux intracellulaires sont très complexes et ils peuvent être complémentaires et/ou convergents ce qui rend l'identification des cibles thérapeutiques longue et difficile. Actuellement plusieurs acteurs sont la cible d'essais cliniques comme : EGFR, mTOR, PDGF, VEGF, PKC, et les intégrines αVβ3 et αVβ5 (Tableau 9, Mladkova and Chakravarti 2009; Omuro et al. 2007).

Parmi les altérations génétiques, l'absence de méthylation (inactivation) du promoteur de la MGMT (méthylguanine-DNA méthyltransférase) a été associée à une résistance au BCNU (4% vs 63%) et à un intervalle libre de progression diminué (8 mois vs 21 mois) dans les glioblastomes (Esteller et al. 2000).

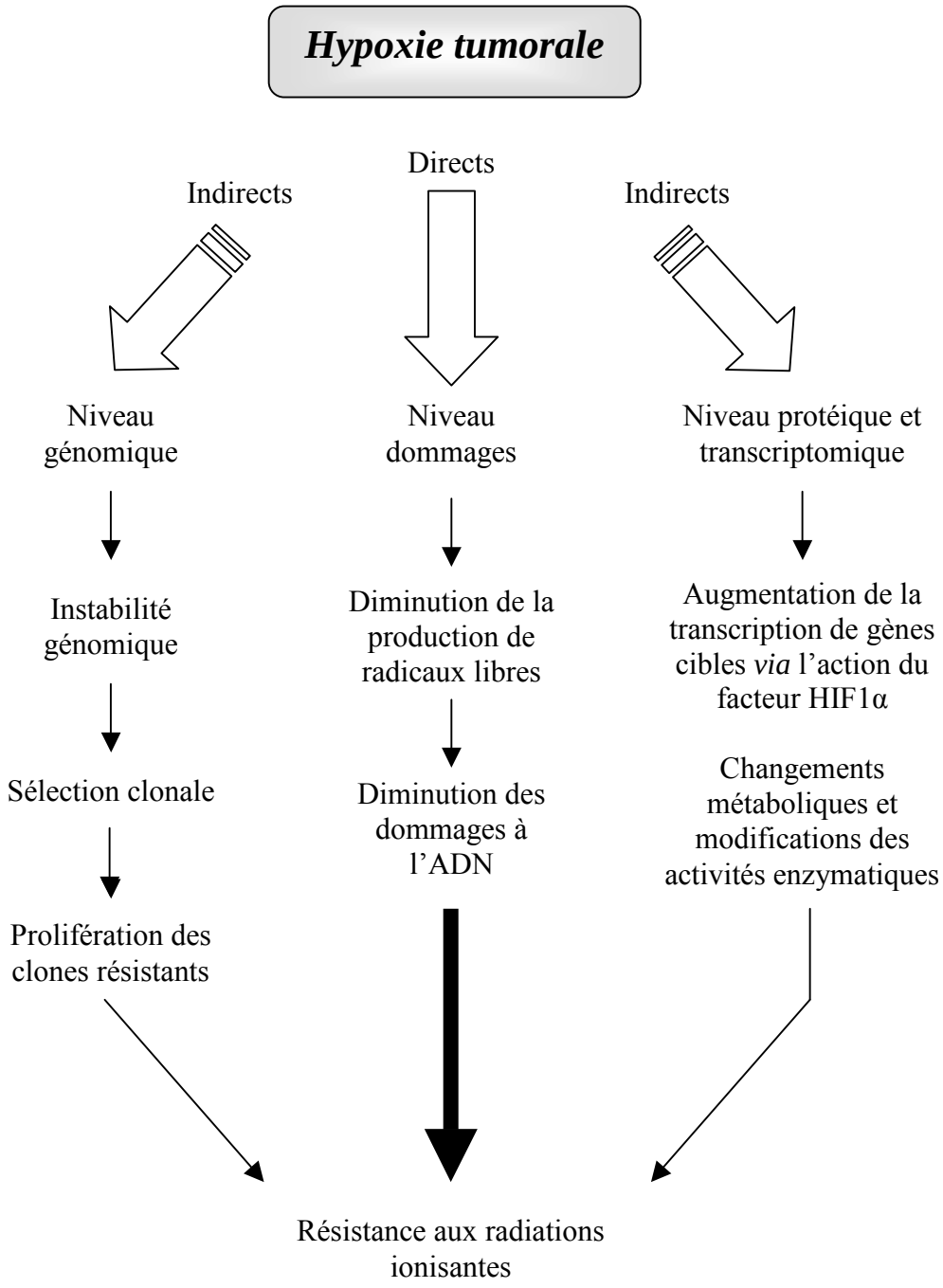


Figure 34. L'hypoxie dans la radiorésistance tumorale.
D'après Harrison and Blackwell 2004.

III Facteurs tissulaires influençant la radioréponse des glioblastomes

1 Principes généraux

L'échec du traitement radiothérapique chez les patients atteints de glioblastomes est dû à une résistance aux radiations ionisantes qui se manifeste par une récidive le plus souvent à l'intérieur même du volume irradié (Bleehen and Stenning 1991; Walker *et al.* 1980; Walker *et al.* 1979).

Pendant très longtemps la radiothérapie expérimentale a été dominée par le concept des R qui furent d'abord au nombre de quatre : Réparation des lésions induites, Redistribution dans le cycle cellulaire, Repopulation et Ré-oxygénation durant le traitement, puis cinq avec l'introduction de la Radiosensibilité intrinsèque (Fertil and Malaise 1981).

2 Hypoxie

L'hypoxie et l'anémie (qui contribue à l'hypoxie de la tumeur) peuvent conduire à la résistance aux radiations ionisantes (Harrison and Blackwell 2004). Cette hypoxie est étroitement liée à l'architecture tumorale, laquelle varie en fonction de la micro-vascularisation et du débit sanguin. Le débit intra-tumoral peut être affecté par des *shunts* vasculaires et par un détournement du flux sanguin en faveur du tissu sain environnant mieux vascularisé (Jain 1988). L'augmentation de la pression interstitielle associée au développement tumoral contribue également à la diminution de la perfusion.

Tout d'abord, la privation de la tumeur en oxygène conduit à une baisse des effets biologiques directs de l'irradiation. En effet, le manque d'oxygène sur le site tumoral provoque une baisse des radicaux libres et donc une baisse des lésions d'ADN potentielles. Le caractère hypoxique des cellules tumorales leur permet donc d'éviter l'apparition de cassures létales ou du moins d'altérations normalement associées à un arrêt du cycle voire à un engagement vers l'apoptose (Figure 34).

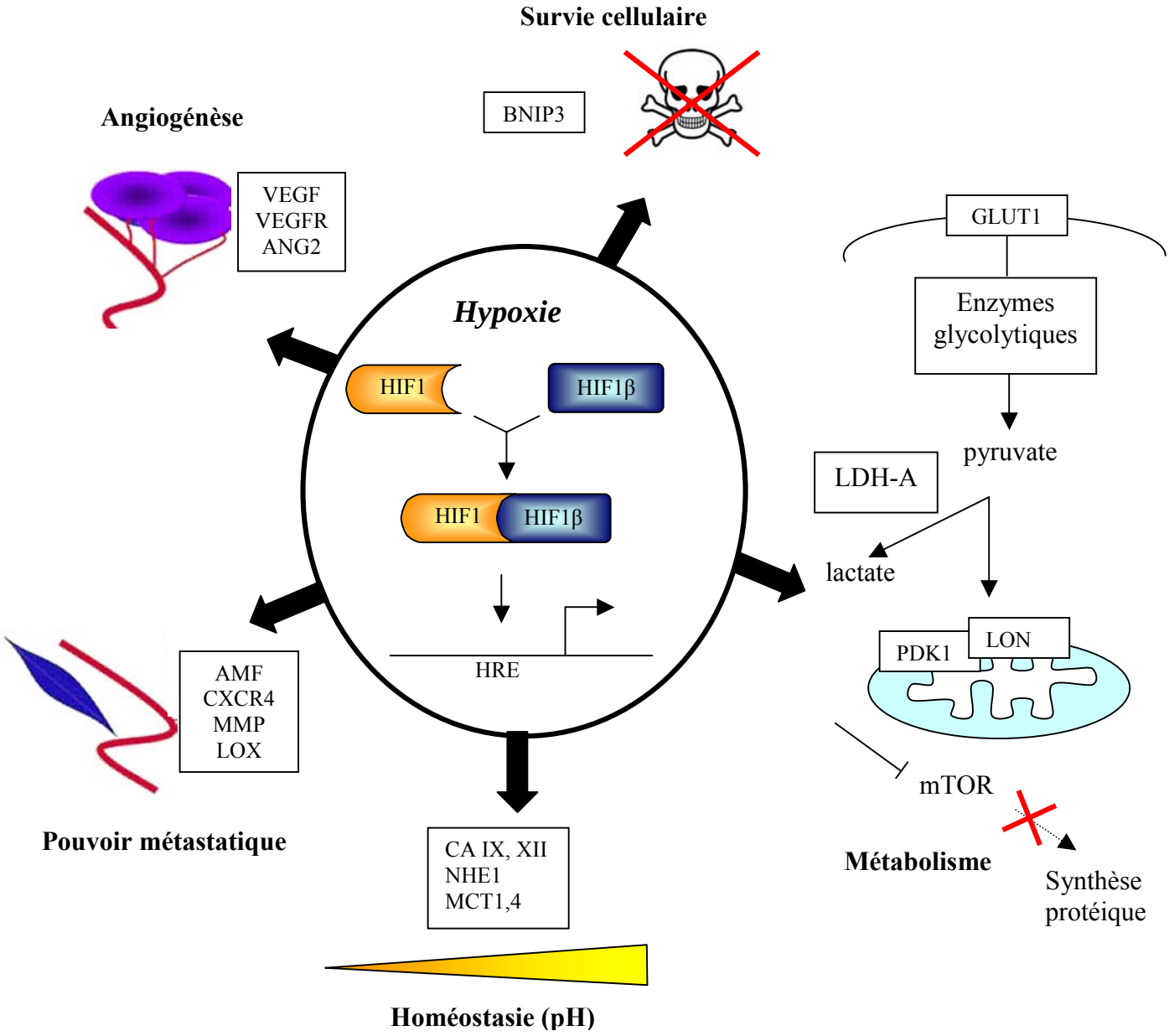


Figure 35. Gènes cibles de HIF1α.
AMF autocrine motility factor; CXCR4 cytokine (C-X-C motif) receptor 4; MMP matrix metalloproteinase; LOX lysyl oxidase; BNIP3 Bcl-2/adenovirus EIB 19 kDa-interacting protein 3; BNIP3L Bcl-2/adenovirus EIB 19 kDa-interacting protein 3 like; CA IX, XII carbonic anhydrase; MCT1, 4,monocarboxylate transporter; NHE1 Na+/H+ Exchanger; GLUT1 glucose transporter 1; LDH-A lactate dehydrogenase-A ; LON, mitochondrial protease; NOXA; PDK1 pyruvate dehydrogenase kinase 1; ANG-2 angiopoïetin-2; VEGF-R1, vascular endothelial growth factor receptor, VEGF vascular endothelial growth factor. D'après Brahimi-Horn *et al.* 2007.

L'hypoxie favorise également la radiorésistance par des effets indirects. Une instabilité génétique est fréquemment observée dans des conditions hypoxiques notamment par amplification génique (Fischer *et al.* 2008) générant ainsi une pression de sélection supplémentaire favorable par exemple à l'émergence de clone muté pour p53 (Fischer *et al.* 2008; Harrison and Blackwell 2004).

Elle va aussi induire des modifications du niveau d'expression de nombreux gènes. La majeure partie de ces effets passe par l'accumulation du facteur de transcription HIF1α qui est associée à l'hypoxie. Ce facteur après hétérodimérisation avec HIF1β (ARNT) va migrer dans le noyau (Wang *et al.* 1995) afin de se lier aux séquences cibles HRE (Hypoxia Response Element) présentes au niveau des régions régulatrices des gènes cibles. Parmi eux certains sont impliqués dans l'angiogénèse, le métabolisme, la régulation du pH, l'homéostasie et le pouvoir métastatique (Brahimi-Horn *et al.* 2007, Figure 35).

HIF1 régule aussi des gènes intervenant dans l'équilibre survie/mort cellulaire avec notamment la régulation de l'expression des protéines BNIP3 dont le rôle est assez complexe et largement débattu dans la littérature puisqu'elles pourraient agir en tant qu'acteur pro-ou anti-apoptotique (Burton and Gibson 2009). BNIP3 passerait d'une localisation nucléaire à une localisation cytoplasmique favorable à son interaction avec la mitochondrie déclenchant ainsi la cascade apoptotique intrinsèque. BNIP3 a été décrit comme fortement exprimée dans les glioblastomes. Toutefois, en condition hypoxique, BNIP3 resterait nucléaire dans certaines cellules de glioblastomes exerçant ainsi une action anti-apoptotique (Burton *et al.* 2006). Récemment, une étude a montré que lorsque BNIP3 était nucléaire, il reconnaissait et réprimait le promoteur du gène AIF (Burton *et al.* 2009).

Le blocage de la voie mTOR permettrait, en diminuant la synthèse protéique, une économie d'énergie pour la cellule favorable à son adaptation et à sa survie à l'hypoxie (Pouyssegur *et al.* 2006).

3 Angiogénèse

Les vaisseaux néoformés, notamment suite à l'induction de l'expression du gène *VEGF* par HIF1α, ont perdu les caractéristiques des vaisseaux fonctionnels. Ainsi, ils possèdent des assises de cellules endothéliales mais pas de récepteurs de vasoconstriction/vasodilatation et pas de structures musculaires contractiles (Lartigau 2008). Ces néovaisseaux sont plutôt apparentés à des tubes vasculaires et ils présentent de nombreux *shunts*. Ces modifications vont abaisser la capacité de cette vascularisation à délivrer des macromolécules dans l'environnement tumoral, phénomène accru par la pression interstitielle intra-tumorale. Dans ces conditions la dissociation entre l'hémoglobine et l'oxygène est moins efficace participant ainsi activement à l'hypoxie tumorale.

Les travaux de Miyagami *et al.* (1998) ont été les premiers à décrire une production de VEGF par les cellules gliales. La surexpression de *VEGF* a, par la suite, été associée avec le grade histologique de la tumeur (Chan *et al.* 1998; Weindel *et al.* 1994). Bien que VEGF participe à la vascularisation, l'oxygénation et la croissance des gliomes, il ne semble pas être impliqué dans la progression des astrocytomes anaplasiques en glioblastomes (Sonoda *et al.* 2003).

De nombreux facteurs peuvent conduire à l'activation transcriptionnelle du gène V*EGF*. L'oncostatine M (Repovic *et al.* 2003) et l'interleukine-6 (Cohen *et al.* 1996; Loeffler *et al.* 2005) ont été décrites pour leur capacité à induire une augmentation de l'expression de VEGF dans les tumeurs gliales. Plus récemment, Zhang *et al.* (2008) ont montré une surexpression du facteur de transcription Foxm1 (Forkhead Box m1) dans les glioblastomes, facteur qui active également la transcription de *VEGF*.

4 Réparation des lésions induites et redistribution dans le cycle cellulaire

On admet généralement que les arrêts de la progression du cycle cellulaire (cf 3.2.3) permettent aux mécanismes de réparation d'œuvrer pour prévenir les anomalies de réplication ou les aberrations chromosomiques avant le passage en mitose (cf 3.2.2). Ce phénomène est connu sous le nom de redistribution radio-induite. La capacité des cellules tumorales à réparer, fidèlement ou non, les lésions induites par l'irradiation influence la réponse tissulaire globale à l'irradiation. La prolifération cellulaire va prendre le dessus sur les pertes cellulaires radio-induites conduisant à une croissance de la masse tumorale.

5 Repopulation et ré-oxygénation durant le traitement

Consécutivement à l'irradiation survient une phase de régression tumorale, puis la tumeur recommence à croître au moment où la production cellulaire, reliée à la division des cellules descendantes des cellules demeurées viables, l'emporte sur l'élimination des cellules non viables. L'étude de ce phénomène (Malaise *et al.* 1972; Tubiana *et al.* 1968) avait montré que la vitesse de croissance du nombre de cellules tumorales est accélérée après l'irradiation. Ce phénomène a été confirmé après mesure de l'évolution du nombre de cellules clonogènes (c'est à dire capable de donner naissance à une colonie cellulaire après irradiation) et appelée repopulation. Cette accélération est due essentiellement à l'entrée en cycle de cellules quiescentes, phénomène appelé recrutement. Elle survient dans les tumeurs expérimentales environ 10 à 12 heures après l'irradiation puis diminue progressivement pour revenir à sa valeur initiale.

Les mécanismes de ré-oxygénation tumorale sont mal connus. Lors d'une irradiation fractionnée, étalée sur plusieurs semaines, la régression tumorale observée entraîne une meilleure vascularisation de la tumeur résiduelle, les cellules tuées et les débris cellulaires étant éliminés. De plus, la régression du volume tumoral lève certaines compressions et améliore le flux sanguin. Le degré de ré-oxygénation dépendrait de la nature de la tumeur, du fractionnement et de l'étalement de la dose d'irradiation. Il existe une grande disparité parmi les tumeurs humaines et il est admis que les tumeurs les plus radiosensibles présenteraient une ré-oxygénation supérieure aux tumeurs plus résistantes (Lartigau 2008).

6 Rôles de l'interleukine-6 dans la radiorésistance des glioblastomes

L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine multifonctionnelle produite par de nombreuses tumeurs solides humaines dont les tumeurs gliales. Les résultats convergents de plusieurs équipes suggèrent que l'IL-6 serait impliquée dans la résistance des gliomes à la radiothérapie. Après la description de cette voie de signalisation, son implication dans la radiorésistance des glioblastomes sera abordée.

6.1 L'interleukine-6

L'interleukine-6 est une cytokine qui du fait de son action pléiotropique fut historiquement découverte par plusieurs équipes de manière concomitante. Ce n'est que le séquençage de l'ADNc qui permettra de statuer que les protéines BSF-2, IFN-β2 et la protéine de 26KDa n'était qu'une seule et même protéine, l'Interleukine-6 (Van Snick 1990).

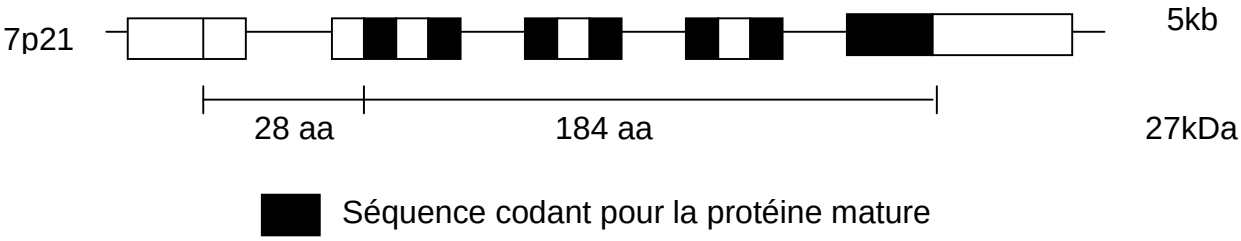


Figure 36. Structure du gène de l'interleukine-6 (*IL-6*).
D'après Yasukawa *et al.* 1987.

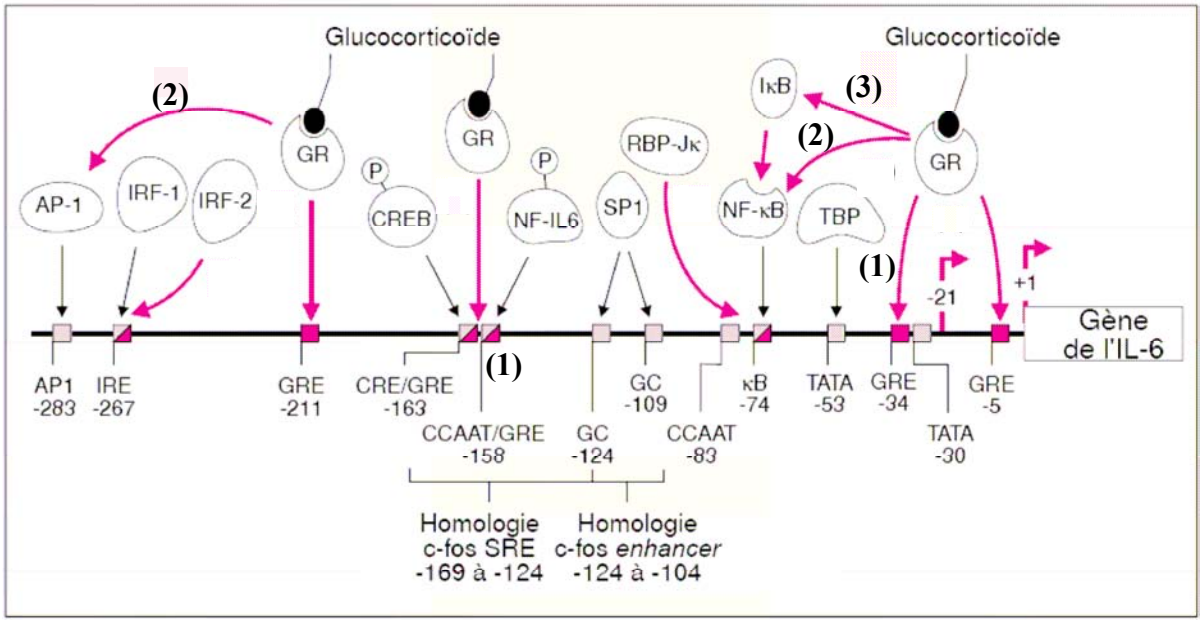


Figure 37. Régulation transcriptionnelle du gène *IL-6*.
Les flèches noires indiquent une activation alors que les flèches rouges indiquent une répression de l'activité transcriptionnelle. D'après Vallières and Rivest 2000.

L'interleukine-6 ou IL-6 fait partie de la famille des interleukines-6 comprenant également l'interleukine 11 ou (IL-11), le Leukemia Inhibitory Factor (LIF), l'Oncostatine M (OSM), le Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), la Cardiotrophine-1 (CT-1) et les cardiotrophin-like cytokines (CLC). Ce groupe est basé sur la présence au niveau du récepteur spécifique à chaque médiateur d'une sous unité commune, la sous unité gp130 (Heinrich *et al.* 1998).

6.1.1 Structure et régulation du gène *IL-6*

Le gène codant pour l'IL-6 est situé sur le bras court du chromosome 7 (7p21). L'organisation de ce gène comporte 5 exons et 4 introns pour une longueur d'environ 5Kb (Figure 36, Kamimura *et al.* 2003; Yasukawa *et al.* 1987). Ce gène code une protéine de 212 acides aminés incluant un peptide signal de 28 acides aminés (Hirano *et al.* 1986).

De nombreux sites de régulation transcriptionnelle sont présents en amont du gène et permettent une régulation fine de son expression. On observe notamment l'existence de trois TATA Box pouvant être utilisées selon les différents tissus (Yasukawa *et al.* 1987). Certains facteurs de transcription comme NF-κB, NF-IL-6, SP1, CREB, IRF-1 et AP-1 sont impliqués dans la stimulation de l'activité du promoteur de l'IL-6 ; alors que le facteur RBP-Jκ, le récepteur des glucocorticoïdes (GR), et celui des œstrogènes (ER) exercent un rôle répresseur (Vallières and Rivest 2000). Les radiations ionisantes induisent une activation rapide du promoteur de l'interleukine-6 par l'intermédiaire du facteur NF-κB et dans une moindre mesure par le facteur AP-1 (Brach *et al.* 1993).

Les glucocorticoïdes sont les principaux acteurs assurant le contrôle de la transcription de l'*IL-6* après son activation par différents signaux (Dumont *et al.* 1998). Après son activation consécutive à la fixation d'un glucocorticoïde, le récepteur GR migre du cytoplasme vers le noyau où il s'associe à plusieurs séquences cibles situées dans le promoteur de l'*IL-6*. Ce récepteur tout d'abord pouvoir entrer en compétition avec les protéines du complexe d'initiation ainsi que des activateurs de la transcription (1). D'autre part, il peut prévenir l'action des facteurs de transcription en interagissant directement avec eux comme pour le complexe AP-1 ou NF-κB (2). Son action peut enfin être indirecte (3) par la stimulation de la transcription d'acteurs inhibiteurs tels que IκB qui empêche l'action de NF-κB (Figure 37).

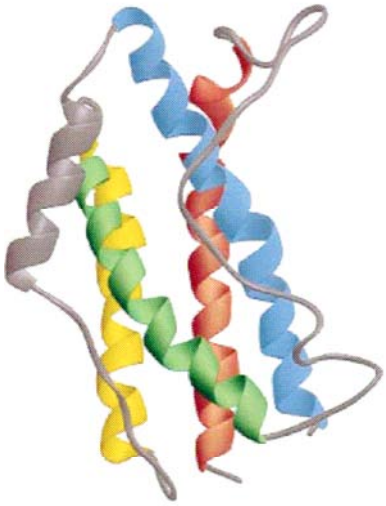


Figure 38. Cristallisation de l'Interleukine-6.
La cristallisation de l'Il-6 a montré une organisation en quatre hélices α longues : A (rouge), B (vert), C (jaune), D (bleu) et une boucle E (gris) les reliant (Heinrich *et al.* 1998).

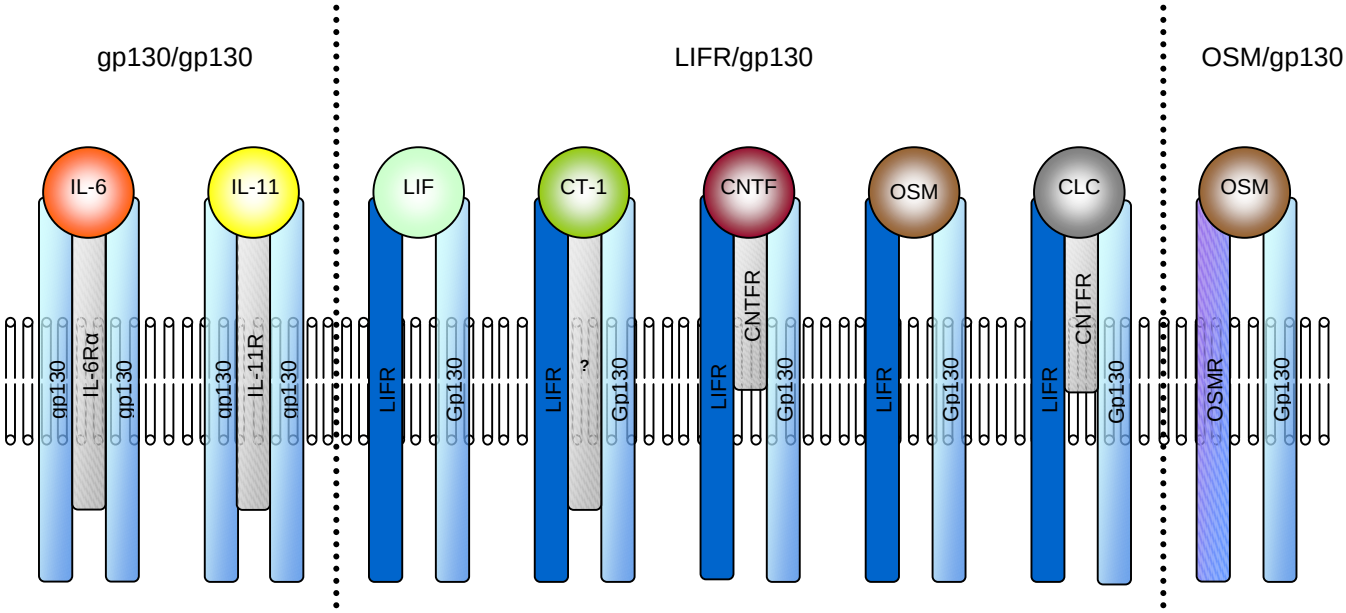


Figure 39. Organisation structurale des récepteurs de la famille des interleukines-6.
LIFR : LIF receptor, OSMR : OSM receptor, CNTFR : CNTF receptor. D'après Heinrich *et al.* 2003.

Dans des conditions basales, la répression serait occasionnée, du moins en partie, par l'inhibition de NF-κB par l'IκBα ou l'occupation du site κB par le facteur RBP-Jκ qui bloquerait partiellement l'accès au complexe NF-κB. Le facteur négatif IRF-2 pourrait également entrer en compétition avec IRF-1 pour le site IRE. Les produits des gènes suppresseurs de tumeur p53 et pRB ont également été décrits comme exerçant une activité de répresseur sur l'activité du promoteur de l'*IL-6* (Santhanam *et al.* 1991).

La protéine IL-6 (27KDa) possède 4 résidus cystéine permettant la formation de deux ponts disulfures (Cys 45–Cys 51 et Cys 74-Cys 84) et 2 sites (résidus 45 et 144) de N-glycosylation (Cavaillon 1996). Sa cristallisation a montré une organisation en 4 hélices majeures (A, B, C, et D) ainsi que d'une mini hélice E (Figure 38, Heinrich *et al.* 1998). L'IL-6 est une protéine sécrétée que l'on peut retrouver dans la circulation sanguine complexée à l'α2-macroglobuline.

6.1.2 Le récepteur à l'interleukine-6

L'IL-6 peut être produite par de nombreuses cellules telles que les macrophages, lymphocytes T, lymphocytes B, cellules Natural Killer (NK), fibroblastes ainsi qu'un certain nombre de cellules tumorales. Elle peut agir localement ou être acheminée par la circulation sanguine vers ses organes cibles où elle exercera son action *via* son récepteur (Kamimura *et al.* 2003).

Les membres de la famille des interleukines-6 sont caractérisés par un récepteur comprenant au moins un exemplaire de la sous-unité gp130 (130KDa). Les cytokines IL-6, IL-11 et CNTF lient également une autre sous unité α, IL-6Rα (gp80, 80KDa), IL-11R et CNTFR respectivement (Figure 39). Cette deuxième sous unité assure une liaison spécifique du ligand sur son récepteur (Heinrich *et al.* 2003). Une sous unité similaire semble également exister dans la constitution du récepteur à la cardiotrophine 1 (CT-1) mais elle reste encore mal connue (Robledo *et al.* 1997). L'IL-6 et l'IL-11 sont les seules cytokines à présenter un dimère de la sous unité gp130 dans leur récepteur fonctionnel. Les autres cytokines lient un hétérodimère entre gp130 et LIFR (LIF, CNTF, CT-1 et CLC) ou bien entre gp130 et OSMR. Il faut noter que l'oncostatine M à la capacité de se lier à deux types d'hétérodimères gp130-OSMR ou bien gp130-LIFR. Enfin, LIF et OSM n'engagent pas de sous unité α pour avoir un récepteur fonctionnel (Heinrich *et al.* 1998; Senaldi *et al.* 1999).

Si l'expression de la sous unité gp130 est considérée comme ubiquitaire celle de gp80 est quant à elle réduite à certains types cellulaires. Cependant, gp80 peut également exister sous deux formes solubles (sgp80) qui sont générées par clivage protéolytique ou bien par épissage alternatif. Ces formes solubles exercent une action agoniste du récepteur membranaire (Jones *et al.* 2001). En association avec les formes solubles de gp80, l'IL-6 est donc capable d'agir dans la plupart des tissus de l'organisme (Kamimura *et al.* 2003). Il existe aussi une forme soluble de gp130 (sgp130) issue d'un épissage alternatif mais qui au contraire de sgp80 agit en tant qu'antagoniste de la forme membranaire gp130 (Jostock *et al.* 2001).

D'un point de vue cinétique, la protéine IL-6 libre se lie dans un premier temps à gp80 qui peut être fixée à la membrane ou sous forme soluble. Ce complexe s'associe ensuite à la sous-unité membranaire gp130. Le complexe tri-moléculaire résultant (IL-6/gp80/gp130, 1/1/1) n'est pas capable d'induire une transduction de signal (Chow *et al.* 2001). Il faut l'interaction entre deux complexes tri-moléculaires pour former un super-complexe hexamérique comprenant deux molécules d'IL-6, de gp80 et de gp130 (Ward *et al.* 1994) qui est alors pleinement fonctionnel (Figure 40).

6.1.3 Signalisation intracellulaire induite par l'IL-6

Au niveau intracytoplasmique, la sous unité gp130 n'est pas dotée d'une activité kinase intrinsèque mais elle possède des domaines de liaison à des protéines kinases appartenant à la famille des Janus kinases (JAK). Suite à la formation du super-complexe hexamèrique, les kinases JAK (1, 2, 3) sont recrutées et vont se transactiver mutuellement par phosphorylation. Cette dernière va conduire à la phosphorylation des résidus tyrosine présents sur le domaine intracytoplasmique des sous unités gp130. Parmi les six résidus tyrosines présents dans cette région, le résidu 683 est phosphorylé de manière moins significative. Le second résidu (Y759) est situé à l'intérieur d'un motif qui permet le recrutement puis l'activation de la protéine SHP-2 (Src-homology tyrosine phosphatase 2) (Fukada *et al.* 1996). Les quatre autres tyrosines (résidus Y767, Y814 , Y905, Y915) forment un motif appelé YXXQ, motif qui est responsable de l'activation des facteurs de transcription STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription).

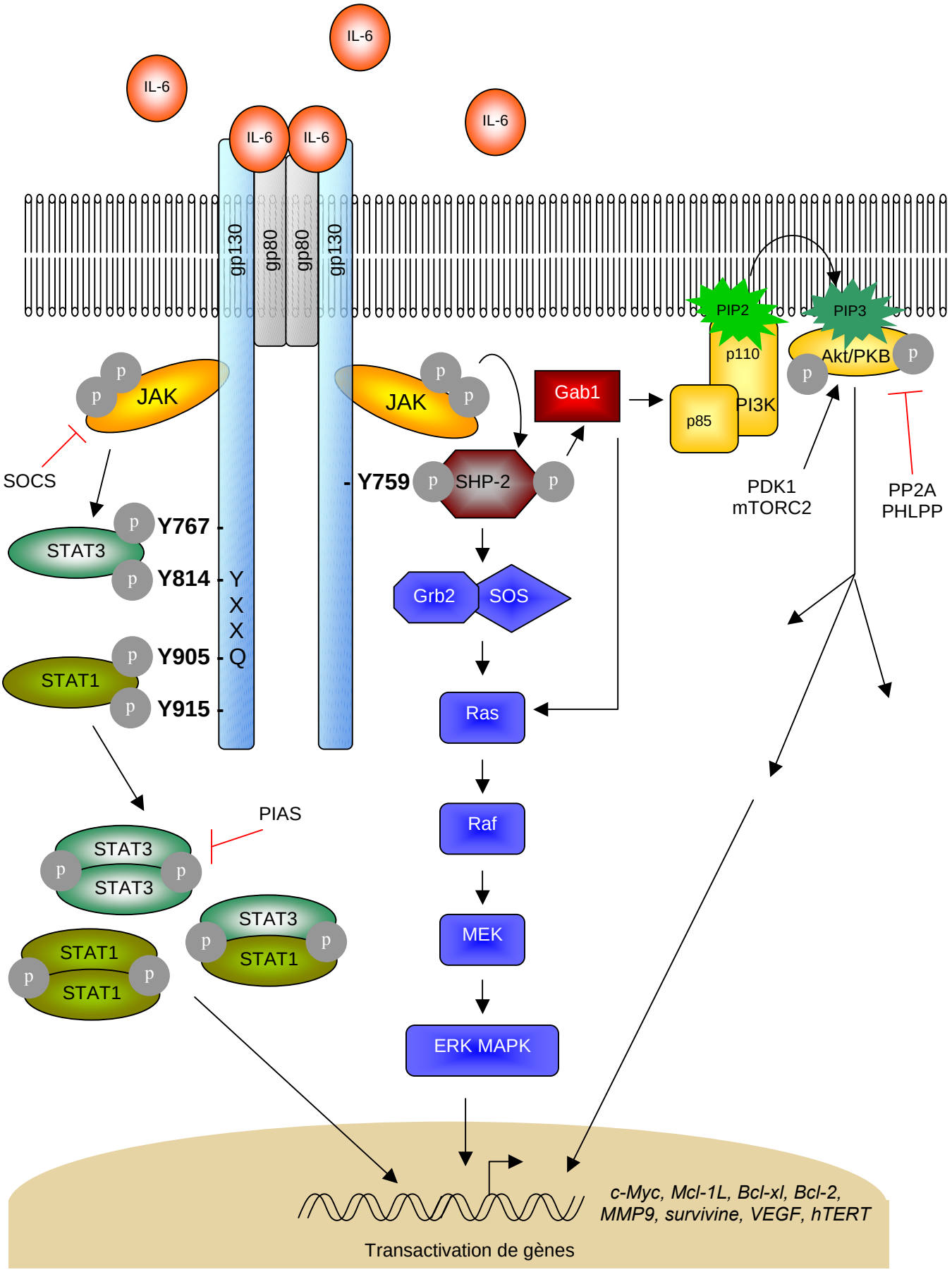


Figure 40. Voies de signalisation induites par la fixation de l'IL-6 sur son récepteur.
D'après Heinrich *et al.* 2003; Kamimura *et al.* 2003; Nicholson and Anderson 2002.

L'interleukine-6 est connue pour activer les STAT1, 3 et 5 (Bromberg and Darnell 2000). L'activation de STAT3 ne requiert pas d'importance parmi les 4 résidus du domaine YXXQ alors que pour celle de STAT1 les deux domaines les plus distaux sont importants (Gerhartz *et al.* 1996). Après stimulation par l'IL-6, les protéines STAT sont recrutées au niveau du motif YXXQ pour être phosphorylées sur les tyrosines 701 pour STAT1 et 705 pour STAT3 par les kinases JAK. Ainsi activées, elles vont s'associer sous forme d'homodimères (STAT1/STAT1, STAT3/STAT3) ou d'hétérodimères (STAT3/STAT1) avant de migrer dans le noyau pour transactiver l'expression de gènes cibles (Figure 40). STAT5 peut, pour sa part, être activée par JAK sans contact physique avec gp130.

Le facteur STAT assurant l'essentiel de la signalisation IL-6 est le facteur STAT3. La phosphorylation sur la tyrosine 705 est connue pour être indispensable à la dimérisation de STAT3 en vue de sa migration dans le noyau bien qu'il soit possible d'avoir des protéines STAT3 nucléaires indépendamment de cette phosphorylation avec une fonction peu caractérisée (Reich and Liu 2006). Il existe une phosphorylation sur la sérine 727 pouvant être réalisée par une kinase sensible ou non à un inhibiteur H7 (Abe *et al.* 2001) ou bien par la PKCδ (Heinrich *et al.* 2003). Cette phosphorylation supplémentaire, bien que plus lente que la première, permettrait d'augmenter les capacités transactivatrices du dimère STAT3. Les STATs phosphorylées activent la transcription de leurs gènes cibles après dimérisation et migration dans le noyau (Vallières and Rivest 2000).

Parmi ces gènes, on distingue : *c-Myc* qui stimule la prolifération (Bowman *et al.* 2000) ; *Mcl-1L* (Myeloïd Cell Leukemia 1L (Isomoto *et al.* 2005), *Bcl-*X_L (Bowman *et al.* 2000), la *survivine* (Barre *et al.* 2007) et *Bcl-2* (Bromberg and Darnell 2000) qui sont des acteurs anti-apoptotiques; *MMP9* impliqué dans l'invasion ; *VEGF* favorisant l'angiogénèse (Niu *et al.* 2002) ; ou encore *hTERT* impliquée dans le maintien de la longueur des télomères (Barre *et al.* 2007).

Il existe des protéines de régulation négative de la voie JAK/STAT, les SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling) et les PIAS (Protein Inhibitors of Activated STAT) qui rendent inaccessible le domaine catalytique des JAK et empêchent la liaison des dimères STAT à l'ADN (Vallières and Rivest 2000).

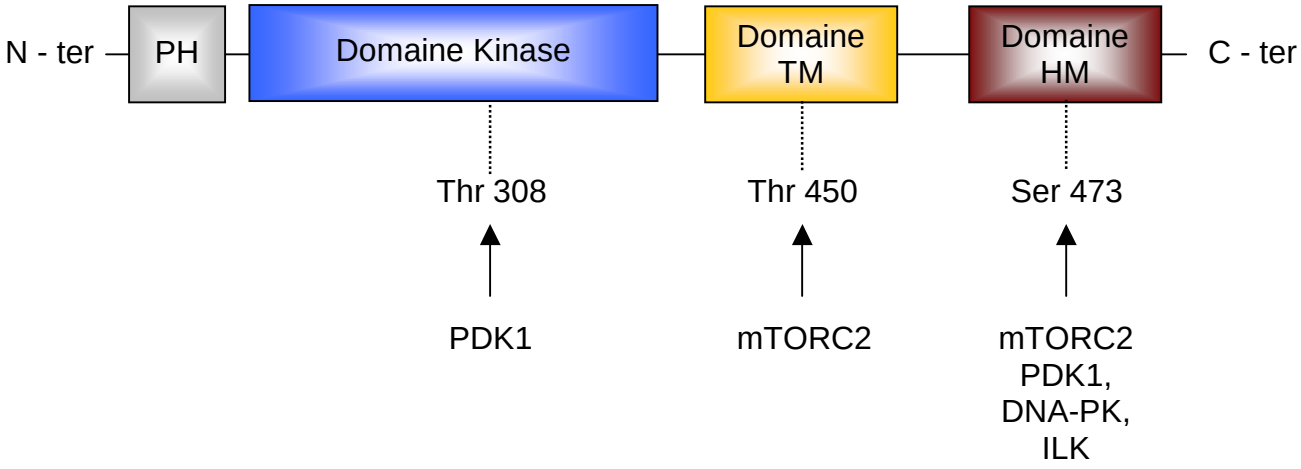


Figure 41. Résidus cibles de phosphorylation lors de l'activation de la protéine Akt.
TM : Turn Motif ; HM : Hydrophobic Motif. D'après Hauge *et al.* 2007.

Par ailleurs, la protéine SHP-2 après fixation au niveau du résidu Y759 de gp130, peut interagir avec la protéine Grb-2, qui est associée de manière constitutive avec SOS (Son Of Sevenless), un échangeur GDP/GTP pour Ras. Ras une fois activée (Ras-GTP) va induire l'activation de la cascade des MAPK. Gab1 (Grb-2 associated binder 1) est aussi impliquée dans l'activation de la voie des MAPK en interagissant avec Ras (Figure 40). La voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) est quant à elle impliquée dans les mécanismes de contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la transformation cellulaire (Ory and Morrison 2004).

La protéine adaptatrice Gab1 peut également interagir avec la protéine SHP-2 et avec la sous unité p85 de la PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase). Celle-ci génère, suite à la phosphorylation du phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP2), du phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP3), composé nécessaire à l'activation de la protéine Akt (Protéine Kinase B). Le gène suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and tensin homolog, deleted on chromosome Ten) code une protéine à activité lipide-phosphatase qui apparaît comme le régulateur négatif majeur de la voie PI3K/Akt en réversant la conversion du PIP3 en PIP2.

Il existe 3 isoformes d'Akt (Akt1/PKBα, Akt2/PKBβ et Akt3/PKBγ) qui sont codées par des gènes différents. L'expression d'Akt1 est considérée comme ubiquitaire alors que celle des deux autres isoformes serait plus spécifique de certains tissus (Franke 2008).

En plus du domaine PH qui lui permet d'être recrutée à la membrane, la protéine PKBα comprend plusieurs domaines contenant des résidus dont la phosphorylation est indispensable à l'activation complète de la fonction kinase de la protéine (Figure 41). Ainsi, l'activation des 2 résidus thréonine (308 et 450), respectivement situés au niveau du domaine qui porte l'activité enzymatique et au niveau d'un motif nommé TM (Turn Motif); suivie de l'activation de la sérine (473) située dans la région HM (Hydrophobic Motif) sont nécessaires (Hauge *et al.* 2007).

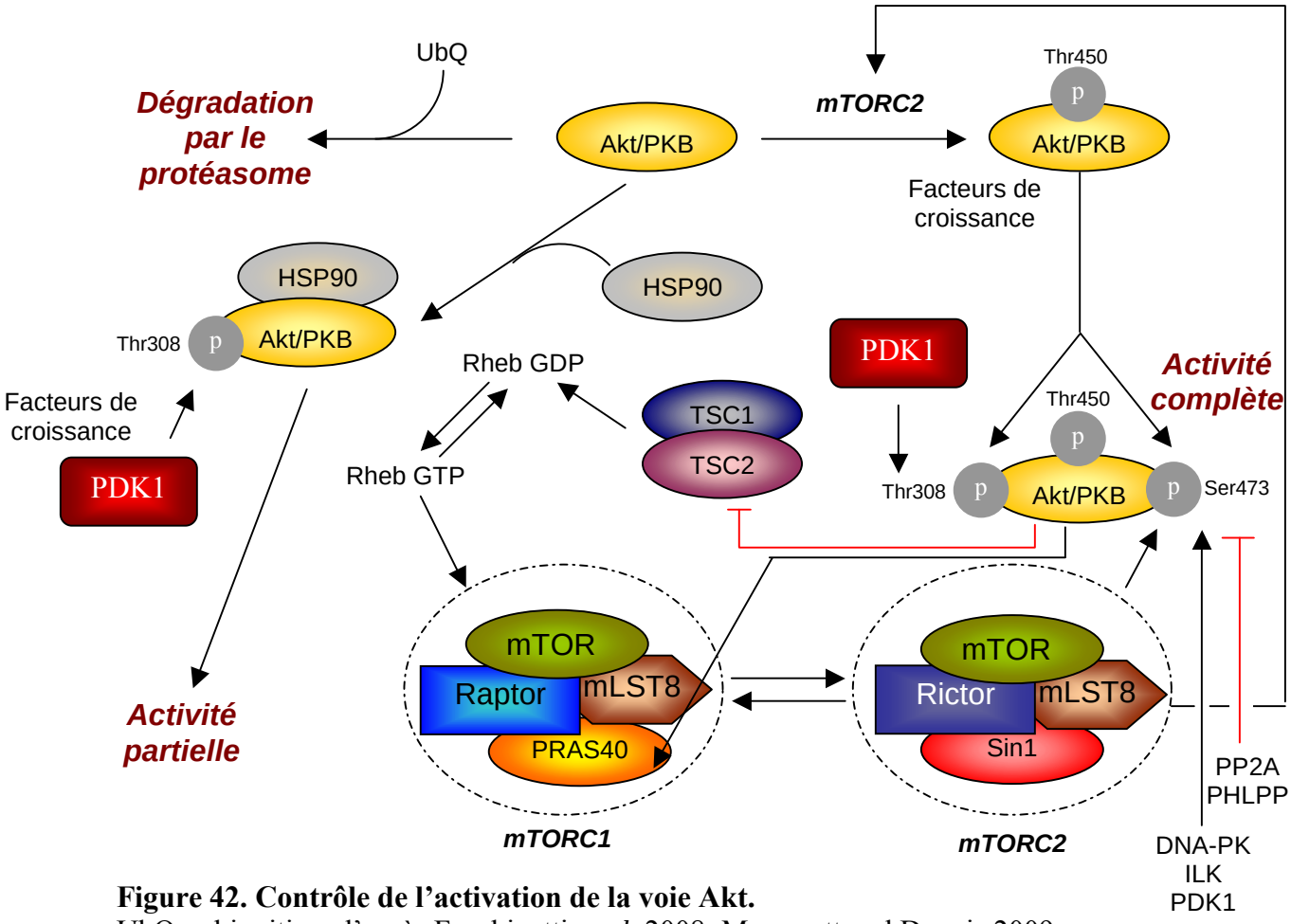


Figure 42. Contrôle de l'activation de la voie Akt.
UbQ : ubiquitine, d'après Facchinetti *et al.* 2008; Memmott and Dennis 2009.

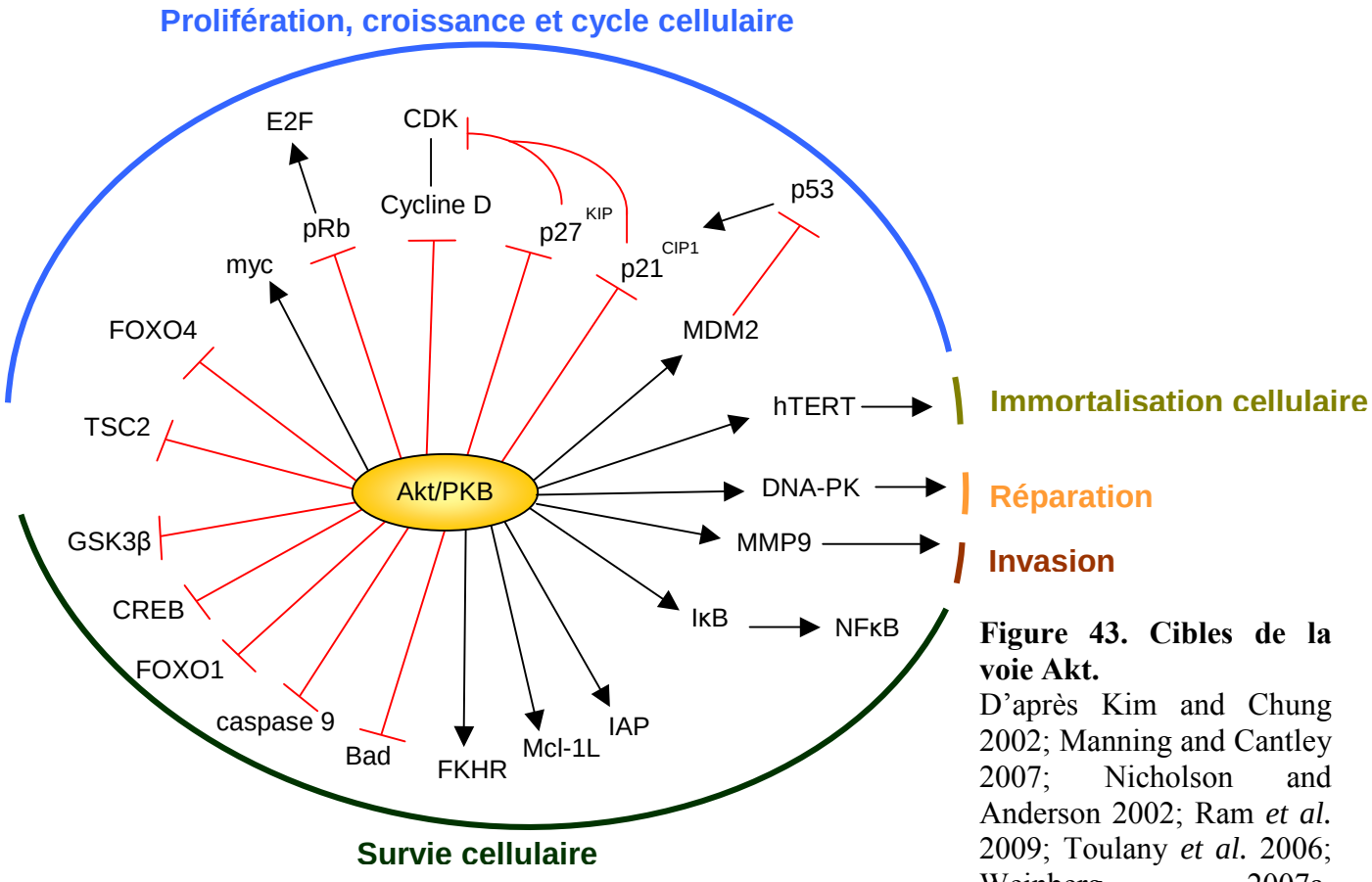


Figure 43. Cibles de la voie Akt.
D'après Kim and Chung 2002; Manning and Cantley 2007; Nicholson and Anderson 2002; Ram *et al.* 2009; Toulany *et al.* 2006; Weinberg 2007a.

En l'absence de toute phosphorylation, la protéine Akt est rapidement ubiquitinylée avant d'être dégradée par le proétasome (Figure 42). Le complexe mTORC2 permet la phosphorylation de la thréonine 450 entraînant un repliage en C-terminal de la protéine et une meilleure stabilité (Facchinetti *et al.* 2008).

Akt peut en l'absence de facteur de croissance interagir avec HSP90 pour prévenir cette dégradation. Si cette contrainte est levée, la phosphorylation de la thréonine 308 autorise une activation partielle de la protéine. Son activation complète requiert la phosphorylation de la sérine 473 située au niveau du domaine c-terminal (Nicholson and Anderson 2002).

La kinase PDK1 assure la phosphorylation au niveau de la thréonine 308 d'Akt tandis que le complexe mTORC2 est le principal responsable de la phosphorylation de la serine 473 scellant la kinase dans une conformation active. Cette sérine peut par ailleurs être activée par la DNA-PK, ILK (Integrin-Linked Kinase) et PDK1 (Facchinetti *et al.* 2008; Feng *et al.* 2004; Memmott and Dennis 2009).

A l'opposé les protéines PP2A et PHLPP agissent en tant que phosphatases pour réguler négativement l'activation d'Akt/PKB (Franke 2008). Akt dans sa forme active, peut également inhiber l'action du complexe TSC1/TSC2 empêchant la fonction du donneur de phosphate Rheb GTP nécessaire à l'activation de mTOR dans le complexe mTORC1. En revanche Akt augmente l'activation de mTORC1 par phosphorylation de sa sous unité PRAS40.

La voie PI3K/Akt agit sur de nombreux substrats impliqués dans la survie (inhibition des voies pro-apoptotiques), la prolifération et la croissance cellulaire (protéines intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire), dans les mécanismes de réparation mais aussi le pouvoir invasif de la cellule tumorale (Figure 43). Akt agit soit directement en modifiant les capacités fonctionnelles des protéines cibles soit en régulant indirectement l'expression de gènes cibles (Manning and Cantley 2007; Weinberg 2007a).

6.2 La voie de survie interleukine-6 dans les gliomes

6.2.1 L'interleukine-6 dans les gliomes

Les premiers travaux sur l'implication de l'interleukine-6 dans les tumeurs cérébrales et plus particulièrement les gliomes ont eu lieu dans les années 1990. L'équipe de Lichtor *et al.* (1990) a décrit une surexpression du messager de cette cytokine dans les gliomes. Les glioblastomes produisent une IL-6 active à la fois *in vivo* et *in vitro* (Van Meir *et al.* 1990).

L'expression de l'*IL-6* par les cellules gliales serait par ailleurs augmentée après exposition aux radiations ionisantes (Yamanaka *et al.* 1993). Dans les gliomes, les voie des céramides, du TNFα et de Fas induites après irradiation, sont aussi capables d'induire une élévation de l'expression de l'*IL-6 in vitro* (Choi *et al.* 2002; Fiebich *et al.* 1995; Murphy *et al.* 1995).

Les travaux sur l'analyse du contenu du liquide céphalo-rachidien après une intervention chirurgicale ont également montré une élévation de la quantité d'IL-6 (Woiciechowsky *et al.* 1997) permettant donc de relier cette production à une réponse du tissu cérébral au geste chirurgical. (Goswami *et al.* 1998) ont démontré que l'IL-6 exerce une action autocrine sur la croissance cellulaire de la lignée de glioblastome U87.

Les travaux antérieurs de l'équipe, cliniques et expérimentaux, ont souligné une implication de cette cytokine dans les glioblastomes. L'équipe a décrit l'existence d'une relation entre la surexpression de l'IL-6 et le grade de malignité de la tumeur (Rolhion *et al.* 2001). La surexpression du gène *IL*- 6 a été associée à une amplification génique aussi bien sur des échantillons cliniques que sur des lignées *in vitro* (Tchirkov *et al.* 2001). Des données expérimentales ont décrit la fraction de cellules productrices d'IL-6 au sein de la lignée de glioblastome G5 comme résistante à la radiothérapie; elle pourrait être à l'origine d'une recroissance à l'intérieur du volume irradié et donc de la récidive tumorale (Dubost *et al.* 2002). Des études génomiques ont par ailleurs rapporté que le nombre de copies du gène *IL-6* est élevé dans environ 50 % des glioblastomes (Saigusa *et al.* 2005; Suzuki *et al.* 2004). L'IL-6 pourrait également être un bon indicateur pronostique selon les premiers résultats publiés par Chang *et al.* (2005).

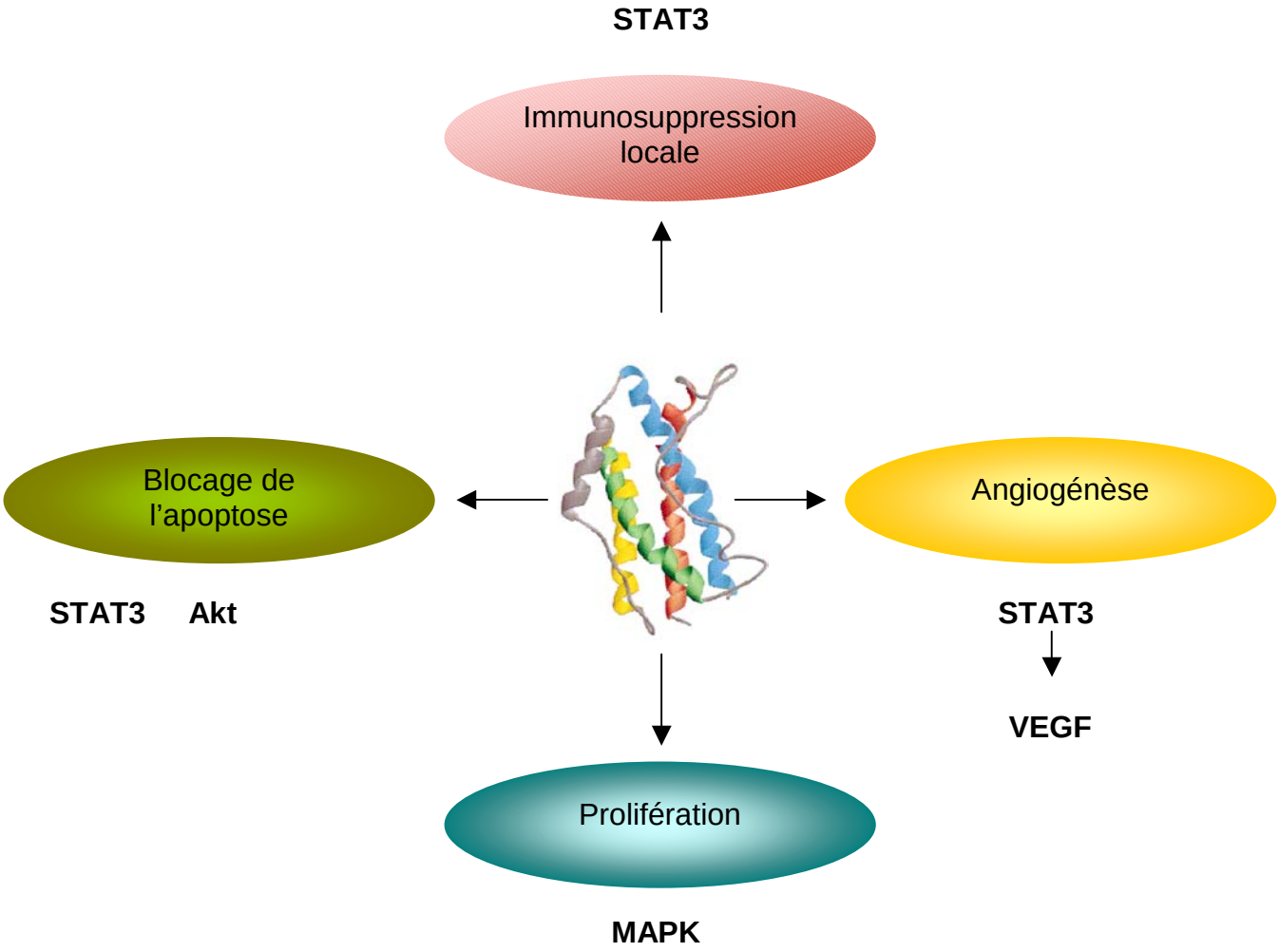


Figure 44. Rôles de l'IL-6 dans la progression tumorale.

L'interleukine-6, comme décrit précédemment intervient donc dans la progression tumorale à plusieurs niveaux que ce soit sur la cellule tumorale ou bien sur son micro-environnement. Cette cytokine intervient dans le mécanisme d'immunosuppression locale et dans l'angiogénèse. Elle contrôle également la prolifération cellulaire et le blocage des voies apoptotiques permettant la survie de la cellule tumorale dans un environnement pourtant hostile observé par exemple après chimiothérapie ou radiothérapie (Figure 44).

De nombreuses données de la littérature attestent de l'implication des voies de signalisation JAK/STAT3 et PI3K/Akt à la fois dans la progression et dans la résistance aux traitements des gliomes.

6.2.2 L'activation des voies AKT et STAT3 dans les gliomes

Le niveau élevé d'activation de la voie STAT3 observé dans les gliomes (Rahaman *et al.* 2002; Schaefer *et al.* 2002) pourrait être la conséquence de la diminution de l'expression des protéines inhibitrices PIAS (Brantley *et al.* 2008). L'IL-6 induit l'expression de *VEGF* via la voie STAT3 dans les gliomes participant ainsi activement à la néo-angiogénèse tumorale (Loeffler *et al.* 2005).

Un blocage de la voie STAT3 par un traitement avec un inhibiteur de JAK (AG490) conduit à une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-X_L, Bcl-2 et Mcl-1L et à une baisse de la prolifération *in vitro* (Rahaman *et al.* 2002). Un knockdown par ARN interférence induit une apoptose de certaines lignées d'astrocytomes (Konnikova *et al.* 2003). L'utilisation de WP1066, un autre inhibiteur de la voie STAT3, conduit à une baisse de l'expression des protéines McL-1L, Bcl-X_L et induit l'apoptose dans les gliomes de haut grade *in vitro* et *in vivo* (Iwamaru *et al.* 2007) mais aussi à une réversion du phénomène d'immunosuppression locale (Hussain *et al.* 2007).

Dans les gliomes, la voie PI3K/Akt fréquemment activée est souvent associée à une mutation du gène *PTEN*, mais aussi à une augmentation de l'expression du gène *EGFR* (Choe *et al.* 2003; Haas-Kogan *et al.* 1998). L'activation de la voie Akt dans un modèle d'astrocytome anaplasique est suffisante pour avoir une évolution vers un glioblastome (Sonoda *et al.* 2001).

Les données biocliniques de Chakravarti *et al.* (2004), ont démontré l'association entre l'activation de la voie Akt et un mauvais pronostic pour des patients atteints de gliomes et traités par radiothérapie uniquement. L'activation de cette même voie a été corrélée au grade de malignité de la classification histopathologique de l'OMS (Wang *et al.* 2004).

L'inhibition de la kinase ILK qui cible le résidu serine 473 d'Akt induit l'apoptose, une baisse de l'angiogénèse, une diminution du pouvoir invasif *in vitro* et de la croissance tumorale sur un modèle *in vivo* (Edwards *et al.* 2005; Edwards *et al.* 2008; Koul *et al.* 2005). Une forte expression du gène anti-apoptotique BAX, gène cible de la voie PI3K/Akt, a était associée à un meilleur pronostic lors de l'analyse par micro-array (Ruano *et al.* 2008).

Une étude récente de Kao *et al.* (2007), a démontré qu'un blocage de la voie Akt pouvait être responsable de la persistance de cassures d'ADN double brin non réparées après irradiation dans la lignée de glioblastome U251. Au-delà du blocage des voies apoptotiques, l'activation d'Akt interviendrait donc dans l'efficacité de la radiothérapie favorisant la réponse aux dommages de l'ADN.

D'autres facteurs peuvent activer les voies de signalisation induites par l'IL-6, parmi lesquels *EGFR* dont le gène est fréquemment amplifié dans les gliomes de haut grade. Le variant EGFRvIII, qui présente la particularité d'être constitutivement activé (Moscatello *et al.* 1996; Sugawa *et al.* 1990) va conduire majoritairement à une activation de la voie de signalisation PI3K/Akt et dans une moindre mesure des voies des MAPK et STAT3 (Huang *et al.* 2007).

Travaux Personnels

Objectif général de l'équipe

Les glioblastomes, tumeurs hautement radiorésistantes, sont les tumeurs cérébrales de l'adulte les plus fréquentes et les plus graves. La radiothérapie qui permet d'allonger la survie des patients est le traitement de référence de ces tumeurs. Leur pronostic reste relativement sombre avec une médiane de survie d'environ 12 mois, le plus souvent en raison d'une récidive à l'intérieur même du volume irradié. Un objectif du laboratoire est l'identification et la neutralisation de cibles moléculaires impliquées dans ces mécanismes de radiorésistance afin de diminuer le risque de récidive à l'intérieur du volume irradié et donc d'allonger la survie des patients.

Les caractéristiques optimales recherchées pour les agents radiosensibilisants sont de n'avoir qu'un impact cytotoxique (et donc une toxicité) mineur s'ils sont utilisés seuls mais qui en présence d'une irradiation sont capables de potentialiser le traitement. L'interleukine-6 (IL-6) et les voies de signalisation qui sont situées en aval comme les voies PI3K/Akt et JAK/STAT3, peuvent être impliquées dans les mécanismes anti-apoptotiques à l'origine de la radiorésistance. Ils constituent donc des cibles potentielles en vue d'obtenir une radiosensibilisation des glioblastomes.

Article I

Interleukin-6 gene amplification and shortened survival in glioblastoma patients.

Tchirkov A, Khalil T, Chautard E, Mokhtari K, Véronèse L, Irthum B, Vago P, Kémény JL, Verrelle P.

Br J Cancer. 2007 Feb 12;96(3):474-6.

Objectif de l'étude

L'équipe possédait à mon arrivée de nombreuses données sur le rôle de l'IL-6 dans les GBM. Dans une série de 59 gliomes, elle a démontré une association forte entre l'agressivité de la tumeur et le niveau d'expression des messagers codant l'IL-6 (Rolhion *et al.* 2001). Cette interleukine est connue pour promouvoir la croissance tumorale (Goswami *et al.* 1998) et inhiber l'apoptose induite par les radiations ionisantes (Miyamoto *et al.* 2001), les espèces oxygénées réactives (Miwa *et al.* 2000) ou les agents chimiothérapiques (Borsellino *et al.* 1995). Elle pourrait ainsi représenter l'un des facteurs clés nécessaires à la survie et à la croissance des glioblastomes (Rahaman *et al.* 2002) chez les patients traités par radio- ou chimiothérapie. Par des méthodes de PCR quantitative, il a été mis en évidence au laboratoire une amplification génique et une augmentation de l'expression de l'IL-6 dans 5 glioblastomes primaires sur 5 et dans 4 lignées de glioblastomes sur 5 (Tchirkov *et al.* 2001).

Ces résultats suggèrent que l'amplification du gène de l'IL-6 puisse signer un sous-groupe de glioblastome particulièrement agressif et être à l'origine de la forte expression de l'IL-6 dans ces tumeurs. Enfin, il a été démontré dans les cellules de la lignée humaine radio-résistante G5, que la croissance des cellules productrices d'IL-6 ne sont pas affectées par les radiations ionisantes (3, 6 ou 9 Gy) alors que la croissance de celles qui ne synthétisent pas la cytokine diminue en fonction de la dose utilisée (Dubost *et al.* 2002).

Au vu des résultats précédents, les questions posées lors de mon arrivée dans le laboratoire étaient les suivantes :

1) quelle est la fréquence de l'amplification du gène *IL-6* dans les GBM ?
2) est-ce que cette amplification a une valeur pronostique ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons analysé sur une autre série de 53 gliomes, le niveau d'amplification du gène *IL-6* et le taux d'expression de son messager en recherchant une corrélation avec la survie des patients.

British Journal of Cancer (2007) 96, 474 – 476
© 2007 Cancer Research UK All rights reserved 0007 – 0920/07 $30.00
www.bjcancer.com

Short Communication

Interleukin-6 gene amplification and shortened survival in glioblastoma patients

A Tchirkov*[,1,2,3], T Khalil[1,4], E Chautard[1], K Mokhtari[5], L Véronèse[1,2], B Irthum[4], P Vago[2], J-L Kémény[6] and P Verrelle[1,3]

[1]EA 3846, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, F-63001, France; [2]Service de Cytogénétique Médicale, UFR Médecine, CHU, Clermont-Ferrand, F-63001, France; [3]Departement de Radiothérapie, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, F-63011, France; [4]Services de Neurochirurgie, CHU, Clermont-Ferrand, F-63001, France; [5]Laboratoire de Neuropathologie, Groupe hospitalier Pitie-Salpetriere, Paris, F-75013, France; [6]Laboratoire d'Anatomie Pathologique, CHU, Clermont-Ferrand, F-63001, France

Interleukin-6 (IL-6) is known to promote tumour growth and survival. We evaluated *IL-6* gene amplification in tumours from 53 glioma patients using fluorescence *in situ* hybridisation. Amplification events were detected only in glioblastomas (15 out of 36 cases), the most malignant tumours, and were significantly associated with decreased patient survival.
British Journal of Cancer (2007) **96,** 474 – 476. doi:10.1038/sj.bjc.6603586 www.bjcancer.com
Published online 16 January 2007
© 2007 Cancer Research UK

Keywords: *IL-6* gene; glioblastoma multiforme; amplification; prognosis

INTRODUCTION

Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine that regulates the immune response, but also plays a role in promoting tumour growth and survival (Trikha *et al*, 2003; Hodge *et al*, 2005). In gliomas, the level of *IL-6* gene expression increases with the grade of malignancy (Rolhion *et al*, 2001). In glioblastoma multiforme (GBM), the most malignant glioma, amplification/overexpression of the *IL-6* gene appears to be a common feature (Tchirkov *et al*, 2001). Recent genomic array studies have reported that the number of *IL-6* gene copies was increased in 40 – 50% of GBM (Suzuki *et al*, 2004; Saigusa *et al*, 2005). It is however unknown whether this alteration could be found in gliomas of lower malignancy grades. The prognostic significance of *IL-6* gene amplification in GBM has not yet been determined. To address these issues, we evaluated here *IL-6* gene amplification using interphase fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) in 53 gliomas representative of various histological types and malignancy grades. In GBM, the results were correlated with patient survival.

MATERIALS AND METHODS

Glioma samples were taken from the material of surgical resection during the course of standard diagnostic procedure. Histological diagnosis and grading of tumours was consistent with the World Health Organization (WHO) criteria (World Health Organization, 2000). Nine tumours were classified as low-grade gliomas (grade I – II), including one pilocytic astrocytoma, three astrocytomas, two oligodendrogliomas and three oligoastrocytomas. Eight tumours were anaplastic gliomas (grade III), including six anaplastic oligoastrocytomas and two anaplastic oligodendrogliomas. The remaining 36 tumours were classified as GBM (grade IV). Patients with malignant gliomas (grade III – IV) were treated by surgery followed by either high-dose carmustine followed by radiotherapy in cases with optimal tumour resection or radiotherapy and concomitant temozolomide followed by monthly cycles of adjuvant temozolomide in cases with partial tumour resection or biopsy alone.

An interphase FISH was performed on frozen sections of gliomas mounted on Fisher Superfrost slides. The *IL-6* gene probe was designed from the bacterial artificial chromosome clone RP11-240H8 (GenBank Accession Number AC073072) kindly provided by Professor Mariano Rocchi (University of Bari, Italy). The *IL-6* probe labelled with SpectrumGreen (Vysis/Abbott, Rungis, France) and chromosome 7 cetromeric probe labelled with SpectrumOrange (Vysis/Abbott) were co-hybridised to evaluate simultaneously the number of *IL-6* gene and chromosome 7 copies. A median of 148 nuclei (116 – 245, interquartile range) was scored using a Metafer4-MetaCyte microscope scanning system (MetaSystems, Le Cannet, France).

The number of *IL-6* mRNA transcripts was assessed using quantitative real-time reverse transcriptase-PCR (qRT – PCR) in the LightCycler system (Roche Diagnostics, Meylan, France) with *IL-6* specific primers (Tchirkov *et al*, 2001) and normalised to the expression of a housekeeping gene, *ABL* (Tchirkov *et al*, 2003).

Analyses of statistical links between biological and clinical characteristics were performed using standard tests. Overall survival was calculated using the Kaplan – Meier method and survival curves were compared using the log-rank test. A multivariate analysis was performed using the Cox regression model.

*Correspondence: Dr A Tchirkov, EA 3846, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, F-63001, France;
E-mail: andrei.tchirkov@cjp.fr
Received 6 October 2006; revised 14 December 2006; accepted 14 December 2006; published online 16 January 2007

RESULTS

Using interphase FISH approach, no *IL-6* gene amplification was detected in low-grade or anaplastic tumours ($n=17$), whereas high-level amplification was found in 15 out of 36 (41.7%) GBM (Figure 1A and B). The percentage of nuclei with amplification events varied between 21 and 77% (33%, median).

Quantification of *IL-6* mRNA with qRT–PCR revealed a highly significant increase in the mean *IL-6*/*ABL* ratio in GBM (33.3%) as compared with non-GBM (1.5%; Kruskal–Wallis test, $P=3.8\times10^{-6}$). The mean *IL-6*/*ABL* ratio was >10-fold greater in GBM manifesting *IL-6* gene amplification than in GBM without amplification (71.6 *vs* 6.1%; $P=4.3\times10^{-7}$).

GBM patients with amplified *IL-6* gene had significantly shorter survival than patients without amplification (log-rank test, $P=0.0000073$; Figure 1C). Multivariate Cox analysis for overall survival, including *IL-6* amplification, extent of tumour resection and age as variables, demonstrated that *IL-6* amplification was an independent factor of poor prognosis (relative risk (RR) amplified *vs* non-amplified 8.07; $P=0.000016$). The complete tumour resection, equally distributed among patients with and without *IL-6* gene amplification, was an independent factor of favourable prognosis (RR complete *vs* partial 0.31; $P=0.013$). Age did not influence survival of patients.

DISCUSSION

Glioblastomas are the most devastating primary brain tumours. Despite modern treatments, about 40% of patients with GBM die within 6 months after diagnosis (Reardon *et al*, 2006). In the present study, we demonstrated that one of the molecular abnormalities associated with the aggressiveness of GBM is the amplification of the *IL-6* gene, which was found in 41.7% of patients and significantly correlated with decreased survival.

Amplifications on chromosome 7p in GBM are believed to be driven by the amplification of the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene locus (Rossi *et al*, 2005). This initial amplification event may induce instability along the length of this chromosomal arm, resulting in co-amplification of other genes. Of note, *EGFR* gene amplification has no clear prognostic value in GBM (Houillier *et al*, 2006). It may be possible that some co-amplified (or independently amplified) genes are involved in glioma development and progression and are important for patient prognosis. Novel amplicons on chromosome 7p distinct from *EGFR* were recently identified using high-resolution genomic analyses and were reported to contain, among other genes, the *IL-6* gene that was overexpressed (Rossi *et al*, 2005).

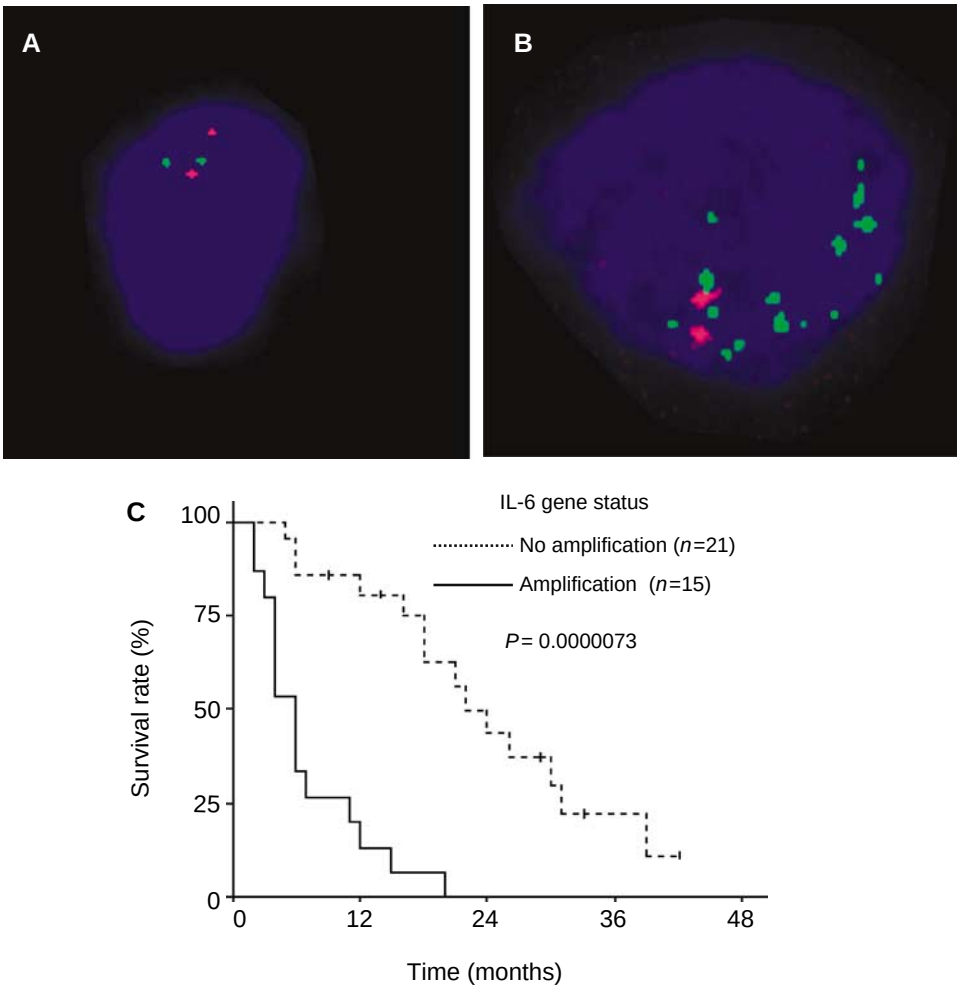


Figure 1 (**A** and **B**) Example of FISH analysis of chromosome 7 (red signals) and *IL-6* gene (green signals) copy numbers in frozen sections of glioma tumours. A nucleus showing two copies of chromosome 7 and two copies of *IL-6* gene (**A**); a nucleus with two copies of chromosome 7 and a high-level amplification of *IL-6* gene (ratio of *IL-6* to centromere 7 signals greater than 3) (**B**). (**C**) Overall survival as a function of *IL-6* gene status in GBM patients. Patients with *IL-6* gene amplification had significantly shorter survival than patients without amplification.

© 2007 Cancer Research UK

In gliomas, IL-6 plays a role in promoting tumour growth (Goswami *et al*, 1998) and angiogenesis (Loeffler *et al*, 2005). This cytokine also protects cancer cells from apoptotic depletion during chemotherapy and radiotherapy through activation of the Janus kinase/STAT and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathways (Miyamoto *et al*, 2001; Trikha *et al*, 2003; Hodge *et al*, 2005). In this context, amplification of the *IL-6* gene leading to its overexpression is likely one of the major factors contributing to the aggressiveness and poor response to therapies of GBM. It may therefore be suggested that targeting IL-6 and its signalling pathways in GBM would sensitise these otherwise resistant tumours to chemotherapeutic drugs and radiotherapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Puy de Dôme). We are grateful to Georges Briançon and Farida Godeau for expert technical assistance and Fabrice Kwiatkowski for statistical analysis.

REFERENCES

Goswami S, Gupta A, Sharma SK (1998) Interleukin-6-mediated autocrine growth promotion in human glioblastoma multiforme cell line U87MG. *J Neurochem* **71:** 1837 – 1845

Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL (2005) The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* **41:** 2502 – 2512

Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Laigle-Donadey F, Criniere E, Mokhtari K, Thillet J, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Sanson M (2006) Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer* **106:** 2218 – 2223

Loeffler S, Fayard B, Weis J, Weissenberger J (2005) Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes *in vivo* and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int J Cancer* **115:** 202 – 213

Miyamoto Y, Hosotani R, Doi R, Wada M, Ida J, Tsuji S, Kawaguchi M, Nakajima S, Kobayashi H, Masui T, Imamura M (2001) Interleukin-6 inhibits radiation induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* **21:** 2449 – 2456

Reardon DA, Rich JN, Friedman HS, Bigner DD (2006) Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. *J Clin Oncol* **24:** 1253 – 1265

Rolhion C, Penault-Llorca F, Kemeny J-L, Lemaire J-J, Jullien C, Labit-Bouvier C, Finat-Duclos F, Verrelle P (2001) Interleukin-6 overexpression as a marker of malignancy in human glioma. *J Neurosurg* **94:** 97 – 101

Rossi MR, La Duca J, Matsui S, Nowak NJ, Hawthorn L, Cowell JK. (2005) Novel amplicons on the short arm of chromosome 7 identified using high resolution array CGH contain over expressed genes in addition to EGFR in glioblastoma multiforme. *Genes Chromosomes Cancer* **44:** 392 – 404

Saigusa K, Hashimoto N, Tsuda H, Yokoi S, Maruno M, Yoshimine T, Aoyagi M, Ohno K, Imoto I, Inazawa J (2005) Overexpressed Skp2 within 5p amplification detected by array-based comparative genomic hybridization is associated with poor prognosis of glioblastomas. *Cancer Sci* **96:** 676 – 683

Suzuki T, Maruno M, Wada K, Kagawa N, Fujimoto Y, Hashimoto N, Izumoto S, Yoshimine T (2004) Genetic analysis of human glioblastomas using a genomic microarray system. *Brain Tumor Pathol* **21:** 27 – 34

Tchirkov A, Rolhion C, Bertrand S, Doré JF, Dubost JJ, Verrelle P (2001) *IL-6* gene amplification and expression in human glioblastoma. *Br J Cancer* **85:** 518 – 522

Tchirkov A, Rolhion C, Kémény JL, Irthum B, Puget S, Khalil T, Chinot O, Kwiatkowski F, Périssel B, Vago P, Verrelle P (2003) Clinical implications of quantitative real-time RT – PCRanalysis of *hTERT* gene expression in human gliomas. *Br J Cancer* **88:** 516 – 520

Trikha M, Corringham R, Klein B, Rossi JF (2003) Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clin Cancer Res* **9:** 4653 – 4665

World Health Organization (2000) Astrocytic tumors. Oligodendroglial tumours and mixed gliomas. In: *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System* Kleihues P, Cavenee WK (eds) pp 6 – 70. Lyon: IARCPress

© 2007 Cancer Research UK

Résultats et discussion

Nous avons mis en évidence une association entre une amplification avec surexpression du gène *IL*-6 et un mauvais pronostic La médiane de survie chute de 22 à 6 mois entre le groupe *IL-6* non amplifié et amplifié. Comment expliquer une telle différence de survie entre les patients avec et sans amplification du gène *IL-6* ? L'IL-6 agit-elle directement sur la cellule tumorale en bloquant son engagement vers l'apoptose, et/ou intervient-elle sur la relation avec l'hôte pour contourner les processus de défense immunitaire ?

Pour tenter de répondre à ces questions nous avons choisi deux approches complémentaires :

1) Analyse de l'impact d'une neutralisation de la voie IL-6 sur la radiorésistance des GBM *in vitro*

2) Analyse comparative des deux populations (IL-6 amplifié et non amplifié) au niveau de l'activation des voies de signalisation anti-apoptotiques d'une part et par une approche plus globale de comparaison des profils génomiques et transcriptomiques des 2 populations en micro-arrays d'autre part.

Article II

Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma

Emmanuel Chautard, Gaëlle Loubeau, Andreï Tchirkov, Jacques Chassagne, Claudine Vermot-Desroches, Laurent Morel, and Pierre Verrelle

Accepté pour publication dans Neuro-Oncology 2009.

Objectif de l'étude

Pour répondre à la première problématique nous avons utilisé des modèles de gliomes *in vitro*, afin de nous affranchir des relations hôte/tumeur. J'ai caractérisé, au cours de ma thèse, plusieurs paramètres à l'état basal sur 8 lignées de gliomes humains de haut grade (SF763, SF767, U251, U373, T98G, HTB13, CB193, et SNB19) et notamment la survie clonogénique aux radiations ionisantes, l'expression et la sécrétion d'IL-6 et l'activation des voies de signalisation Akt et STAT3. Ces deux voies sont activées par de nombreux facteurs parmi lesquels l'IL-6.

Nous n'avons pu mettre en évidence de relation entre la radiosensibilité intrinsèque et l'expression ou la production d'IL-6 (cf Article III). Bien que nous n'ayons pas établi de corrélation entre la radiorésistance intrinsèque et le niveau d'expression et production d'IL-6 *in vitro,* les données de la littérature nous ont incité à explorer le potentiel thérapeutique d'un blocage des voies PI3K/Akt et JAK/STAT3 situées en aval de l'IL-6.

Les données biocliniques de Chakravarti (2004), ont démontré l'association entre l'activation de la voie Akt et un mauvais pronostic pour des patients atteints de gliomes et traités par radiothérapie uniquement. Des données expérimentales ont également décrit qu'une inhibition de la voie STAT3 était suivie d'une augmentation de l'apoptose et d'une inhibition de la prolifération cellulaire dans les gliomes. Nous avons lors de cette étude analysé (I) la relation entre la radiorésistance intrinsèque et le niveau basal d'activation des voies Akt et STAT3, et (II) l'impact d'une diminution de l'activation de ces voies sur la radiorésistance intrinsèque *in vitro.*

Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma

Emmanuel Chautard, Gaëlle Loubeau, Andreï Tchirkov, Jacques Chassagne, Claudine Vermot-Desroches, Laurent Morel, and Pierre Verrelle

Centre Jean Perrin, Laboratoire de Radio-Oncologie Expérimentale, EA 3846 : Thérapie Ciblée Combinatoire en Onco-Hématologie - Université d'Auvergne, 58 rue Montalembert, Clermont-Ferrand, 63001, France (E.C., G.L., A.T., J.C., P.V.) Laboratoire d'Hématologie Biologique, CHU et Centre Jean Perrin, Clermont Ferrand, 63001, France (J.C.) ; OPi EUSA Pharma, 27 chemin des Peupliers, 69570 Dardilly France (C.V.D.) ; GReD, Génétique Reproduction et Développement, UMR-CNRS 6247 – Clermont Université, 63177 Aubière, France (L.M.)

Running head: Akt down modulation radiosensitizes malignant glioma

Address correspondence to: Emmanuel CHAUTARD, Centre Jean Perrin, Laboratoire de Radio-oncologie Expérimentale, EA 3846: Thérapie Ciblée Combinatoire en Onco-Hématologie - Université d'Auvergne, 58 rue Montalembert, Clermont-Ferrand, 63001, France. Tel : +33.4.73.27.81.42 ; Fax : +33.4.73.27.81.25; E-mail : Emmanuel.CHAUTARD@cjp.fr

Abstract

Radiation therapy plays a central role in the treatment of glioblastoma, but it is not curative due to the high tumour radioresistance. PI3K/Akt and JAK/STAT3 pathways serve to block apoptosis process, keeping cells alive in very toxic environments as chemotherapy or ionizing radiation. In the present study, from a panel of 8 human malignant glioma cell lines, firstly investigations on the relationship between intrinsic radioresistance and Akt or STAT3 basal activation were done. Secondly, the impact of down modulation of Akt or STAT3 signaling on *in vitro* intrinsic radiosensitivity was evaluated. Using clonogenic cell survival assay, our results revealed a significant correlation between basal Akt activation and Surviving Fraction at 2 Gy (SF2). By contrast, no correlation was found between STAT3 activation and SF2. According to this, down modulation of Akt with a specific chemical inhibitor (Akt inhibitor IV) demonstrated a significant enhancement of radiation sensitivity on glioma cells in clonogenic survival assay. On the contrary, down modulation of STAT3 signaling with a specific chemical inhibitor (JSI-124) or a neutralizing gp130 antibody failed to radiosensitize glioma cells. These data indicate that Akt intercept node could be a more relevant therapeutic target than STAT3 for radiosensitizing human malignant glioma.

Keywords: Human malignant glioma, intrinsic radioresistance, Akt signaling pathway, STAT3 signaling pathway.

Introduction

Gliomas are the most common primary tumors of the central nervous system.[1-3] Among these tumors, the most frequent and malignant type is glioblastoma (GBM). Glioblastomas have been described as rapidly growing tumors associated with necrosis and endothelial proliferation. These neoplasms are extremely resistant to treatment, including radiotherapy and/or chemotherapy, and patient median survival does not exceed 1 year.[4,5]

Although radiotherapy increases patient survival, this treatment is not curative because of tumor regrowth inside the irradiated tumor volume.[6-8] This might be explained by the fact that interactions between tumor and micro-environnement are involved in tumoral radioresistance through angiogenesis,[9] hypoxia[10] and immunosuppression.[11,12] Another part of tumor radioresistance is due to intrinsic radioresistance of tumor cells themselves. A

molecular analysis in tumor samples of basal activation of different signaling pathway potentially involved in radioresistance could be of clinical interest. Phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K) / Protein Kinase B (Akt) and Janus Kinase (JAK) / Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) pathways serve to block apoptosis process, keeping cells alive in very toxic environments as chemotherapy or ionizing radiation (IR).[13,14] In a bioclinical prospective study, Chakravarti *et al.* showed a significant correlation between the level of basal Akt phosphorylation and a poor prognosis in human glioma in a subset of patients treated by radiotherapy only.[15] Rahaman *et al*. reported experimental data demonstrating that inhibition of STAT3 signaling pathway was also associated with increased apoptosis and proliferation inhibition in malignant glioma.[16]

The development of Akt and STAT3 inhibitors has been a goal of pharmaceutical companies since the discovery that these pathways are often activated in numerous human cancer such as melanoma, myeloma, brain cancer, breast cancer and ovarian cancer.[17,18] Combining drugs with radiation is common in cancer treatment, and aim at achieving better therapeutic effects than with single-modality therapy. Several chemical *in vitro* inhibitors have been developped against Akt[17] or STAT3.[19] Akt Inhibitor IV (5-(2-Benzothiazolyl)-3-ethyl-2-[2-(methylphenylamino)ethenyl]-1-phenyl-1H-benzimidazolium iodide) inhibits Akt phosphorylation by targeting the ATP binding site of a kinase upstream of Akt, but downstream of PI3K.[20] Akt inhibitor IV sensitized human leukemic HL-60 cells to TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand).[21] JSI-124, Cucurbitacin I, is a triterpenoid compound that acts as a highly selective inhibitor of JAK/STAT3 signaling pathway.[22] JSI-124 was recently shown to sensitize malignant glioma and medulloblastoma cells to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and to cisplatin, with a synergy between JSI-124 and cisplatin.[23]

Here, we studied in human malignant glioma cell lines: (I) the relationship between intrinsic radioresistance and Akt or STAT3 basal activation; and was the impact of down modulation of Akt or STAT3 signaling on *in vitro* intrinsic radiosensitivity. Down modulation of Akt with a chemical inhibitor (Akt inhibitor IV) demonstrated a significant enhancement of radiation sensitivity on glioma cells in clonogenic survival assay. On the contrary, down modulation of STAT3 signaling with a chemical inhibitor (JSI-124) or a neutralizing gp130 antibody failed to radiosensitize glioma cells. The radioresistance was evaluated using clonogenic cell survival assay and the basal level of activation of signaling pathways using

Western blot. These data indicate that Akt intercept node could be a more relevant therapeutic target than STAT3 for radiosensitizing human malignant glioma.

Methods and Materials

Materials - Akt (No 9272), phospho-Akt Ser473 (No 9271), STAT3 (No 4904), and phospho-STAT3 Tyr705 (No 9145) rabbit antibodies were from Ozyme (Saint Quentin Yvelines, France). β-actin antibody (No A2066) was from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Anti rabbit-peroxidase was from P.A.R.I.S. (Compiègne, France). All culture reagents were purchased from GIBCO (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Gp130 blocking antibody (No 852.060.000) and control (IgG2a, No 857.080.000) mouse antibody are from Diaclone (Besançon, France).

Cell culture - Eight human malignant glioma cell lines were used in this study. SF763, SF767 and U251MG cell lines were kindly provided by Dr C. Delmas (Centre de Lutte Contre le Cancer Claudius Regaud, Toulouse, France). SW1783, SNB19, and U373MG were obtained from N. Auger (Institut Curie, Paris, France). T98G and CB193 cell lines were kindly provided by G. Pennarun (CEA, Grenoble, France). All cell lines were cultured in DMEM (with 4500mg/l glucose and L-glutamine) supplemented with Sodium Pyruvate 1%, Non Essential Amino Acids 1%, Gentamicin 10µg/ml and 10% Foetal Calf Serum in a humidified incubator containing 5% CO2 at 37°C. All cell lines were mycoplasm free after treatment with plasmocin (Invivogen, Toulouse, France).

Clonogenic cell survival assay - Cells in exponential phase of growth were trypsinised with a 0.25% Trypsin-PBS solution and were seeded at 1000 to 4000 cells per T25 flask. One day after, three flasks were irradiated per dose and irradiation was performed as single exposure doses delivered by a linear accelerator at room temperature. After 9 days of incubation, the content of the flasks were fixed with methanol and stained with a Giemsa stain solution (5%). The Plating Efficiency (PE) represents the percentage of cells seeded that grow into colonies of a given cell line. Colonies with more than 50 cells were counted by microscopic inspection, and plating efficiency as well as the radiation-surviving fraction (plating efficiency of experimental group/ plating efficiency of control group) was determined. Each experiment was repeated on three separate days, and each day triplicates of each dose were performed. The intrinsic radiosensitivity was evaluated by using two

parameters: the Surviving Fraction at 2 Gy (SF2) and the Area Under survival Curve (AUC). Survival curves were obtained by combinating data from three independent experiments (separate days) in accordance with linear-quadratic model (KaleidaGraph software 4.0).

Western blot - Cells in exponential phase of growth were harvested using Buffer C supplemented with NP-40, phosphatase inhibitors (NaF, Na2VO3) and protease inhibitor IP25X (Roche). Total proteins (30µg) were boiled in Laemmli sample buffer and subjected to SDS-PAGE. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL, Amersham Biosciences) followed by blocking in Tris-buffered saline 1X, 10% powdered milk, and incubated with indicated antibodies in the same buffer overnight at 4°C. Membranes were washed three times with 1X Tris-buffered saline, 0.05% Tween 20, and then incubated 1h with anti-rabbit (P.A.R.I.S) peroxidase-conjugated IgG. Detection was performed using ECL system (PerkinElmer Life Sciences). Three independent experiments were used for analysis with Quantity One (BioRad).

Chemical Akt and STAT3 inhibitors - Akt Inhibitor IV (B2311) was from Sigma and STAT3 inhibitor (JSI-124) was from Calbiochem (VWR, Fontenay Sous Bois, France). Stock solutions of Akt inhibitor IV (81.3µM) and of JSI-124 (19µM) were constituted using DMSO and stored at – 20°C. These stock solutions were diluted to the desired concentration with culture medium. For Western blot analysis, cells were exposed 7 h to inhibitor prior protein extraction. For clonogenic survival assay in presence of chemical inhibitors, 1000 to 4000 cells were seeded per T25 flask. One day after, cells were pre-incubated with the different inhibitors (Akt inhibitor IV, JSI-124 or DMSO) for 7h prior to irradiation and then cells were then cultured with inhibitors for up to 24h. Data were normalized to control (treatment with inhibitor without irradiation) to exclude effect of inhibitor alone on surviving fraction.

Results

Radiosensitivity analysis of human glioma cell lines by clonogenic cell survival - The intrinsic radiosensitivity of the glioma cell lines was investigated using standard clonogenic assay. Cell lines were irradiated with increasing doses of radiation (0, 2, 4, 6, 8 and 10 Gy). SF2 and AUC were used to measure intrinsic radiosensitivity. Survival data were fitted to the linear-quadratic model (fig. 1). As shown in Table1, PE values varied from 0.05 to 0.28. SF2 values ranged from 0.46 to 0.83 and AUC values ranged from 2.4 to 5.5. A significant

correlation between SF2 and AUC (r = 0.951; p = 0.00043; linear regression) was observed. Our data obtained are in agreement with previous results evaluating the radiosensitivity of human glioma.[24-27] SF763 and SW1783 appeared to be respectively the most and the less radioresistant cell line with 0.83 and 0.46 for SF2; 5.5 and 2.4 Gy for AUC values.

Correlation between activation levels of Akt and STAT3 and radiosensitivity - Among the human glioma cell line panel, STAT3 phosphorylated Tyr705 and Akt phosphorylated Ser473 residues, which are known to be active phosphorylation sites,[28,29] and STAT3 and Akt expression were analyzed by Western blot (fig. 2). Levels of activation were estimated by the phospho-protein/total protein expression ratio. A significant correlation was found between the pAkt/Akt ratio and SF2 (r = 0.764; p = 0.027; linear regression), but not between pSTAT3/STAT3 ratio and SF2. Note that the most radioresistant cell line, SF763, exhibited a high basal activation of both Akt and STAT3 signaling pathways. On the contrary, no activation of these pathways was observed in the SW1783 cell line, which is the most sensitive to ionizing radiation.

Impact of Akt or STAT3 signaling down modulation on glioma radioresistance - We used chemical Akt and STAT3 inhibitors at lower doses that slightly affect plating efficiency in the absence of radiation in order to underline a radiosensitizing effect. In our study, the SF763 cell line exhibits an activation of both Akt and STAT3 signaling. The SF767 and SNB19 cell lines presents respecitvely only Akt and STAT3 activation pathway in basal conditions.

Firstly, SF763 cells were treated with a concentration range of Akt inhibitor IV, for 7h and Akt phosphorylation was investigated using Western blot analyses. As previously reported for other cell lines,[20] we observed a specific decrease of Akt activation with a dose of 10µM in SF763 cells compared to cells treated with DMSO We also observed a lower decrease of Akt activation with 0.2 and 5µM (fig. 3A). Akt inhibitor IV, decreased PE in SF763 cells after 24h of exposure, in a dose dependent manner ranging from 0.86 for 0.2µM to 0.63 for 0.04µM (fig. 3B). When SF763 cells were exposed 24h with 0.2µM of Akt inhibitor IV and irradiated at 4 Gy after 7h of treatment, we observed a significant specific decrease in surviving fraction ($p < 0.01$, *t*-test) compared with the control (DMSO + 4 Gy, fig. 3C). Clonogenic survival assays ranging from 0 to 10 Gy demonstrated a highly significant enhancement of radiation sensitivity ($p < 10^{-7}$, ANOVA) after treatment with 0.2µM of Akt inhibitor IV (fig. 3D).

To confirm Akt pathway involvement in glioma cell radioresistance we carried out experiments to know if down-modulation of Akt could increase radiation sensitivity of the SF767 cell line. SF767 cells were treated with a concentration range of Akt inhibitor IV, for 7h and Akt phosphorylation was investigated using Western blot. As for the SF763 cell line, we observed a specific decrease of Akt activation with a dose of 10µM in SF767 cells compared to cells treated with DMSO (control). We also observed a lower decrease of Akt activation with 0.1µM (fig. 4A). Akt inhibitor IV, decreased PE in SF767 cells after 24h of exposure, in a dose dependent manner ranging from 0.87 for 0.05µM to 0.20 for 0.3µM (fig. 4B). When SF767 cells were exposed 24h with 0.1µM of Akt inhibitor IV and irradiated at 2 Gy after 7h of treatment, we observed a significant specific decrease in surviving fraction ($p < 0.05$, *t*-test) compared with the control (DMSO + 2 Gy, fig. 4C). Clonogenic survival assays ranging from 0 to 10 Gy demonstrated a significant enhancement of radiation sensitivity ($p < 10^{-3}$, ANOVA) after treatment with 0.1µM of Akt inhibitor IV (fig. 4D).

Secondly, SF763 cells were treated with a concentration range of JSI-124 for 7h and pSTAT3/STAT3 ratio was evaluated using Western blot analyses. As shown in fig. 5A, the exposure of cells to 0.2µM of JSI-124 for 7h induced a decrease of STAT3 pathway activation whereas lower doses seemed to have no impact. Although there was no decrease in pSTAT3 with JSI-124 0.01µM in these experimental conditions, clonogenic survival was altered. Thus, JSI-124 after 24h treatment proved to be an effective inhibitor of SF763 colony formation *in vitro*, in a dose dependent manner ranging from 0.87 for 0.01µM to 0.39 for 0.04µM (fig. 5B). To test a potential radiosensitizing effect of JSI-124, cells were treated with 0.01µM JSI-124 for 24h including irradiation at 4 Gy after 7h of treatment. As shown in fig. 5C, JSI-124 treatment failed to sensitize SF763 cells to ionizing radiation.

STAT3 pathway activation involves gp130 recruitment usptream JAK2 activation[29] so another approach to inhibit STAT3 pathway was carried out using gp130 blocking antibody. The exposure of SF763 cells to anti-gp130 blocking antibody (10µg/ml) did not affect plating efficiency (data not shown) but abrogated activation of STAT3 pathway after 24h of treatment as shown in figure 5D. In clonogenic survival assay, anti-gp130 or control antibody (IgG2a) was added when cells were attached in flasks (8h after seeding), before or after irradiation until the end of experiment. In all three conditions, a decrease of STAT3 pathway activation did not radiosensitize SF763 cells (representative results fig. 5E).

Because anti-gp130 antibody treatment does not affect colony forming with a striking inhibition of STAT3 in the SF763 cell line, we used this approach to test potential radiosensitizing effect of STAT3 inhibition in the SNB19 cell line. The exposure of SNB19

cells to anti-gp130 blocking antibody (10µg/ml) did not affect plating efficiency (data not shown) but abrogated activation of STAT3 pathway after 24h of exposure as shown in figure 6A. In clonogenic survival assay, anti-gp130 or control antibody (IgG2a) was added when cells were attached in flasks (8h after seeding). Despite the decrease of STAT3 pathway activation anti-gp130 antibody did not radiosensitize SNB19 cells (fig. 6B).

Discussion

Radiotherapy is a part of the gold standard treatment of glioblastomas, but these tumors are radioresistant. Targeting signaling pathways involved in GBM radioresistance may improve clinical results of radiotherapy. PI3K/Akt and JAK/STAT3 pathways are major cell survival pathways blocking apoptosis process and keeping cells alive in very toxic environments as chemotherapy or ionizing radiation. Here, we studied in human malignant glioma cell lines: (I) the relationship between intrinsic radioresistance and Akt or STAT3 basal activation; and (II) the impact of down modulation of Akt or STAT3 signaling on *in vitro* intrinsic radiosensitivity.

To date, little is known about direct relationship between Akt or STAT3 activation and tumor radioresistance. Our results showed significant correlation between basal Akt activation and Surviving Fraction at 2 Gy (SF2). Conversely, no such correlation was established between STAT3 activation and SF2 suggesting that Akt is a survival pathway associated with radioresistance. In our study, the most radioresistant glioma cell line was SF763, exhibiting an activation of both Akt and STAT3 signaling in basal conditions. SF763 was a good candidate to study effects of Akt or STAT3 down modulation on the radioresistance level. SF767 cell line presents only a high level of Akt and SNB19 cell line shows only an activation of STAT3 pathway so they are good models to study specific roles of respectively Akt and STAT3 inhibition in glioma radiosensitization.

Akt pathway down modulation and glioma radiosensitivity - Our results showed that Akt pathway activation is closely related to human glioma radioresistance. Althought IR damages tumor cells through several mechanisms, IR is thought to kill cells primarily by causing DNA damage and, specifically, double strand breaks (DSBs). Prior to undergoing division, this leads to a DNA damage response to allow repair of the DNA damage.[30] The ability to repair is essential to cell survival because maintained DNA breaks induce apoptosis or senecence.[31] A recent study by Kao *et al.* reported that PI3K/Akt signaling pathway down

modulation led to persistence of unrepaired DSBs induced by radiation in a human glioblastoma cell line (U251), demonstrating that this pathway can modulate DNA damage repair in response to radiation and may be involved in radiation therapy efficiency.[32] To explain this, one hypothesis could imply the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) which is one of the downstream targets of Akt signaling.[33]

The greatest improvement in tumor control will also be through the understanding of stem cells radioresistance mechanisms. Down modulation of Akt signaling induced apoptosis, neurosphere formation suppression, and reduced motility and invasivness in brain tumor stem cells.[34] Interestingly, Akt down modulation sensitizes medullobastoma stem cells located in the perivascular region to radiation-induced apoptosis, suggesting that Akt inhibitors may be an effective anti-cancer stem cell therapy.[35]

Here, we showed that Akt inhibitor IV was able to inhibit in a dose dependent manner *in vitro* colony formation of malignant glioma cell line SF763. Clonogenic survival assays using AKT inhibitor demonstrated enhancement of radiation sensitivity when SF763 cells were exposed for 24h to 0.2µM of Akt inhibitor IV. Akt pathway activation involvement in glioma cell radioresistance was confirmed by significant enhancement of radiation sensitivity of SF767 cells after treatment with 0.1µM of Akt inhibitor IV.

Many PI3K inhibitors have been developped in the last few decades to study PI3K signaling involvement in various biological process. A part of them were used to radiosensitize cancer cells, such as wortmannin[36] and LY294002[37] but they have limited clinical utility due to their severe toxicities. This could be explained in part by the fact that such drugs target all PI3K protein family. More recently Chen *et al* have shown that PI-103, a novel PI3K inhibitor, with less toxic properties, could radiosensitize PTEN-mutated cell lines whereas it could not radiosensitize glioma cell lines with PTEN wild type.[38] Re-establishment of PTEN was also a promising approach to radiosensitize glioma because PTEN is often mutated in these tumors.[32,39] In contrast to PI-103[38] or Nelfinavir[39], we reported in this work that Akt inhibitor IV radiosensitizes wild type PTEN glioma cells (SF763, SF767[38]), but these two cell lines were selected for experiments because of their high level of radioresistance regardless their PTEN status.

STAT3 pathway down modulation and glioma radiosensitivity - JSI-124, acts as a highly selective inhibitor of the JAK/STAT3 signaling pathway.[22] Su *et al* have demonstrated that JSI-124 induced in glioma cells $G_{(2)}$/M accumulation via downregulation of cyclin B1 and cdc2 expression.[40] Down modulation of STAT3 signaling using JSI-124 was also

associated with a decrease in local immunosuppression in a murine intracranial model of glioma.[41] JSI-124 was recently shown to sensitize malignant glioma and medulloblastoma cells to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, and cisplatin with a synergy between JSI-124 and cisplatin,[23] but to our knowledge, there is no study evaluating the ability of JSI-124 to alter cancer cell resistance to ionizing radiation. Here, we showed that JSI-124 alone was able to inhibit SF763 cells colony formation in a dose dependent manner, but that STAT3 down modulation, either using JSI-124 or anti-gp130 blocking antibody, did not modify SF763 cells sensitivity to ionizing radiation.

Despite the decrease of STAT3 pathway activation after anti-gp130 antibody exposure no radiosensitizing effect was observed in SNB19 cells. This is consistent with the absence of correlation between STAT3 activation and radioresistance level in the tested cell lines. Moreover, a recent study reported that STAT3 can have a tumor-suppressive function that is regulated by the tumor suppressor PTEN. Nuclear constitutively activated form of Epidermal Growth Factor Receptor variant III (EGFRvIII) acts as a switch to convert this STAT3 from a tumor-suppressive to a pro-oncogenic protein.[42] Altogether our results with these last data support that STAT3 involvement in glioma radioresistance remains unclear and would depend on PTEN and EGFRvIII status in glioma cells.

In summary, the results of the present study and other reports[32,38,39] strongly suggest that Akt is a valid target for glioma cell radiosensitization. Our conclusions are different from those of de la Pena *et al*, who obtained no radiosensitization effect on glioma cells by treatment with perifosine, a drug that down regulate Akt phosphorylation.[43] Further experiments are needed to understand the link between PTEN, EGFRvIII and STAT3 status in regard to glioma radioresistance. These data indicate that Akt intercept node could be a more relevant therapeutic target than STAT3 for radiosensitizing human malignant glioma.

The PI3K/Akt pathway could be activated by numerous cytokines or growth factors. We reported that among these activators, interleukin-6 (IL-6) gene amplification and overexpression were associated with poor survival in patients with malignant gliomas.[44] We have previously reported that interleukin-6 gene is amplified in SF763 but not in SF767 cell line.[45] PI3K/Akt could also be activated by EGFR which is often amplified in glioblastoma[46,47] but EGFR status in these cell lines is unknown. Furthermore, receptor tyrosine kinase independent activation of the PI3K/Akt pathway is commonly observed in many cancers, and can occur through multiple mechanisms, such as mutation or amplification of PI3K gene, amplification of Akt gene, activation of an upstream oncogene (e.g., RAS), or

mutation or decreased expression of the tumor suppressor PTEN.[48] Because of these multiple possibilities, instead of inhibiting a single cell surface receptor, down modulation of signal transduction through such an intercept node will be a more effective approach to block radioresistance.[49] The PI3K/Akt node could be a relevant therapeutic target to radiosensitize tumor cells by inhibiting both anti-apoptotic mechanisms and DNA damage repair after radiation.

Acknowledgments
This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Puy De Dôme) and by the Region Auvergne. We are grateful to Nicolas Foray for assistance using Kaleidagraph software; Claude Beaudoin for critical reading of the manuscript ; Michele Manin for helpful advices for cell cultures; Angélique DeHaze, Julie Dufour, Antoine Nigon and Jean-Paul Saru for technical assistance. E.C. was the recipient of a fellowship from the MENESR (Ministère de l'Education Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche).

References
1 Legler JM, Ries LA, Smith MA, et al. Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:1382-1390
2 Gurney JG and Kadan-Lottick N. Brain and other central nervous system tumors: rates, trends, and epidemiology. *Curr Opin Oncol.* 2001;13:160-166
3 Ohgaki H and Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl).* 2005;109:93-108
4 DeAngelis LM, Burger PC, Green SB and Cairncross JG. Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? *Ann Neurol.* 1998;44:691-695
5 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:987-996
6 Walker MD, Green SB, Byar DP, et al. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med.* 1980;303:1323-1329
7 Walker MD, Strike TA and Sheline GE. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1979;5:1725-1731
8 Bleehen NM and Stenning SP. A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. The Medical Research Council Brain Tumour Working Party. *Br J Cancer.* 1991;64:769-774
9 Shannon AM and Williams KJ. Antiangiogenics and radiotherapy. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60:1029-1036
10 Bussink J, Kaanders JH and van der Kogel AJ. Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother Oncol.* 2003;67:3-15

11 De Ridder M, Verovski VN, Darville MI, et al. Macrophages enhance the radiosensitizing activity of lipid A: a novel role for immune cells in tumor cell radioresponse. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;60:598-606
12 Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 2007;13:1050-1059
13 Toker A and Yoeli-Lerner M. Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res.* 2006;66:3963-3966
14 Hodge DR, Hurt EM and Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer.* 2005;41:2502-2512
15 Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, et al. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol.* 2004;22:1926-1933
16 Rahaman SO, Harbor PC, Chernova O, Barnett GH, Vogelbaum MA and Haque SJ. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene.* 2002;21:8404-8413
17 LoPiccolo J, Granville CA, Gills JJ and Dennis PA. Targeting Akt in cancer therapy. *Anticancer Drugs.* 2007;18:861-874
18 Yu H and Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:97-105
19 Costantino L and Barlocco D. STAT 3 as a target for cancer drug discovery. *Curr Med Chem.* 2008;15:834-843
20 Kau TR, Schroeder F, Ramaswamy S, et al. A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell.* 2003;4:463-476
21 Han H, Shin SW, Seo CY, et al. 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ 2) sensitizes human leukemic HL-60 cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through Akt downregulation. *Apoptosis.* 2007;12:2101-2114
22 Blaskovich MA, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R and Sebti SM. Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res.* 2003;63:1270-1279
23 Lo HW, Cao X, Zhu H and Ali-Osman F. Constitutively activated STAT3 frequently coexpresses with epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas and targeting STAT3 sensitizes them to Iressa and alkylators. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6042-6054
24 Delmas C, Heliez C, Cohen-Jonathan E, et al. Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation. *Int J Cancer.* 2002;100:43-48
25 Daido S, Yamamoto A, Fujiwara K, Sawaya R, Kondo S and Kondo Y. Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy. *Cancer Res.* 2005;65:4368-4375
26 Russell JS, Lang FF, Huet T, et al. Radiosensitization of human tumor cell lines induced by the adenovirus-mediated expression of an anti-Ras single-chain antibody fragment. *Cancer Res.* 1999;59:5239-5244
27 Casper D, Lekhraj R, Yaparpalvi US, et al. Acetaminophen selectively reduces glioma cell growth and increases radiosensitivity in culture. *J Neurooncol.* 2000;46:215-229
28 Alessi DR, James SR, Downes CP, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* 1997;7:261-269

29 Levy DE and Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:651-662
30 Willers H, Dahm-Daphi J and Powell SN. Repair of radiation damage to DNA. *Br J Cancer.* 2004;90:1297-1301
31 Zhou BB and Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 2000;408:433-439
32 Kao GD, Jiang Z, Fernandes AM, Gupta AK and Maity A. Inhibition of Phosphatidylinositol-2-OH Kinase/Akt Signaling Impairs DNA Repair in Glioblastoma Cells following Ionizing Radiation. *J Biol Chem.* 2007;282:21206-21212
33 Toulany M, Dittmann K, Fehrenbacher B, Schaller M, Baumann M and Rodemann HP. PI3K-Akt signaling regulates basal, but MAP-kinase signaling regulates radiation-induced XRCC1 expression in human tumor cells in vitro. *DNA Repair (Amst).* 2008;7:1746-1756
34 Eyler CE, Foo WC, LaFiura KM, McLendon RE, Hjelmeland AB and Rich JN. Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition. *Stem Cells.* 2008;26:3027-3036
35 Hambardzumyan D, Becher OJ, Rosenblum MK, Pandolfi PP, Manova-Todorova K and Holland EC. PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev.* 2008;22:436-448
36 Norman BH, Shih C, Toth JE, et al. Studies on the mechanism of phosphatidylinositol 3-kinase inhibition by wortmannin and related analogs. *J Med Chem.* 1996;39:1106-1111
37 Gupta AK, Cerniglia GJ, Mick R, et al. Radiation sensitization of human cancer cells in vivo by inhibiting the activity of PI3K using LY294002. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;56:846-853
38 Chen JS, Zhou LJ, Entin-Meer M, et al. Characterization of structurally distinct, isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors in combination with radiation in the treatment of glioblastoma. *Mol Cancer Ther.* 2008;7:841-850
39 Jiang Z, Pore N, Cerniglia GJ, et al. Phosphatase and tensin homologue deficiency in glioblastoma confers resistance to radiation and temozolomide that is reversed by the protease inhibitor nelfinavir. *Cancer Res.* 2007;67:4467-4473
40 Su Y, Li G, Zhang X, et al. JSI-124 inhibits glioblastoma multiforme cell proliferation through G(2)/M cell cycle arrest and apoptosis augment. *Cancer Biol Ther.* 2008;7:1243-1249
41 Fujita M, Zhu X, Sasaki K, et al. Inhibition of STAT3 promotes the efficacy of adoptive transfer therapy using type-1 CTLs by modulation of the immunological microenvironment in a murine intracranial glioma. *J Immunol.* 2008;180:2089-2098
42 de la Iglesia N, Konopka G, Puram SV, et al. Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway. *Genes Dev.* 2008;22:449-462
43 de la Pena L, Burgan WE, Carter DJ, et al. Inhibition of Akt by the alkylphospholipid perifosine does not enhance the radiosensitivity of human glioma cells. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:1504-1510
44 Tchirkov A, Khalil T, Chautard E, et al. Interleukin-6 gene amplification and shortened survival in glioblastoma patients. *Br J Cancer.* 2007;96:474-476
45 Tchirkov A, Rolhion C, Bertrand S, Dore JF, Dubost JJ and Verrelle P. IL-6 gene amplification and expression in human glioblastomas. *Br J Cancer.* 2001;85:518-522
46 Chakravarti A, Seiferheld W, Tu X, et al. Immunohistochemically determined total epidermal growth factor receptor levels not of prognostic value in newly diagnosed glioblastoma multiforme: report from the Radiation Therapy Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;62:318-327
47 Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 2001;15:1311-1333

48 Schuurbiers OC, Kaanders JH, van der Heijden HF, Dekhuijzen RP, Oyen WJ and Bussink J. The PI3-K/AKT-pathway and radiation resistance mechanisms in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009;4:761-767
49 Castellino RC and Durden DL. Mechanisms of disease: the PI3K-Akt-PTEN signaling node--an intercept point for the control of angiogenesis in brain tumors. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007;3:682-693

Captions

Fig. 1. (A-H) Clonogenic survival curves of human malignant glioma cell lines. Cells were irradiated during the exponential growth phase and survival data were obtained from standard clonogenic assays. Data are represented by their mean ± standard error and are fitted to the linear-quadratic model. Linear quadratic relation : $y = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$.

Fig. 2. Akt and STAT3 basal signaling pathways activation. *A*, Cells in were harvested during exponential growth phase and thirty micrograms of total proteins were loaded per lane and electrophoresed by SDS-PAGE. Transfer membranes were immunoblotted with anti-STAT3, anti-Akt, anti-pSTAT3-Tyr705, anti-pAkt-Ser473. To ensure equal protein, loading the blots were stripped and reprobed with anti-β-actin antibody. The blot is representative of three independent experiments with consistent results. *B and C*, Densitometric analyses of the blots are presented as relative ratios of phosphoprotein/total protein. Data were plotted as mean values ± standard error of triplicate determinations (arbitrary units).

Fig. 3. Impact of Akt pathway down modulation on SF763 cells.
A, Cells were treated with Akt inhibitor IV during 7h, then harvested. Total cell extracts were electrophoresed by SDS-PAGE, followed by immunoblotting with anti-Akt, anti-Akt-Ser 473 and with anti-β-actin antibody. *B*, Clonogenic survival of SF763 cell line exposed to a concentration range of Akt inhibitor IV. One representative experiment performed in triplicate is shown. *C*, Clonogenic survival of SF763 cell line exposed to 0,2µM of Akt inhibitor IV during 24h. After 7h of treatment, cells were irradiated to 4 Gy and surviving fraction was compared with that of control (DMSO). *D*, Clonogenic survival of SF763 cell line exposed to 0,2µM of Akt inhibitor IV during 24h. After 7h of treatment cells were irradiated to 0 to 10 Gy and the surviving fraction was compared with that of control (DMSO). One representative of three independent experiments (performed in triplicate) is shown.

Fig. 4. Impact of Akt pathway down modulation on SF767 cells.

A, Cells were treated with Akt inhibitor IV during 7h, then harvested. Total cell extracts were electrophoresed by SDS-PAGE, followed by immunoblotting with anti-Akt, anti-Akt-Ser 473 and with anti-β-actin antibody. *B*, Clonogenic survival of SF767 cell line exposed to a concentration range of Akt inhibitor IV. One representative experiment performed in triplicate is shown. *C*, Clonogenic survival of SF767 cell line exposed to 0,1µM of Akt inhibitor IV during 24h. After 7h of treatment, cells were irradiated to 2 Gy and surviving fraction was compared with control (DMSO). *D*, Clonogenic survival of SF767 cell line exposed to 0,1µM of Akt inhibitor IV during 24h. After 7h of treatment cells were irradiated to 0 to 10 Gy and the surviving fraction was compared with that of control (DMSO). One representative of three independent experiments (performed in triplicate) is shown.

Fig. 5. Impact of STAT3 pathway down modulation on SF763 cells.

A and D. Cells were treated with JSI-124 (7h) or with anti-gp130 blocking antibody (24h). Total proteins were electrophoresed by SDS-PAGE, followed by immunoblotting with anti-STAT3, anti-pSTAT3-Tyr705 and anti-β-actin antibody. *B*, Clonogenic survival of SF763 cell line exposed 24h to a concentration range of JSI-124. One representative experiment performed in triplicate is shown. *C,* Clonogenic survival of SF763 cell line exposed to 0,01µM of JSI-124 during 24h. After 7h of treatment cells were irradiated to 4Gy and the surviving fraction was compared with that of control (DMSO). One representative of three independent experiments (performed in triplicate) is shown. *E,* Clonogenic survival of SF763 cell line exposed to blocking anti-gp130 or to control (IgG2a) antibody when cells were attached in flasks (8h after seeding), before or after irradiation. Cells were irradiated to 4 Gy and the surviving fraction was compared with that of control (IgG2a). Representative experiment performed in triplicate is shown.

Fig. 6. Impact of STAT3 pathway down modulation on SNB19 cells.

A, Cells were treated with anti-gp130 blocking antibody (24h). Total proteins were electrophoresed by SDS-PAGE, followed by immunoblotting with anti-STAT3, anti-pSTAT3-Tyr705 and anti-β-actin antibody. ***B,*** Clonogenic survival of SNB19 cell line exposed to blocking anti-gp130 or to control (IgG2a) antibody when cells were attached in flasks (8h after seeding). Cells were irradiated to 2 Gy and the surviving fraction was compared with that of control (IgG2a). Representative experiment performed in triplicate is shown.

Figure 1

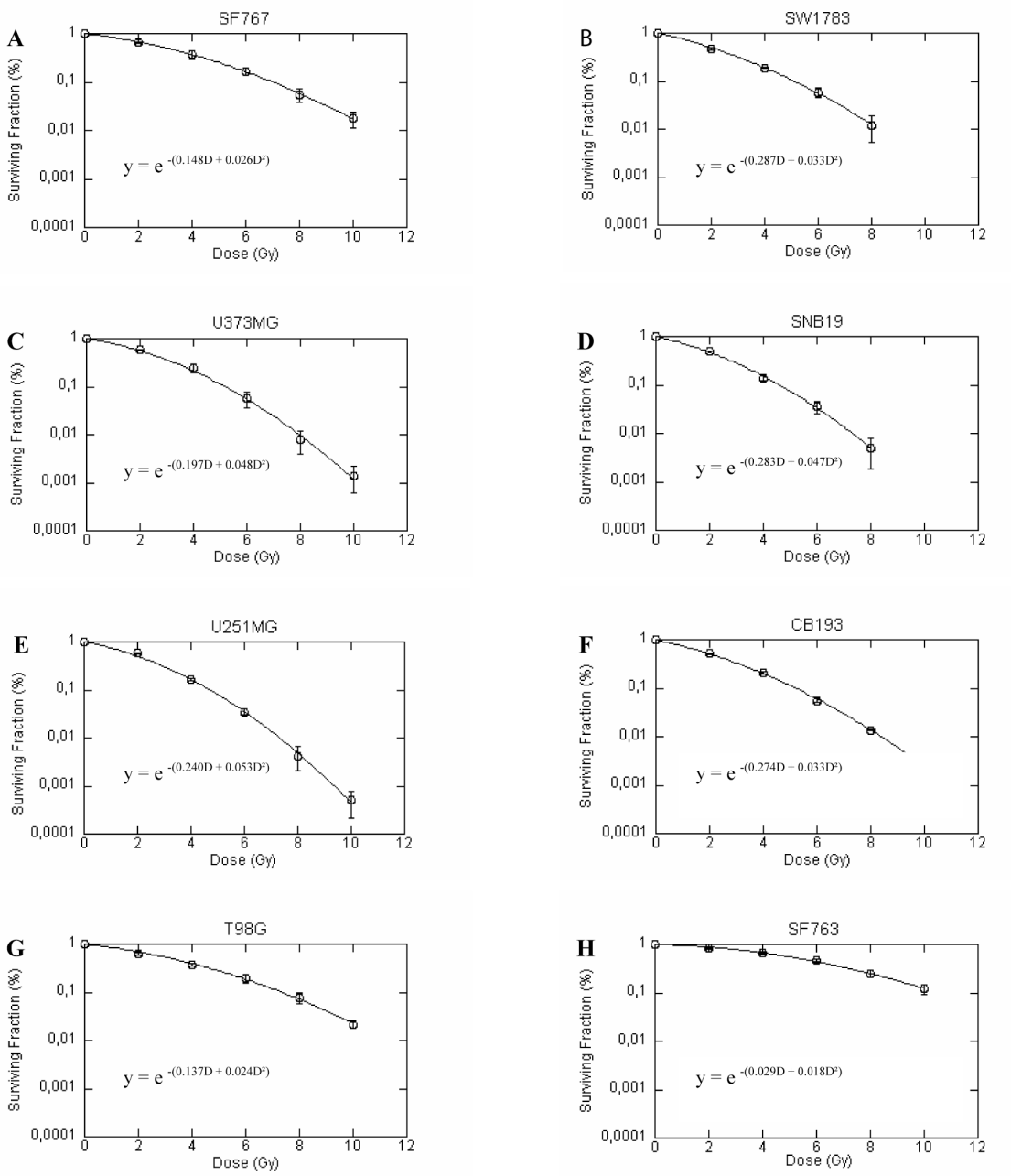

A
SF767
Surviving Fraction (%)
y = e -(0.148D + 0.026D²)
Dose (Gy)
B
SW1783
y = e -(0.287D + 0.033D²)
C
U373MG
y = e -(0.197D + 0.048D²)
D
SNB19
y = e -(0.283D + 0.047D²)
E
U251MG
y = e -(0.240D + 0.053D²)
F
CB193
y = e -(0.274D + 0.033D²)
G
T98G
y = e -(0.137D + 0.024D²)
H
SF763
y = e -(0.029D + 0.018D²)

Figure 2

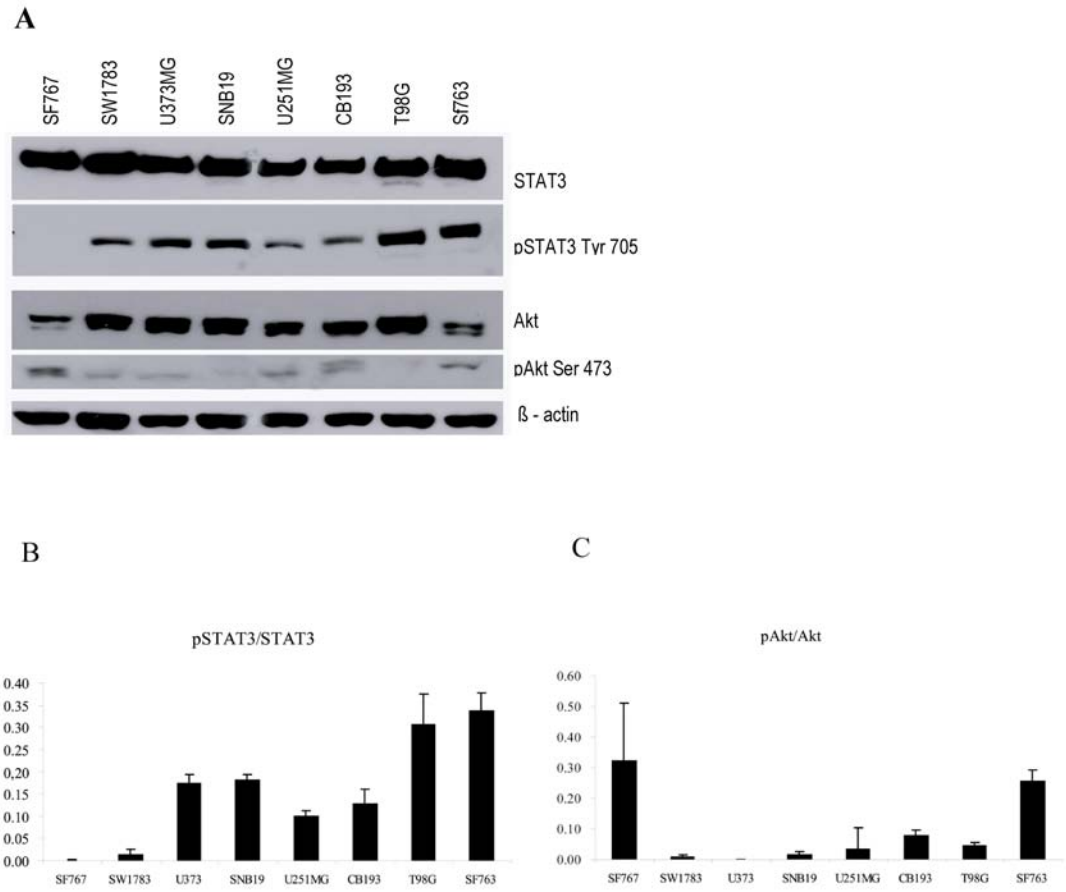

A
SF767
SW1783
U373MG
SNB19
U251MG
CB193
T98G
Sf763
STAT3
pSTAT3 Tyr 705
Akt
pAkt Ser 473
ß - actin
B
pSTAT3/STAT3
0.40
0.35
0.30
0.25
0,20
0.15
0.10
0.05
0.00
SF767
SW1783
U373
SNB19
U251MG
CB193
T98G
SF763
C
pAkt/Akt
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
SF767
SW1783
U373
SNB19
U251MG
CB193
T98G
SF763

Figure 3

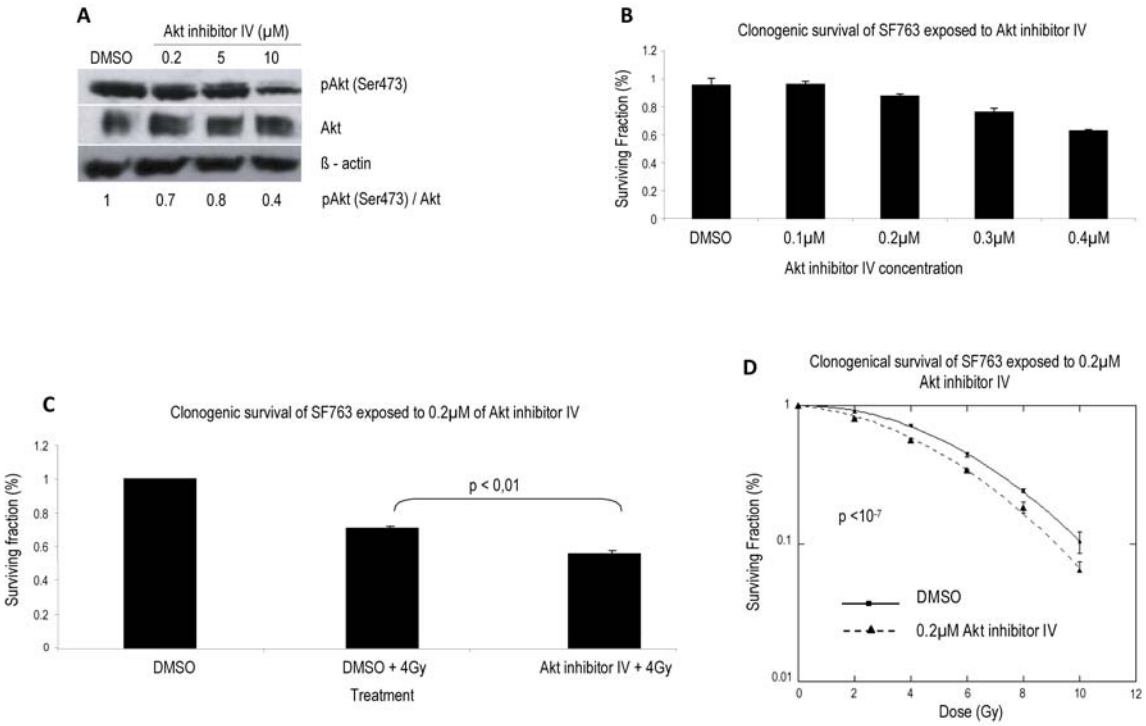

A
Akt inhibitor IV (µM)
DMSO
0.2
5
10
pAkt (Ser473)
Akt
ß - actin
1
0.7
0.8
0.4
pAkt (Ser473) / Akt
B
Clonogenic survival of SF763 exposed to Akt inhibitor IV
Surviving Fraction (%)
DMSO
0.1µM
0.2µM
0.3µM
0.4µM
Akt inhibitor IV concentration
C
Clonogenic survival of SF763 exposed to 0.2µM of Akt inhibitor IV
Surviving fraction (%)
p < 0,01
DMSO
DMSO + 4Gy
Akt inhibitor IV + 4Gy
Treatment
D
Clonogenical survival of SF763 exposed to 0.2µM Akt inhibitor IV
Surviving Fraction (%)
p <10-7
DMSO
0.2µM Akt inhibitor IV
Dose (Gy)

Figure 4

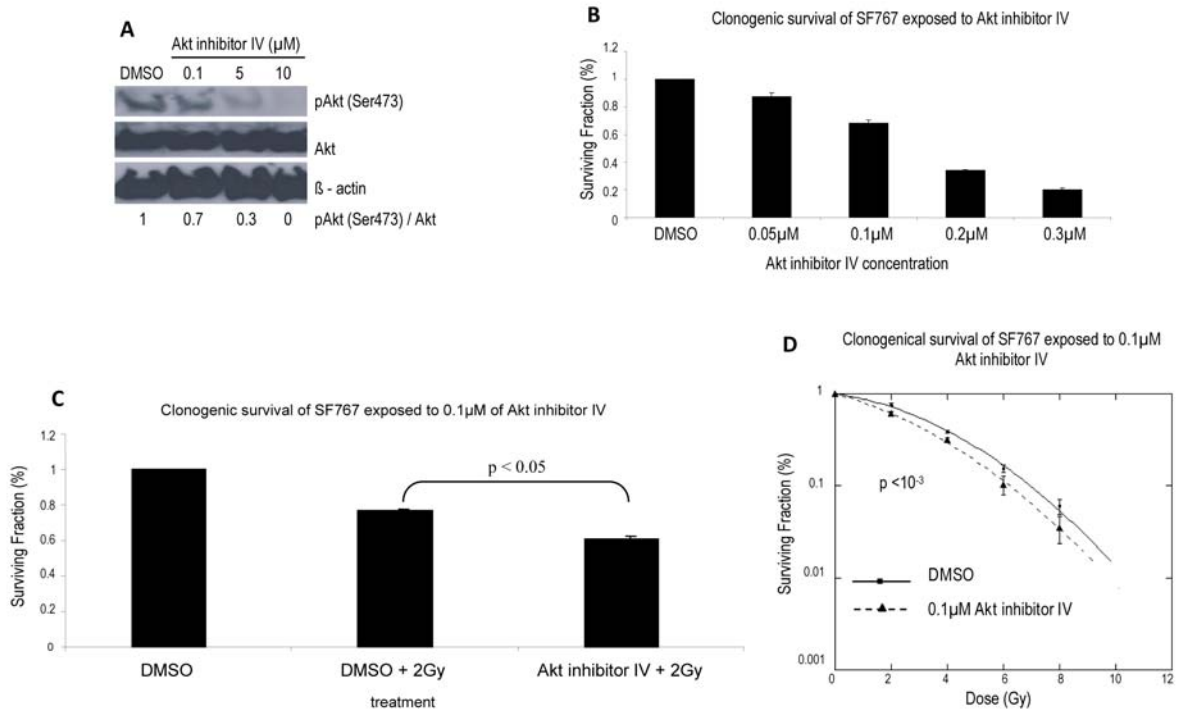

A
Akt inhibitor IV (µM)
DMSO 0.1 5 10
pAkt (Ser473)
Akt
ß - actin
1 0.7 0.3 0
pAkt (Ser473) / Akt
B
Clonogenic survival of SF767 exposed to Akt inhibitor IV
Surviving Fraction (%)
DMSO
0.05µM
0.1µM
0.2µM
0.3µM
Akt inhibitor IV concentration
C
Clonogenic survival of SF767 exposed to 0.1µM of Akt inhibitor IV
p < 0.05
Surviving Fraction (%)
DMSO
DMSO + 2Gy
Akt inhibitor IV + 2Gy
treatment
D
Clonogenical survival of SF767 exposed to 0.1µM Akt inhibitor IV
p <10-3
Surviving Fraction (%)
DMSO
0.1µM Akt inhibitor IV
Dose (Gy)

Figure 5

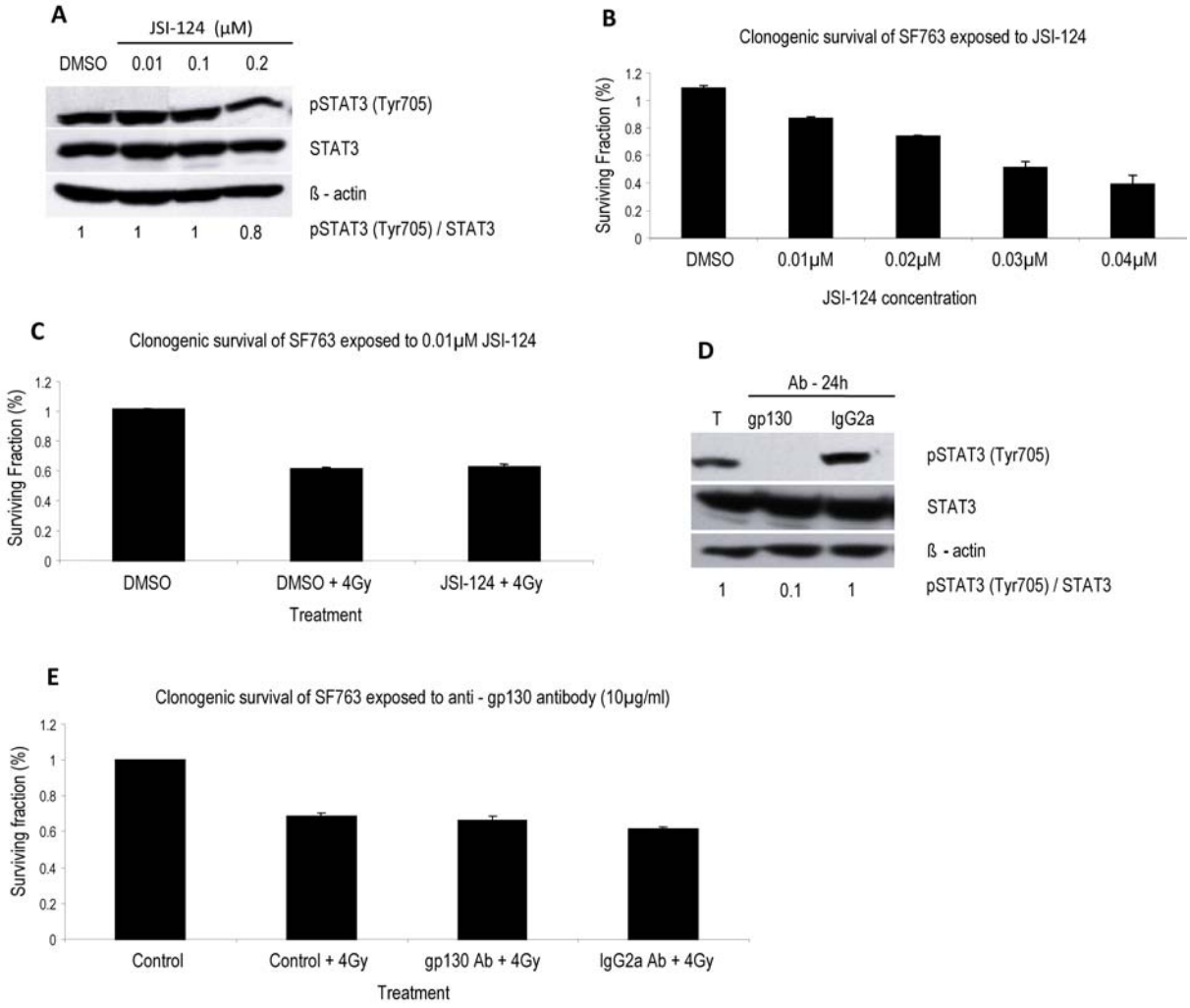

A
JSI-124 (µM)
DMSO 0.01 0.1 0.2
pSTAT3 (Tyr705)
STAT3
ß - actin
1 1 1 0.8
pSTAT3 (Tyr705) / STAT3
B
Clonogenic survival of SF763 exposed to JSI-124
Surviving Fraction (%)
DMSO 0.01µM 0.02µM 0.03µM 0.04µM
JSI-124 concentration
C
Clonogenic survival of SF763 exposed to 0.01µM JSI-124
Surviving Fraction (%)
DMSO DMSO + 4Gy JSI-124 + 4Gy
Treatment
D
Ab - 24h
T gp130 IgG2a
pSTAT3 (Tyr705)
STAT3
ß - actin
1 0.1 1
pSTAT3 (Tyr705) / STAT3
E
Clonogenic survival of SF763 exposed to anti - gp130 antibody (10µg/ml)
Surviving fraction (%)
Control Control + 4Gy gp130 Ab + 4Gy IgG2a Ab + 4Gy
Treatment

Figure 6

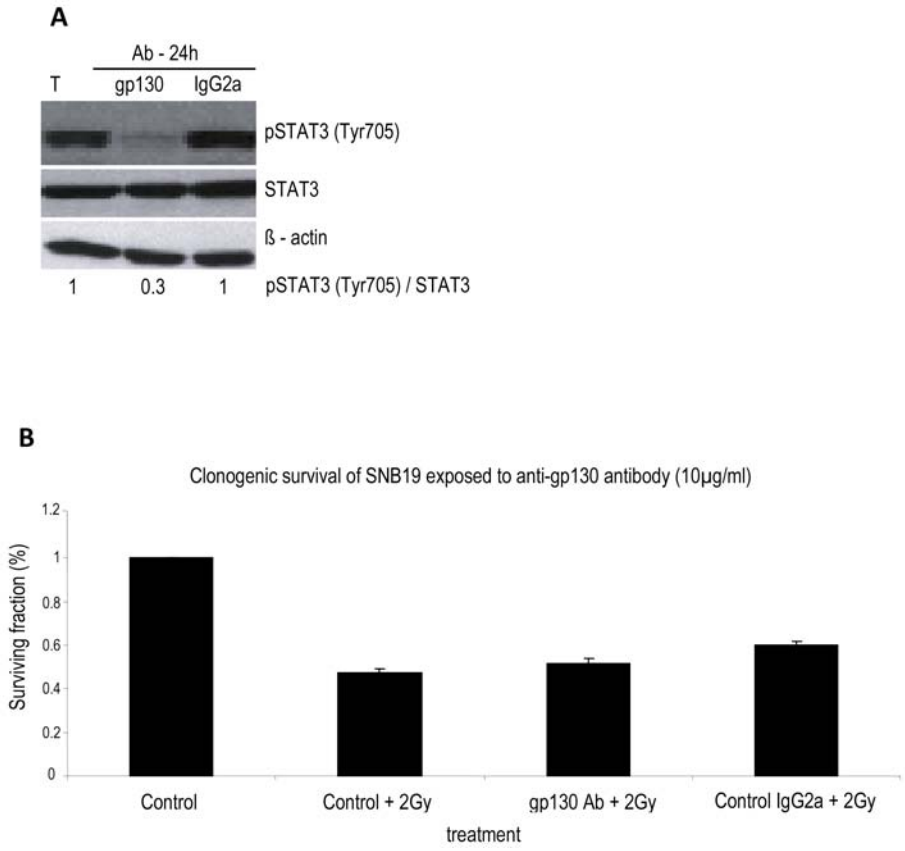

A
Ab - 24h
T
gp130
IgG2a
pSTAT3 (Tyr705)
STAT3
ß - actin
1
0.3
1
pSTAT3 (Tyr705) / STAT3
B
Clonogenic survival of SNB19 exposed to anti-gp130 antibody (10µg/ml)
Surviving fraction (%)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Control
Control + 2Gy
gp130 Ab + 2Gy
Control IgG2a + 2Gy
treatment

Table 1. Radiosensitivity of 8 tumor cell lines.

cell line	Origin	SF2*	AUC† (Gy)	PE††
SF767	glioblastoma	0.68 ± 0.05	3.6	0.20
SW1783	astrocytoma grade III	0.46 ± 0.03	2.4	0.05
U373MG	glioblastoma	0.58 ± 0.03	2.8	0.13
SNB19	glioblastoma	0.50 ± 0.01	2.3	0.12
U251MG	glioblastoma	0.58 ± 0.01	2.6	0.28
CB193	glioma grade III	0.52 ± 0.02	2.6	0.07
T98G	glioblastoma	0.64 ± 0.05	3.6	0.09
SF763	glioblastoma	0.83 ± 0.04	5.5	0.17

*SF2 : Survivin g Fraction at 2 Gy; †AUC : Area Under the survival Curve; ††PE : Plating Efficiency

Résultats et discussion

Nous avons démontré ici que l'activation de la voie Akt à l'état basal était corrélée avec la radiorésistance intrinsèque. Aucune relation n'a pu être mise en évidence entre l'activation de la voie STAT3 et la radiorésistance. Le travail de caractérisation des lignées nous a permis d'identifier des modèles cellulaires différents quant au profil d'activation des voies de signalisation Akt et STAT3. Nous disposons de lignées présentant une co-activation des deux voies (SF763), ou seulement une activation des voies Akt (SF767) ou STAT3 (SNB19).

Nous avons grâce à des inhibiteurs spécifiques réduit l'activation de ces deux voies afin d'en analyser l'impact sur la radiorésistance intrinsèque des différents modèles cellulaires choisis. Il apparaît que l'inhibiteur chimique d'Akt (Akt inhibitor IV) permet de radiosensibiliser les lignées SF763 et SF767. En revanche les stratégies d'inhibition de la voie STAT3 qu'elle soit chimique (JSI-124) ou biologique (anticorps bloquants anti gp-130) ne permettent pas d'augmenter la sensibilité aux radiations ionisantes des lignées SF763 et SNB19.

L'inhibition de la voie Akt semble donc être une meilleure approche thérapeutique que l'inhibition de la voie STAT3 dans le but de radiosensibiliser les gliomes.

La voie Akt peut être activée par de nombreux facteurs parmi lesquels on retrouve l'IL-6. L'absence de corrélation entre le niveau d'expression de l'*IL-6* et la radiorésistance *in vitro* ne présage en rien de l'impact d'une neutralisation de la signalisation IL-6 dépendante sur la sensibilité aux radiations ionisantes. Après le ciblage des voies de signalisation intracellulaires décrit ici, le ciblage de cette cytokine et de son interaction avec son récepteur constitue une autre stratégie dans l'optique d'une inhibition des effets de la voie IL-6.

Article III

Tolerance of high grade human glioma cells to STAT3 inhibition

Emmanuel Chautard, Gaëlle Loubeau, Claudine Vermot-Desroches, Andreï Tchirkov, Jacques Chassagne, Laurent Morel, and Pierre Verrelle

Soumis à British Journal of Cancer .

Objectif de l'étude

Les glioblastomes secrètent de l'IL-6 *in vivo* et *in vitro*. L'amplification du gène *IL-6* et sa surexpression ont été associées à une survie plus faible chez les patients atteints de glioblastomes. La survie des patients passe en effet de 12 à 6 mois entre les groupes sans et avec amplification du gène *IL-6* (Article I).

Après avoir étudié l'impact d'une neutralisation des voies de signalisation anti-apoptotiques (article II), l'IL-6 elle-même constitue un autre niveau de ciblage des effets de la voie de survie IL-6. Afin d'étudier le rôle de l'IL-6 dans la radiorésistance intrinsèque, nous avons analysé l'expression de cette cytokine dans 10 lignées cellulaires de gliomes humains. Nous avons analysé l'impact de l'inhibition de la voie IL-6 en utilisant des anticorps dirigés contre l'IL-6 elle-même ou les sous-unités de son récepteur (gp80 et gp130) sur la prolifération, l'apoptose et la radiorésistance des gliomes. L'utilisation d'anticorps anti-gp130 conduit à la neutralisation de l'action d'autres ligands de la famille de l'IL-6, comme l'OSM et le LIF dont les récepteurs contiennent aussi cette sous-unité et qui sont exprimés dans les glioblastomes (Kasza *et al.* 2001).

Tolerance of high grade human glioma cells to STAT3 inhibition

Emmanuel Chautard, Gaëlle Loubeau, Claudine Vermot-Desroches, Andreï Tchirkov, Jacques Chassagne, Laurent Morel, and Pierre Verrelle

Centre Jean Perrin, Laboratoire de Radio-Oncologie Expérimentale, EA 3846 : Thérapie Ciblée Combinatoire en Onco-Hématologie - Université d'Auvergne, 58 rue Montalembert, Clermont-Ferrand, 63001, France (E.C., G.L., A.T., J.C., P.V.) Laboratoire d'Hématologie Biologique, CHU et Centre Jean Perrin, Clermont Ferrand, 63001, France (J.C.) ; OPi EUSA Pharma, 27 chemin des Peupliers, 69570 Dardilly France (C.V.D.) ; GReD, Génétique Reproduction et Développement, UMR-CNRS 6247 – Clermont Université, 63177 Aubière, France (L.M.)

Running Title : Tolerance to STAT3 inhibition in glioma cells

Address correspondence to: Emmanuel CHAUTARD, Centre Jean Perrin, Laboratoire de Radio-oncologie Expérimentale, EA 3846: Thérapie Ciblée Combinatoire en Onco-Hématologie - Université d'Auvergne, 58 rue Montalembert, Clermont-Ferrand, 63001, France. Tel : +33.4.73.27.81.42 ; Fax : +33.4.73.27.81.25; E-mail : Emmanuel.CHAUTARD@cjp.fr

Abstract

Background : Radiation therapy plays a central role in the treatment of glioblastoma, but it is not curative due to the high tumor radioresistance. Interleukin-6 (IL-6), a cytokine released in vivo and *in vitro* by these tumors, is known to promote tumour growth and survival. Here we studied the effect of IL-6 signaling pathway inhibition on intrinsic radioresistance in IL-6-expressing glioma cells. Methods : IL-6 expression and release from a panel of 10 malignant glioma cell lines was analyzed by RT PCR and ELISA. By using monoclonal antibodies (MAbs) directed against IL-6 itself or its receptor subunits (gp80, gp130), we analysed the impact of IL-6 pathway's inhibition on proliferation, apoptosis and radioresistance. Results : Incubation of glioma cell line SF763 and SNB19 with anti IL-6 or anti IL-6R MAbs induced a striking inhibition of Tyr 705 STAT3 phosphorylation. However this inhibition does not affect proliferation, apoptosis and radioresistance of glioma cells harboring STAT3 basal activation. Conclusion : The *in vitro* tolerance to STAT3 inhibition could be a characteristic of glioma cells. STAT3 seems to be a relevant target in glioma but might be rather involved in micorenvironnement interaction such as immunosuppression or angiogenesis than in cell proliferation and radioresistance.

Keywords : glioma cells, IL-6, STAT3 inhibition, proliferation, apoptosis, radioresistance

Introduction

Gliomas are the most common primary tumors of the central nervous system. Among these tumors, the most frequent and malignant type is glioblastoma (GBM) (Gurney & Kadan-Lottick, 2001; Legler et al, 1999; Ohgaki & Kleihues, 2005). Glioblastomas have been described as rapidly growing tumors associated with necrosis and endothelial proliferation. These neoplasms are extremely resistant to treatment, including radiotherapy and/or chemotherapy, and patient median survival does not exceed 1 year (DeAngelis et al, 1998; Stupp et al, 2005). Although radiotherapy increases patient survival, this treatment is not curative because of tumor regrowth inside the irradiated tumor volume (Bleehen & Stenning, 1991; Walker et al, 1980; Walker et al, 1979). Interactions between tumor and its micro-environment are involved in tumoral radioresistance through angiogenesis, (Shannon & Williams, 2008) hypoxia (Bussink et al, 2003) and immunosuppression (Apetoh et al, 2007;

De Ridder et al, 2004). Another part of tumor radioresistance is due to intrinsic radioresistance of tumor cells themselves.

Interleukin-6 (IL-6) is a 21–28-kDa glycoprotein of 212 amino acids with variable glycosylation that binds to a specific membrane receptor, gp80 (α chain, IL-6R, or CD126) on target cells (Kamimura et al, 2003). Two IL-6/IL6-R complexes associate with two molecules of the ubiquitously expressed gp130 (β chain, CD130) resulting in the formation of a high-affinity hexameric IL-6 complex (Ward et al, 1994). IL-6 is a cytokine with pleiotropic effects that regulates the immune response but also plays a role in modulating cell growth, differentiation and survival. This cytokine has been implicated in cancer progression and in various diseases including Alzheimer's disease, autoimmunity (e.g., rheumatoid arthritis), inflammation, myocardial infarction and osteoporosis (Kamimura et al, 2003).

IL-6 is able to act through several classic protein kinase cascades such as Phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K) / Protein Kinase B (Akt) and Janus Kinase (JAK) / Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) (Heinrich et al, 2003). STAT3 phosphorylated Tyr705 and Akt phosphorylated Ser473 residues are known to be active phosphorylation sites downstream IL-6 receptor (Alessi et al, 1997; Levy & Darnell, 2002). The role of IL-6 in chemoresitance and radioresistance seems to be related to its ability to block programmed cell death through these pathways. Studies on IL-6 producing tumors such as melanoma (Lu et al, 1996), glioma (Van Meir et al, 1990), prostate cell carcinoma (Borsellino et al, 1995; Borsellino et al, 1999; Chung et al, 1999), renal cell carcinoma (Mizutani et al, 1995) and pancreatic carcinoma (Miyamoto et al, 2001) have implicated IL-6 as a factor of resistance to tumor cell killing by chemotherapeutic drugs or radiation.

Gliomas often release biologically active IL-6 in vivo (Van Meir et al, 1990) and *in vitro* (Dubost et al, 2002). In these tumors, the level of IL-6 gene expression increases with the grade of malignancy (Rolhion et al, 2001). We have recently reported that IL-6 gene amplification and overexpression were associated with poor survival in patients with malignant gliomas (Tchirkov et al, 2007). Here, we studied IL-6 expression in a panel of 10 malignant glioma cell lines and explored if secreted IL-6 is involved in intrinsic radioresistance in an autocrine manner. Using specific monoclonal antibodies (MAbs) directed against IL-6 itself or its receptor subunits (gp80 or gp130), we analysed impact of IL-6 pathway inhibition on proliferation, apoptosis and radioresistance. Here we show that these

antibodies induced a striking inhibition of STAT3 pathway. However, this inhibition does not affect proliferation, apoptosis and radioresistance of glioma cells harboring STAT3 basal activation. Thus, the resistance of malignant glioma cells to radiation was not correlated to IL-6 signaling pathway alone. Our results underlined that the tolerance to STAT3 inhibition could be a characteristic of glioma cells.

Materials and Methods

Materials - The polyclonal rabbit antibodies directed against Akt (No 9272), phospho-Akt Ser473 (No 9271), STAT3 (No 4904), and phospho-STAT3 Tyr705 (No 9145) were purchased from Ozyme (Saint Quentin Yvelines, France). β-actin (No A2066) was from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Anti rabbit-peroxidase was from P.A.R.I.S. (Compiègne, France). All culture reagents were purchased from GIBCO (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The MAbs anti human gp130 (No 852.060.000, clone B-R3), anti human gp80 (No 852.030.000, clone B-R6), anti human IL-6 (No 855.050.005, clone B-E8) and isotype-matched control antibody IgG2a (No 857.080.000, clone B-Z2) or IgG1 (No 857.070.000, clone B-Z1) were purchased from Diaclone (Besançon, France).

Cell culture – SF763, SF767, U87MG and U251MG cell lines were kindly provided by Dr C. Delmas (Centre de Lutte Contre le Cancer Claudius Regaud, Toulouse, France). SW1783, SNB19, and U373MG were obtained from N. Auger (Institut Curie, Paris, France). T98G, U118MG and CB193 cell lines were kindly provided by G. Pennarun (CEA, Grenoble, France). All cell lines were cultured in DMEM (with 4500mg/l glucose and L-glutamine) supplemented with Sodium Pyruvate 1%, Non Essential Amino Acids 1%, Gentamicin 10µg/ml and 10% Foetal Calf Serum in a humidified incubator containing 5% CO2 at 37°C. All cell lines were mycoplasm free after treatment with plasmocin (Invivogen, Toulouse, France).

Real Time PCR - Total RNA was extracted from the cells using the Trizol Reagent (Invitrogen). Abl gene is used as an internal endogenous standard and the results are expressed as an IL-6/Abl ratio. The cDNA template was prepared using random hexamer primers and Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Invitrogen). After the reverse transcription IL-6 mRNA was quantitated using real-time PCR technology and the

following primers: forward 5'TGAACTCCTTCTCCACAAGCG -3' and reverse 5'-TCTGAAGAGGTGAGTGGCTGTC-3'(Tchirkov et al, 2001). Primers used for Abl were as follows : forward 5'-GCCGCTCGTTGGAACTCCAAGG-3' and reverse 5'-TGACTGGCGTGATGTAG-TTTGCTT-3'(Tchirkov et al, 2003). For quantification, we used real-time PCR (LightCycler, Roche) using SYBR green as the fluorophore. The reactions were performed in duplicate, with a variation between two crossing point values ≤ 0.5.

Clonogenic cell survival assay - Cells in exponential phase of growth were trypsinised with a 0.25% Trypsin-PBS solution and were seeded at 1000 to 4000 cells per T25 flask. One day after, three flasks were irradiated per dose and irradiation was performed as single exposure doses delivered by a linear accelerator at room temperature. After 9 days of incubation, the content of the flasks were fixed with methanol and stained with a Giemsa stain solution (5%). The Plating Efficiency (PE) represents the percentage of cells seeded that grow into colonies of a given cell line. Colonies with more than 50 cells were counted by microscopic inspection, and plating efficiency as well as the radiation-surviving fraction (plating efficiency of experimental group/ plating efficiency of control group) was determined. Each experiment was performed at least in triplicate. The intrinsic radiosensitivity was evaluated by the Surviving Fraction. Antibodies were added in medium after cells were attached in flasks and remain in culture medium until the end.

Western blot - Cells in exponential phase of growth were harvested using Buffer C supplemented with NP-40, phosphatase inhibitors (NaF, Na2VO3) and protease inhibitor IP25X (Roche). Total proteins (30µg) were boiled in Laemmli sample buffer and subjected to SDS-PAGE. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL, Amersham Biosciences) followed by blocking in Tris-buffered saline 1X, 10% powdered milk (Fat free), and incubated with indicated antibodies in the same buffer overnight at 4°C. Membranes were washed three times with 1X Tris-buffered saline, 0.05% Tween 20, and then incubated 1h with anti-rabbit (P.A.R.I.S) peroxidase-conjugated IgG. Detection was performed using ECL system (PerkinElmer Life Sciences). Three independent experiments were used for analysis with Quantity One (BioRad).

ELISA - ELISA for IL-6 with minimum sensitivity of 2pg/ml was carried out with Cytoscreen Immunoassay Kits purchased from BioSource Europe S.A. (Nivelles, Belgium). Supernatants of growing cell cultures either undiluted or diluted with culture media were added to ELISA

wells coated with antibodies against IL-6. After washing, biotin-conjugated antibody preparation directed against the same molecule was added. The amount of reactive antibody was determined by Streptavidin-HRP and a chromogen provided by the commercial test kits. Standard amounts of molecules were assayed in parallel for comparison. Samples were assayed in duplicate.

Apoptosis and proliferation - Cells were seeded at a density of 1 500 per well in 96 well plates. Twenty four hours after seeding, they were incubated with medium alone or exposed for 96 hours to MAb (gp80, gp130 or IL-6) or control (IgG1, IgG2a) antibodies. For flow cytometry analysis, cells were recovered after treatment and washed in PBS. Pellets were resuspended in an RNase A (500 µg/ml), propidium iodide (50 µg/ml) solution and kept 1 h at 4 °C in the dark. Cell suspensions were analyzed using a Beckman Coulter Analyser XL2. The percentage of apoptotic cells was determined by evaluating sub-G1 nuclei accumulation. At least 8000 events were measured for each sample. DNA-synthesis was determined by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation (4h) using the Cell Proliferation ELISA (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) which is based on incorporation of BrdU into newly synthesized DNA and antibody-mediated detection of incorporated BrdU, as described by (Herold et al, 2002). Proliferation was evaluated by percentage of BrdU incorporation compared to control (medium alone).

Results

In vitro IL-6 expression and release in glioma

To explore IL-6 expression and release from our malignant glioma cell line panel, IL-6 mRNA using real time RT-PCR and IL-6 protein level in cell culture supernatant using ELISA assay were quantified (Table 1). All the different malignant glioma cell lines expressed and secreted IL-6 except for the cell line SF767. We found a significant correlation between IL-6 mRNA and IL-6 protein level ($r = 0.748$, $p = 0.013$; linear regression) from IL-6 positive cell lines.

Significant impact of IL-6 pathway inhibition on glioma intracellular signaling

After linking to its receptor, IL-6 is able to activate intracellular signaling pathway such as PI3K/Akt and JAK/STAT3. In the present study, the cell line SF763 showing a basal co-

activation of both pathways (Figure 1), was selected to study the impact of IL-6 pathway down modulation on intracellular signaling. For this, STAT3 phosphorylated Tyr705 and Akt phosphorylated Ser473 residues, which are known to be active phosphorylation sites downstream IL-6 receptor (Alessi et al, 1997; Levy & Darnell, 2002) and total STAT3 and Akt expressions were analyzed by Western blot. As shown in Figure 2A, the exposure of SF763 cells to MAbs anti-gp130, anti-gp80, or anti-IL-6 treatment abrogated activation of STAT3 pathway after 24h of treatment. This decrease is highly specific regarding to IgG1 and IgG2a control antibodies' effect. By contrast, Akt activation level was not altered after the same treatment. To confirm antibodies impact on STAT3 signaling, we used a second cell line harboring only a basal STAT3 activation (Figure 1). We found that the Mab anti-gp-130 was able to decrease STAT3 Tyr 705 phosphorylation whereas anti-gp80 and anti-IL-6 Mabs did not (Figure 2B).

No Impact of IL-6 pathway inhibition on glioma proliferation or apoptosis

Investigation on proliferation and apoptosis were performed on both SF763 and SNB19 cells in the presence of MAbs. Proliferation was evaluated by percentage of BrdU incorporation compared to control. After a 96h exposure to antibodies and despite abrogation of STAT3 activation pathway, SF763 cells proliferation was not altered (Figure 3A). Knowing that IL-6 pathway is also involved in anti-apoptotic process, we evaluated apoptosis as sub G0/G1 cell fraction. As shown in Figure 4A, IL-6 pathway inhibition did not induce an increase of sub G0/G1 population. The same results were obtained with SNB19 cell line (Figures 3B and 4B).

Impact of IL-6 pathway inhibition on glioma radioresistance

Cell treatment with antibodies anti-gp130, anti-gp80 or anti-IL-6 did not affect proliferation or apoptosis. Because it induced an inhibition of pro-survival pathway (STAT3), it might act synergistically with pro-apoptotic inducers such as radiation and then improve treatment effect. We studied antibodies ability to radiosensitize glioma cell lines using clonogenic cell survival assay. The exposure of SF763 and SNB19 cells to the MAbs anti-gp130, anti-gp80 or anti-IL-6 (10µg/ml) did not affect plating efficiency (data not shown). In all three conditions, despite a strong decrease of STAT3 pathway activation (Figure 2A), the antibody exposure did not radiosensitize SF763 cells (Figure 5A). As shown in Figure 5B, no radiosensitizing effect was observed in SNB19 cell line too.

Discussion

Radiotherapy is a part of the gold standard treatment of glioblastomas, but these tumors are radioresistant. Targeting signaling pathways involved in GBM radioresistance may improve clinical results of radiotherapy. These tumors often release biologically active IL-6 *in vivo* (Van Meir et al, 1990) and *in vitro* (Dubost et al, 2002). We have recently reported that IL-6 gene amplification and overexpression were associated with poor survival in patients with malignant gliomas (Tchirkov et al, 2007).

The role of IL-6 in chemoresitance and radioresistance seems to be related to its ability to block programmed cell death through PI3K/Akt and JAK/STAT3 pathways. In the present study, firstly IL-6 expression and release from a panel of 10 malignant glioma cell lines was analysed. Then involvement of autocrine IL-6 in intrinsic radioresistance was explored. Using specific MAbs directed against IL-6 itself or its receptor subunits we analysed impact of IL-6 pathway inhibition on proliferation, apoptosis or radioresistance.

By using antibodies against gp80, gp130 or IL-6, an abrogation of STAT3 pathway activation in SF763 cell line was observed. These results demonstrate that IL-6 acts in an autocrine manner on SF763 cells. By contrast, only the anti gp-130 antibody inhibited STAT3 signaling in SNB19 cells. In SNB19 cells, STAT3 activation involving gp130 might rather result from the binding of another ligand than IL-6 as gp130 is a receptor subunit common to many receptor such as Interleukin-11 receptor, Leukemia Inhibitory Factor receptor or Oncostatin M receptor (Kamimura et al, 2003). We did not observe any decrease in Akt activation in SF763 cell line. The PI3K/Akt pathway could be activated by numerous cytokines or growth factors so it seems that IL-6 is not the major activator of Akt signaling in SF763 cells.

Previous data demonstrated the ability of the MAbs against gp80, gp130 or IL-6 to inhibit proliferation in other cell lines (Chevalier et al, 1996; Fourcin et al, 1994; Wijdenes et al, 1991). In the present study, we did not found any effect on proliferation, apoptosis or radioresistance of glioma cells. By contrast, Janus kinase inhibitor AG490 or WP1066 treatment inhibited STAT3 activation, markedly reduced the proliferation and induced apoptosis of U251MG glioma cells (Iwamaru et al, 2007; Rahaman et al, 2002).

Further experiments are needed to better understand STAT3 involvement in glioma proliferation and anti-apoptotic mechanisms. In our study, anti-IL6 treatment failed to

radiosensitize glioma cells despite a striking inhibition of STAT3 signaling. Recent data have shown that treatment with a combination of IL-6 and VEGF (Vascular Endothelial Growth factor) inhibitors brings synergistic antitumoral benefit and reduces global activity of major pathways of cell survival, proliferation and invasiveness in remaining tumor cells that may be induced by using VEGF or IL-6 inhibitors alone (Saidi et al, 2009). Our results showed significant correlation between IL-6 mRNA and IL-6 protein level. We have previously characterized radiosensitivity of these cell lines (Chautard et al, 2009), but no correlation was found between radioresistance and IL-6 expression or secretion. This might be explained by the fact that IL-6 is not the only factor involved in intrinsic radioresistance.

Tumors invoke a number of normal mechanisms for self-tolerance and inhibition of robust immune responses. STAT3 activation in micro-environmental cells has recently been associated with this immunosuppression phenomenon in glioma (Abou-Ghazal et al, 2008). Tumors use it to protect themselves from being eliminated by elements of the immune system that can recognise tumor antigens. Tumors produce factors in their micro-environments, mostly in the form of cytokines that actually break that dendritic-cell–activation cycle that leads to productive immune responses. And two of the cytokines that are now known to be produced by tumours and to inhibit dendritic cells are IL-6 and IL-10 (O'Neill et al, 2004). Moreover, inhibition of STAT3 signaling with WP1066, that can penetrate the central nervous system (CNS) in mice, reverses tolerance in immune cells isolated from glioblastoma multiforme (GBM) patients at physiologically relevant doses (Hussain et al, 2007).

A recent study reports that tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth in oral squamous cell carcinoma (OSCC). This might be explained by IL-6 action on micro-environment and more specifically on VEGF transcription through STAT3 pathway (Shinriki et al, 2009).

In summary, our results strongly suggest that *in vitro* STAT3 inhibition tolerance could be a characteristic of glioma cells. Because STAT3 is frequently activated in human glioblastoma tissues, and its activation is implicated in many cellular processes, STAT3 is a hub in glioma signaling and has significant potential as a relevant therapeutic target (Brantley & Benveniste, 2008). Our data and other reports suggest that STAT3 signaling pathway activation might be rather involved in micro-environment interaction such as immunosuppression or angiogenesis than in cell proliferation and radioresistance.

Acknowledgments

This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Puy De Dôme) and by the Region Auvergne. We are grateful to Michele Manin for helpful advices for cell cultures; Yves Communal, Angélique DeHaze, Antoine Nigon, Florence Petiard and Jean-Paul Saru for technical assistance. E.C. was the recipient of a fellowship from the MENESR (Ministère de l'Education Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche).

Captions

Table 1 : IL-6 mRNA and IL-6 release quantification.

Supernatants of growing cell cultures were tested by IL-6 ELISA assay. Total cellular RNA was isolated and real-time reverse transcription PCR was performed as described in Material and Methods. The results were expressed as IL-6 / Abl ratio (arbitrary units).

Figure 1: Akt and STAT3 basal signaling pathways activation.

Cells were harvested during exponential growth phase and 30µg of total proteins were loaded per lane and electrophoresed by SDS-PAGE. Transfer membranes were immunoblotted with antibodies anti-STAT3, anti-Akt, anti-pSTAT3-Tyr705 or anti-pAkt-Ser473. To ensure equal protein, loading the blots were stripped and reprobed with anti-β-actin antibody. The blot is representative of three independent experiments with consistent results.

Figure 2: Impact of IL-6 pathway inhibition on intracellular signaling.

SF763 (**A**) and SNB19 (**B**) cells were treated for 24h with or whitout MAbs anti- IL-6/IL6R or isotype related control antibodies. Total proteins were electrophoresed by SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-STAT3, anti-Akt, anti-pSTAT3-Tyr705, anti-pAkt-Ser473 and anti-β-actin antibody. The blot is representative of three independent experiments with consistent results.

Figure 3: Cell proliferation following antibodie exposure.

BrdU incorporation was evaluated in SF763 (**A**) and SNB19 (**B**) cells as described in Materials and Methods. Proliferation was evaluated by percentage of BrdU incorporation compared to control (medium alone or isotype MAb after 96h of treatment (mean of triplicate experiments).

Figure 4: Sub G0/G1 cells following antibodie exposure.

After 96h of treatment with antibodies, SF763 (**A)** and SNB19 (**B)** cells were harvested and stained with propidium iodide. DNA content was analyzed by flow cytometry. Data are shown as mean of triplicate experiments.

Figure 5: Impact of antibodies on glioma radioresistance.

Clonogenic survival of SF763 (**A**) and SNB19 (**B**) cell line was performed with our whithout MAbs (directed against IL-6/IL-6R or control antibodies (IgG1, IgG2a). Following 2 or 4Gy irradiation to , the surviving fraction was determined and compared with that of control. Representative experiment performed in triplicate is shown.

References

Abou-Ghazal M, Yang DS, Qiao W, Reina-Ortiz C, Wei J, Kong LY, Fuller GN, Hiraoka N, Priebe W, Sawaya R, Heimberger AB (2008) The incidence, correlation with tumor-infiltrating inflammation, and prognosis of phosphorylated STAT3 expression in human gliomas. *Clin Cancer Res* **14:** 8228-35

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* **7:** 261-9

Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, Andre F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* **13:** 1050-9

Bleehen NM, Stenning SP (1991) A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. The Medical Research Council Brain Tumour Working Party. *Br J Cancer* **64:** 769-74

Borsellino N, Belldegrun A, Bonavida B (1995) Endogenous interleukin 6 is a resistance factor for cis-diamminedichloroplatinum and etoposide-mediated cytotoxicity of human prostate carcinoma cell lines. *Cancer Res* **55:** 4633-9

Borsellino N, Bonavida B, Ciliberto G, Toniatti C, Travali S, D'Alessandro N (1999) Blocking signaling through the Gp130 receptor chain by interleukin-6 and oncostatin M inhibits PC-3 cell growth and sensitizes the tumor cells to etoposide and cisplatin-mediated cytotoxicity. *Cancer* **85:** 134-44

Brantley EC, Benveniste EN (2008) Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas. *Mol Cancer Res* **6:** 675-84

Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ (2003) Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother Oncol* **67:** 3-15

Chautard E, Loubeau G, Chassagne J, Tchirkov A, Vermot-Desroches C, Morel L, Verrelle P Akt signaling pathway : a target for radiosensitizing human malignantglioma. *Neuro-Oncology***:** *in press*

Chevalier S, Fourcin M, Robledo O, Wijdenes J, Pouplard-Barthelaix A, Gascan H (1996) Interleukin-6 family of cytokines induced activation of different functional sites expressed by gp130 transducing protein. *J Biol Chem* **271:** 14764-72

Chung TD, Yu JJ, Spiotto MT, Bartkowski M, Simons JW (1999) Characterization of the role of IL-6 in the progression of prostate cancer. *Prostate* **38:** 199-207

De Ridder M, Verovski VN, Darville MI, Van Den Berge DL, Monsaert C, Eizirik DL, Storme GA (2004) Macrophages enhance the radiosensitizing activity of lipid A: a novel role for immune cells in tumor cell radioresponse. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **60:** 598-606

DeAngelis LM, Burger PC, Green SB, Cairncross JG (1998) Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? *Ann Neurol* **44:** 691-5

Dubost JJ, Rolhion C, Tchirkov A, Bertrand S, Chassagne J, Dosgilbert A, Verrelle P (2002) Interleukin-6-producing cells in a human glioblastoma cell line are not affected by ionizing radiation. *J Neurooncol* **56:** 29-34

Fourcin M, Chevalier S, Lebrun JJ, Kelly P, Pouplard A, Wijdenes J, Gascan H (1994) Involvement of gp130/interleukin-6 receptor transducing component in interleukin-11 receptor. *Eur J Immunol* **24:** 277-80

Gurney JG, Kadan-Lottick N (2001) Brain and other central nervous system tumors: rates, trends, and epidemiology. *Curr Opin Oncol* **13:** 160-6

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374:** 1-20

Herold C, Ganslmayer M, Ocker M, Hermann M, Hahn EG, Schuppan D (2002) Combined in vitro anti-tumoral action of tamoxifen and retinoic acid derivatives in hepatoma cells. *Int J Oncol* **20:** 89-96

Hussain SF, Kong LY, Jordan J, Conrad C, Madden T, Fokt I, Priebe W, Heimberger AB (2007) A novel small molecule inhibitor of signal transducers and activators of transcription 3 reverses immune tolerance in malignant glioma patients. *Cancer Res* **67:** 9630-6

Iwamaru A, Szymanski S, Iwado E, Aoki H, Yokoyama T, Fokt I, Hess K, Conrad C, Madden T, Sawaya R, Kondo S, Priebe W, Kondo Y (2007) A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo. *Oncogene* **26:** 2435-44

Kamimura D, Ishihara K, Hirano T (2003) IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **149:** 1-38

Legler JM, Ries LA, Smith MA, Warren JL, Heineman EF, Kaplan RS, Linet MS (1999) Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst* **91:** 1382-90

Levy DE, Darnell JE, Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3:** 651-62

Lu C, Sheehan C, Rak JW, Chambers CA, Hozumi N, Kerbel RS (1996) Endogenous interleukin 6 can function as an in vivo growth- stimulatory factor for advanced-stage human melanoma cells. *Clin Cancer Res* **2:** 1417-25

Miyamoto Y, Hosotani R, Doi R, Wada M, Ida J, Tsuji S, Kawaguchi M, Nakajima S, Kobayashi H, Masui T, Imamura M (2001) Interleukin-6 inhibits radiation induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* **21:** 2449-56

Mizutani Y, Bonavida B, Koishihara Y, Akamatsu K, Ohsugi Y, Yoshida O (1995) Sensitization of human renal cell carcinoma cells to cis-diamminedichloroplatinum(II) by anti-interleukin 6 monoclonal antibody or anti-interleukin 6 receptor monoclonal antibody. *Cancer Res* **55:** 590-6

O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N (2004) Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood* **104:** 2235-46

Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* **109:** 93-108

Rahaman SO, Harbor PC, Chernova O, Barnett GH, Vogelbaum MA, Haque SJ (2002) Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene* **21:** 8404-13

Rolhion C, Penault-Llorca F, Kemeny JL, Lemaire JJ, Jullien C, Labit-Bouvier C, Finat-Duclos F, Verrelle P (2001) Interleukin-6 overexpression as a marker of malignancy in human gliomas. *J Neurosurg* **94:** 97-101

Saidi A, Hagedorn M, Allain N, Verpelli C, Sala C, Bello L, Bikfalvi A, Javerzat S (2009) Combined targeting of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor potently inhibits glioma growth and invasiveness. *Int J Cancer* **125:** 1054-64

Shannon AM, Williams KJ (2008) Antiangiogenics and radiotherapy. *J Pharm Pharmacol* **60:** 1029-36

Shinriki S, Jono H, Ota K, Ueda M, Kudo M, Ota T, Oike Y, Endo M, Ibusuki M, Hiraki A, Nakayama H, Yoshitake Y, Shinohara M, Ando Y (2009) Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **15:** 5426-34

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, Group NCIoCCT (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352:** 987-96

Tchirkov A, Khalil T, Chautard E, Mokhtari K, Veronese L, Irthum B, Vago P, Kemeny JL, Verrelle P (2007) Interleukin-6 gene amplification and shortened survival in glioblastoma patients. *Br J Cancer* **96:** 474-6

Tchirkov A, Rolhion C, Bertrand S, Dore JF, Dubost JJ, Verrelle P (2001) IL-6 gene amplification and expression in human glioblastomas. *Br J Cancer* **85:** 518-22

Tchirkov A, Rolhion C, Kemeny JL, Irthum B, Puget S, Khalil T, Chinot O, Kwiatkowski F, Perissel B, Vago P, Verrelle P (2003) Clinical implications of quantitative real-time RT-PCR analysis of hTERT gene expression in human gliomas. *Br J Cancer* **88:** 516-20

Van Meir E, Sawamura Y, Diserens AC, Hamou MF, de Tribolet N (1990) Human glioblastoma cells release interleukin 6 in vivo and in vitro. *Cancer Res* **50:** 6683-8

Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander EJ, Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MSJ, Mealey JJ, Owens G, Ransohoff Jn, Robertson JT, Shapiro WR,

Smith KRJ, Wilson CB, Strike TA (1980) Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* **303:** 1323-9

Walker MD, Strike TA, Sheline GE (1979) An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **5:** 1725-31

Ward LD, Howlett GJ, Discolo G, Yasukawa K, Hammacher A, Moritz RL, Simpson RJ (1994) High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *J Biol Chem* **269:** 23286-9

Wijdenes J, Clement C, Klein B, Morel-Fourrier B, Vita N, Ferrara P, Peters A (1991) Human recombinant dimeric IL-6 binds to its receptor as detected by anti-IL-6 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* **28:** 1183-92

Table 1

cell line	origin	IL-6 production (pg/ml)	IL-6 mRNA (ratio IL-6/Abl)
SF763	glioblastoma	1107	0,92
U251MG	glioblastoma	968	0,38
U373MG	glioblastoma	319	0,05
SNB19	glioblastoma	114	0,17
T98G	glioblastoma	2900	0,37
CB193	glioma grade III	2184	0,26
U118MG	glioblastoma	692	0,13
U87MG	glioblastoma	4495	0,96
SW1783	astrocytoma grade III	4854	3,49
SF767	glioblastoma	5	0,00
culture medium		5	

Figure 1

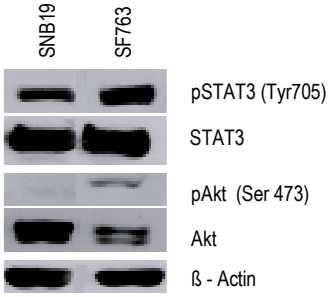


Figure 2

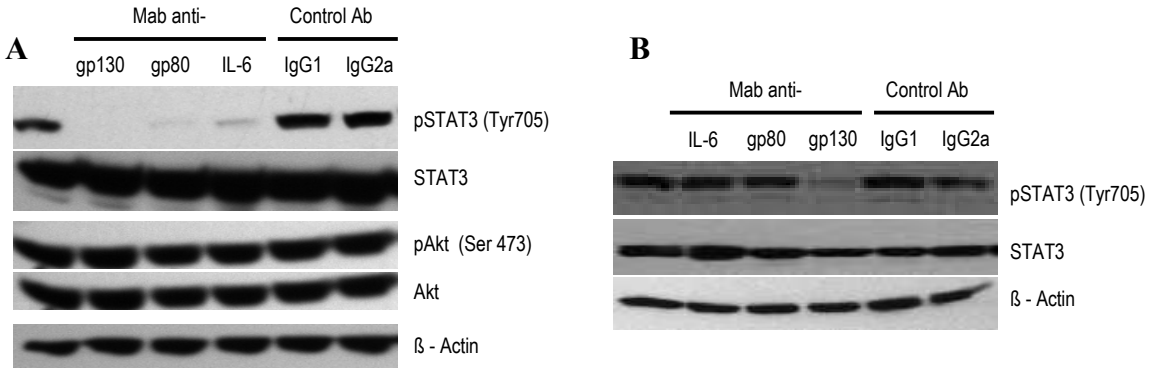


Figure 3

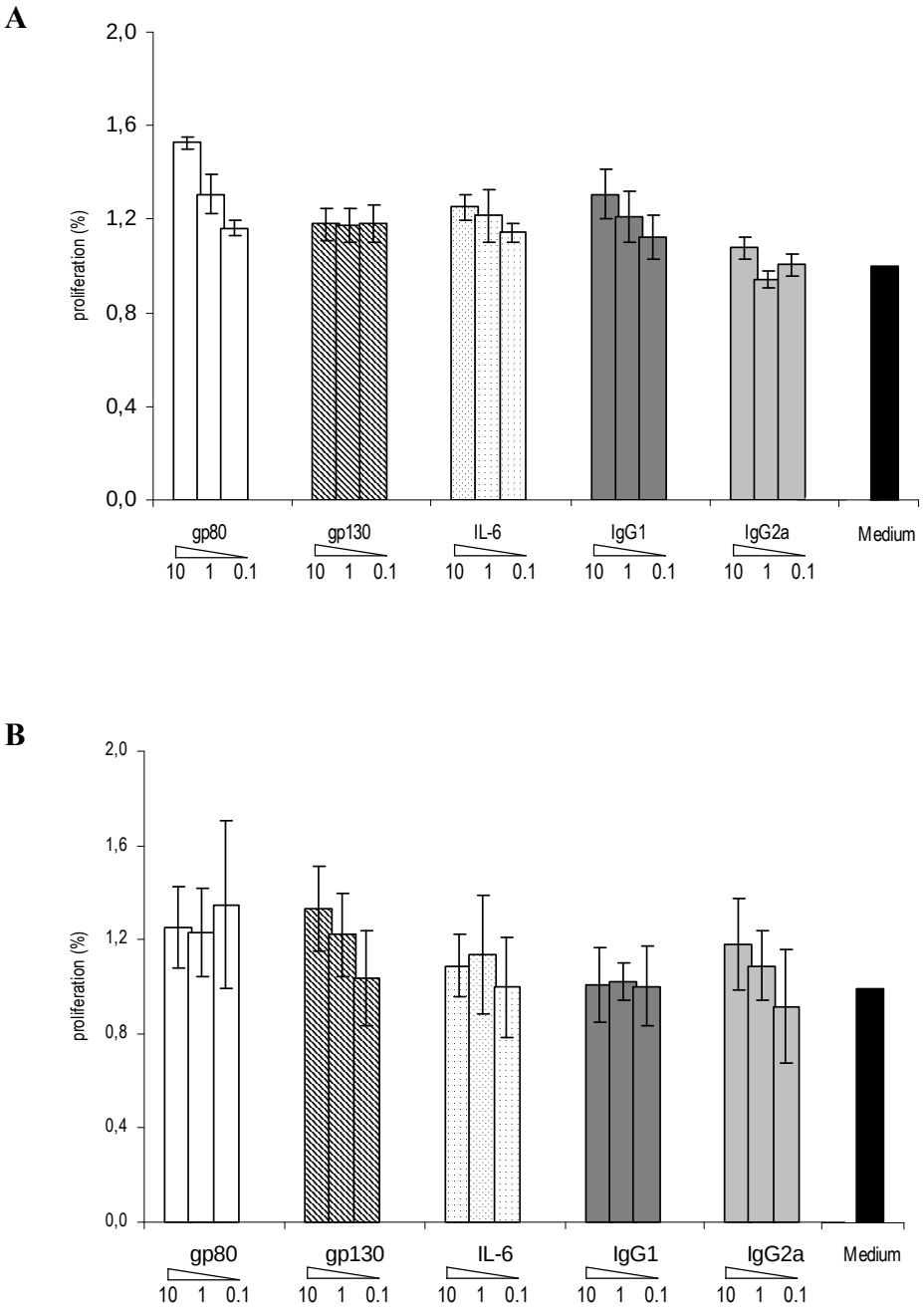

A
2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
0,0
proliferation (%)
gp80
gp130
IL-6
IgG1
IgG2a
Medium
10 1 0.1
B
2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
0,0
proliferation (%)
gp80
gp130
IL-6
IgG1
IgG2a
Medium
10 1 0.1

Figure 4

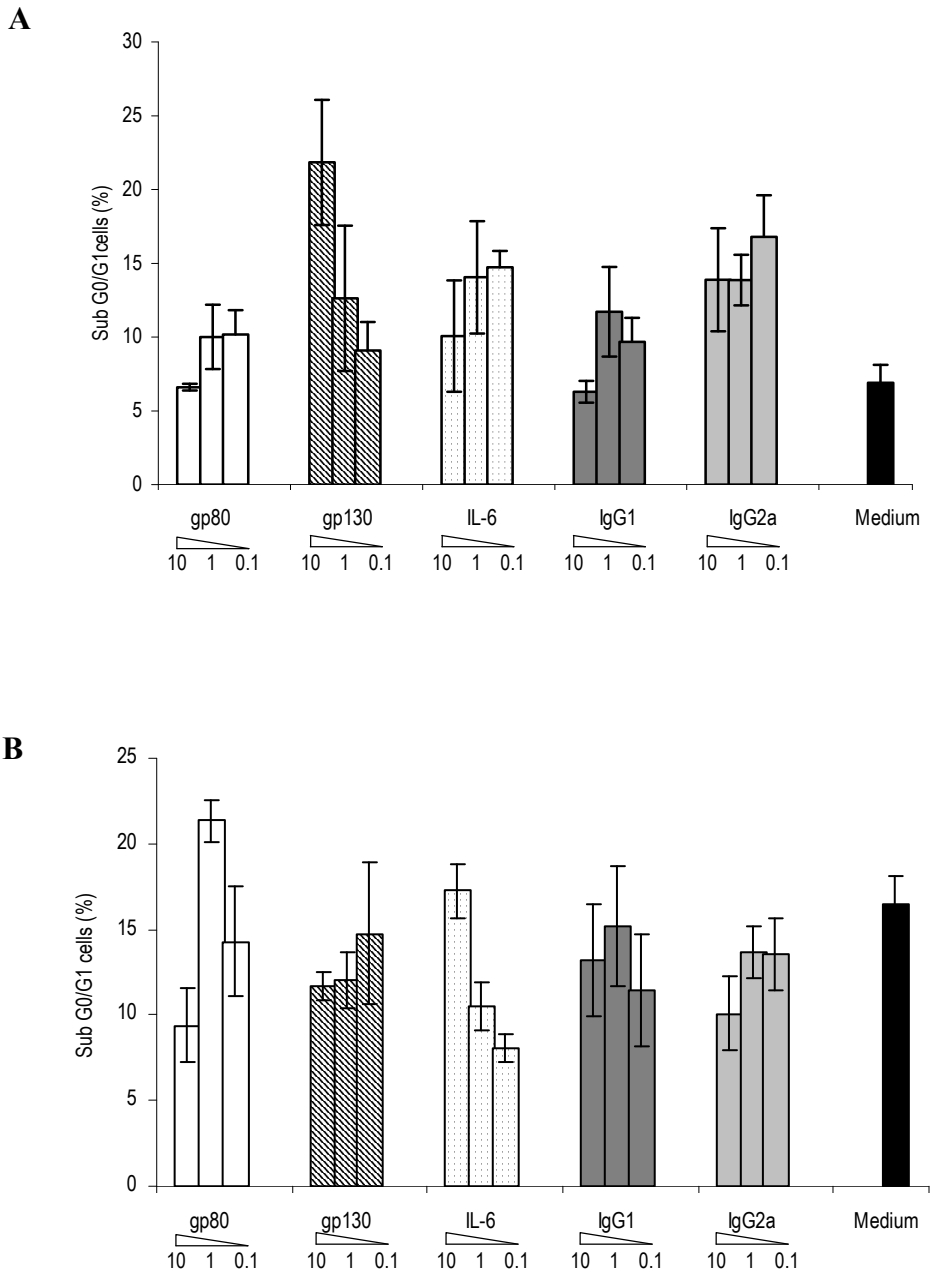
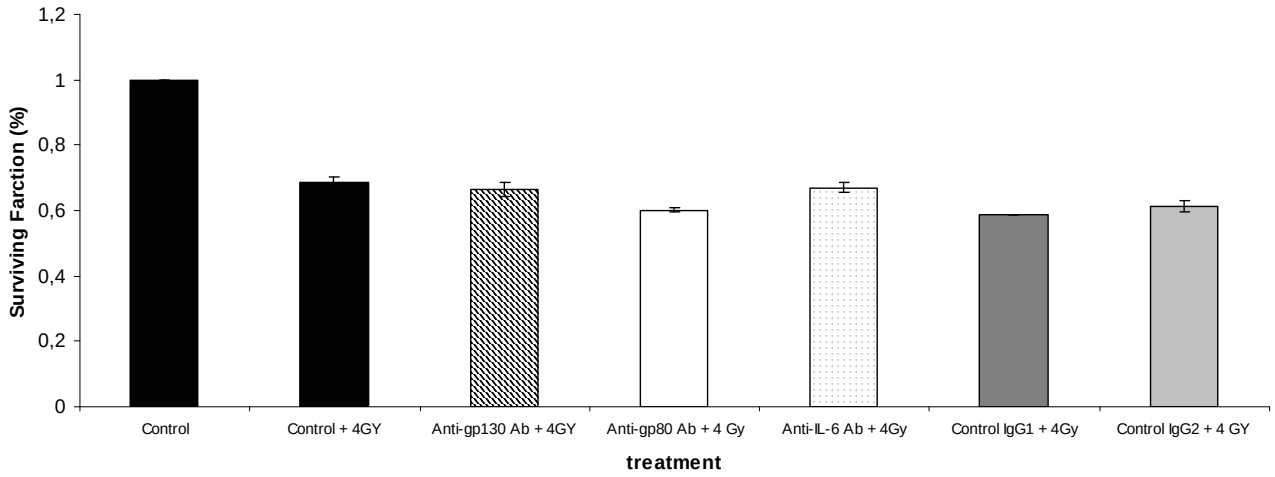
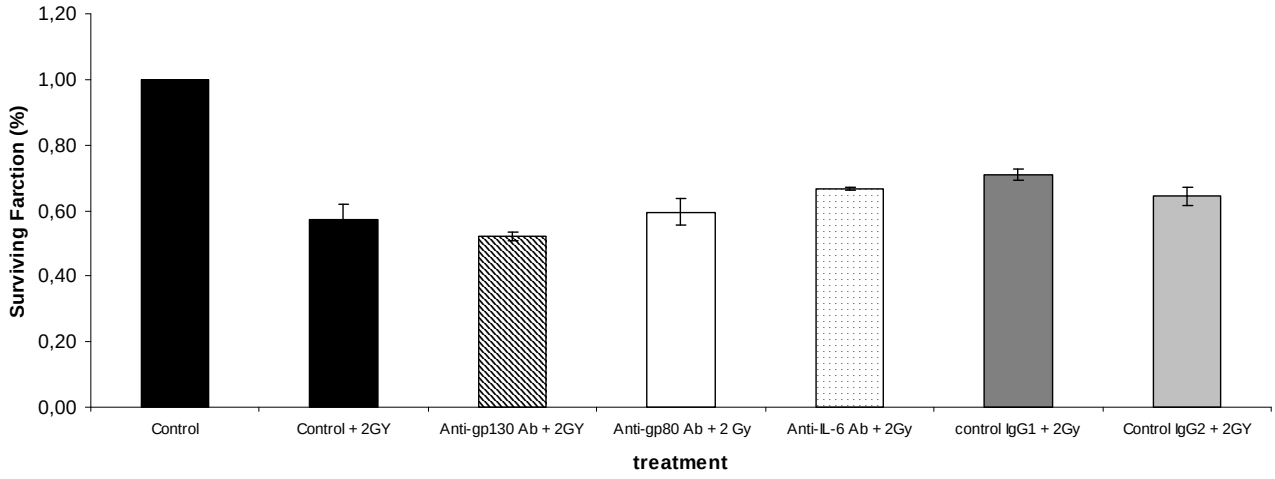

A
Sub G0/G1cells (%)
30
25
20
15
10
5
0
gp80
gp130
IL-6
IgG1
IgG2a
Medium
10 1 0.1
B
Sub G0/G1 cells (%)
25
20
15
10
5
0
gp80
gp130
IL-6
IgG1
IgG2a
Medium
10 1 0.1

Figure 5

A


1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Surviving Farction (%)
Control
Control + 4GY
Anti-gp130 Ab + 4GY
Anti-gp80 Ab + 4 Gy
Anti-IL-6 Ab + 4Gy
Control IgG1 + 4Gy
Control IgG2 + 4 GY
treatment

B


1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Surviving Farction (%)
Control
Control + 2GY
Anti-gp130 Ab + 2GY
Anti-gp80 Ab + 2 Gy
Anti-IL-6 Ab + 2Gy
control IgG1 + 2Gy
Control IgG2 + 2GY
treatment

Résultats et discussion

Nous avons démontré ici que la neutralisation de la voie IL-6 grâce à des anticorps spécifiques, en dépit d'une inactivation de la voie STAT3, n'affecte pas la prolifération, l'apoptose et la radiorésistance des gliomes.

Les résultats présentés ici suggèrent que la tolérance d'une inhibition de la voie STAT3 soit une spécificité des cellules tumorales. Les données de la littérature laissent à penser que l'activation aberrante de la voie STAT3 dans les gliomes serait plus impliquée dans les modifications du micro-environnement telles que l'immunosuppression et l'angiogénèse, que dans la radiorésistance intrinsèque.

- Travaux en cours -

Comparaison des deux populations

Objectif de l'étude

Les travaux décrits dans cette dernière partie ont pour objectif de comparer les deux populations de patients respectivement avec et sans amplification du gène *IL-6* pour essayer d'expliquer la différence de survie entre ces deux groupes (6 versus 22 mois). Ce travail a été réalisé sur 31 prélèvements de la série de glioblastomes utilisée précédemment (Article I).

La comparaison des deux populations a été réalisée à deux niveaux :

(I) le premier est une recherche des altérations génétiques (nombre de copies) et profils d'expression associés à la surexpression de l'*IL-6* et qui pourraient expliquer la différence de survie chez les patients. Nous avons réalisé des puces génomiques et transcriptomiques au sein de la Plateforme de Génomique Fonctionnelle du Département de transfert de l'Institut Curie (Paris).

(II) La deuxième approche est une analyse immunohistochimique de l'état d'activation des voies de signalisation anti-apoptotiques Akt et STAT3.

A - Comparaison des profils transcriptomiques et génomiques

Méthodes

Extraction dosage et purification des extraits d'ADN et ARN

Après vérification du pourcentage de cellules tumorales (minimum 50%), chaque prélèvement tumoral a été fragmenté en deux masses équivalentes en vue de faire une extraction d'ADN et d'ARN totaux. Après digestion du fragment destiné à l'extraction d'ADN avec la Protéinase K (100µg/ml, No 3 115 801, Roche), puis traitement avec la RNase A (No 0 109 169, Roche), l'ADN a été extrait par l'utilisation de phénol tamponné et précipité. Les ADN ont été dosés par un spectrophotomètre Nanodrop puis leur qualité a été vérifiée par migration électrophorétique.

Le broyage du fragment destiné à l'extraction d'ARN a été réalisé avec le TissueLyzer (type MixerMill, N° 85 220, Qiagen) dans 200µl de Qiazol. Le kit miRNeasy Mini (No217 004, Qiagen) a été utilisé afin d'extraire les ARN totaux incluant les micro ARN. Les ARN ont ensuite été dosés avec le spectrophotomètre Nanodrop puis l'évaluation de leur qualité a été réalisée par migration électrophorétique sur puce Agilent (BioAnalyzer 2100). 29 échantillons d'ADN et 30 échantillons d'ARN ont rempli les critères qualités permettant leur utilisation pour la suite du protocole.

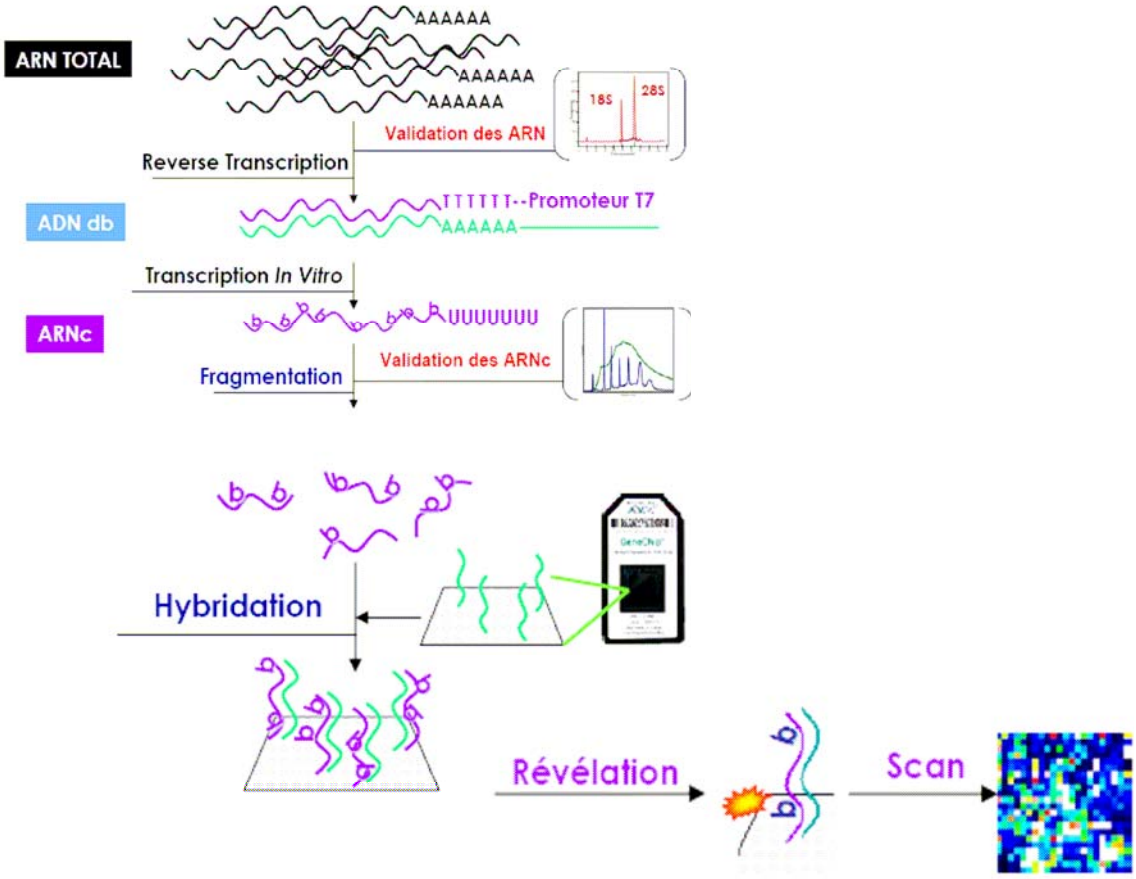


Figure 45. Préparation des ARN totaux pour la réalisation de puces transcriptomiques.
ARNc : ARN codants.

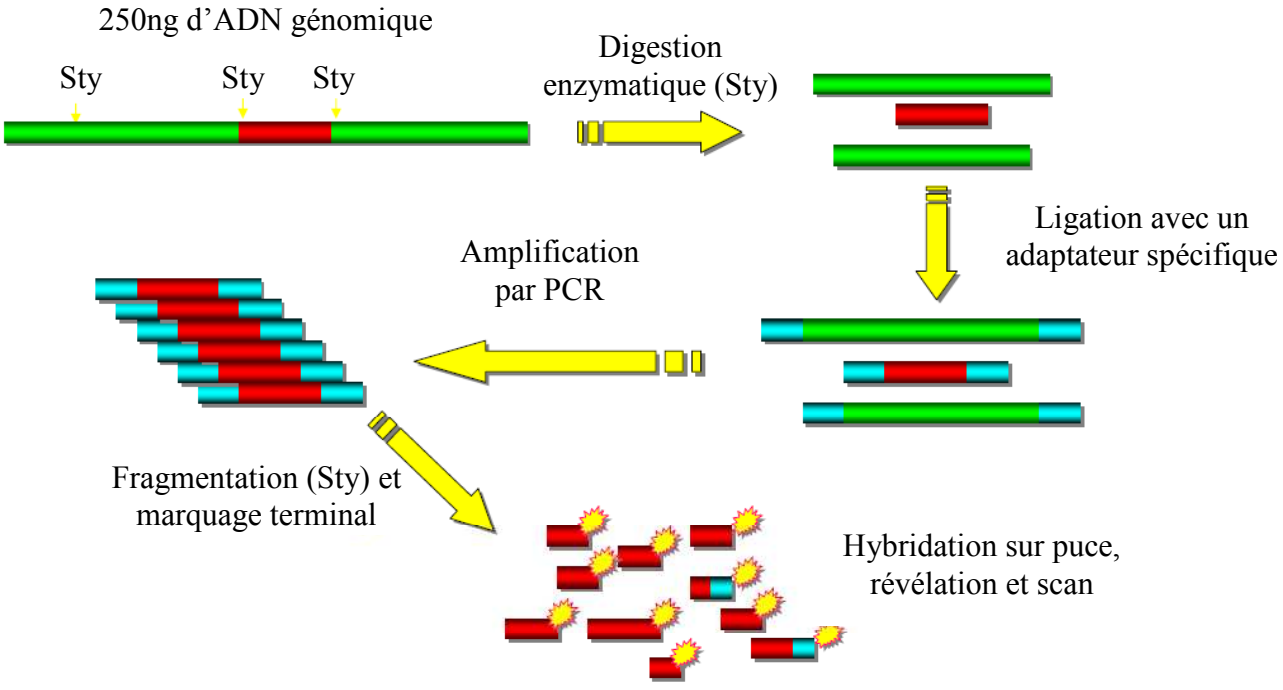


Figure 46. Préparation des ADN pour la réalisation de puces génomiques.

Hybridation des puces

Les ARN totaux et ADN extraits ont ensuite été préparés selon le protocole d'Affymetrix afin de réaliser une hybridation sur les puces transcriptomiques (Dupont *et al.* 2007) (GeneChip® Human genome U133 Plus 2.0) et génomiques (GeneChip® Human Mapping 250K Sty Array) respectivement.

Pour chaque échantillon, 2µg d'ARN totaux ont été retro-transcrits avant synthèse d'ADNc double brin par une ADN polymérase I. Après une étape de purification sur colonne, une synthèse *in vitro* d'ARNc (ARN codants) a été réalisée avec incorporation de biotine (Figure 45). La qualité des ARNc a été validée sur puce Agilent. 3 échantillons ne remplissant pas les critères qualité ont été exclus à cette étape réduisant le nombre d'échantillons à 27. Les ARNc ont ensuite été fragmentés avec le tampon d'Affymetrix (Fragmentation Buffer) puis 10µg issus de cette fragmentation (ARNc de 35 à 200pb) ont été utilisés pour l'hybridation sur la puce. La révélation, basée sur un système biotine-streptavidine, s'est déroulée sur des stations dédiées (Genechip® Fluidics Station 450). La fluorescence obtenue a été mesurée par un scanner à très haute résolution (Genechip® Scanner 3000, résolution : 1.56µm). Les puces U133 Plus 2.0 sont des puces à haute densité permettant l'analyse du niveau d'expression de plus de 47 000 transcrits et variants incluant 38 500 gènes humains caractérisés.

Pour chaque échantillon 250ng d'ADN génomique ont été digérés par une enzyme de restriction (Sty) et ligués à des adaptateurs (Figure 46). Une amorce reconnaissant la séquence des adaptateurs a été utilisée pour amplifier sélectivement les fragments d'une taille comprise entre 250 et 1100pb. Après purification, les produits de cette amplification ont été à leur tour fragmentés avec l'enzyme Sty puis ont subi un marquage terminal (biotine) par une désoxynucléotidyl-transférase terminale. Les fragments marqués ont une taille inférieure à 100pb. Les étapes d'hybridation et de révélation sont similaires à celles décrites pour les puces transcriptomiques. Les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont à la base de plus de 90% des variations entre individus. Ils sont matérialisés par une différence, ou polymorphisme, d'un seul nucléotide entre deux séquences d'ADN. Ainsi les puces SNP 250K, de part leur densité (250 000 SNP), permettent d'obtenir des informations sur les altérations génétiques fines (nombre de copies par allèle, perte d'hétérozygotie, mutation).

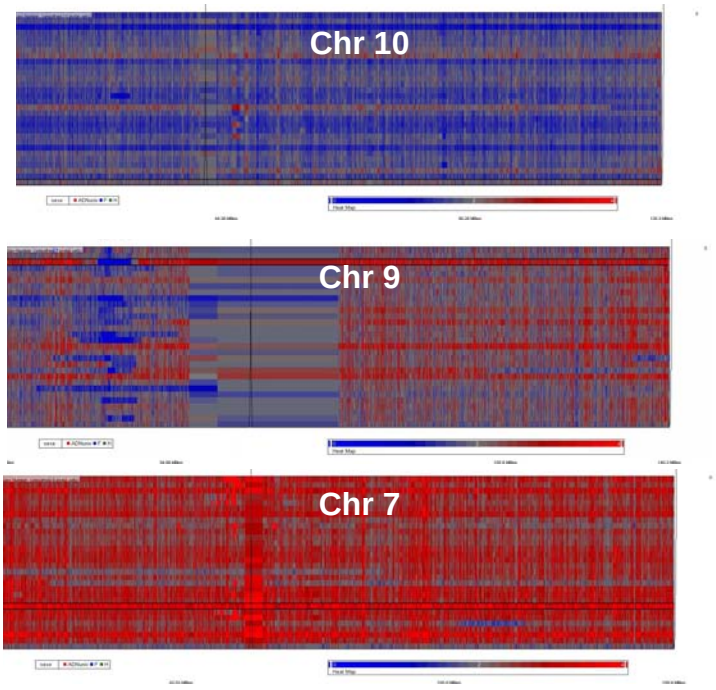


Figure 47. Profils génomiques des patients atteints de glioblastomes
Le niveau d'amplification des chromosomes 7,9 et 10 est représenté ici pour les 29 patients inclus dans l'étude. Une coloration rouge correspond à une amplification alors qu'une coloration bleue équivaut à une délétion.

Analyse bio-informatique des données

La quantification des signaux obtenus a été réalisée avec le logiciel Genechip® Operating Software v1.1 (Affymetrix). Les fichiers générés *.CEL contiennent une image de la puce scannée et les mesures des intensités de chaque probeset. Les données ont ensuite été importées dans le logiciel Partek Genomics Suite (V6.4) pour être analysées.

Etat d'avancement des travaux et perspectives

Nous avons débuté l'analyse des données en collaboration avec la Plateforme de Génomique Fonctionnelle du Département de transfert de l'Institut Curie (Paris) ainsi qu'avec l'Institute of Molecular and Cell Biology (Singapore) et plus particulièrement le Pr Jean-Paul Thiery. Les premiers résultats sont très positifs puisqu'ils font état de la variation significative d'expression d'un groupe de gènes impliqués dans les processus inflammatoires entre les 2 groupes. Ces premières données montrent que l'IL-6 joue un rôle majeur dans le mécanisme d'immunosuppression locale. Sur le plan génomique, nous avons pu observer des altérations chromosomiques fréquemment décrites dans la littérature ; amplification du chromosome 7, perte au niveau des chromosomes 9 et 10 notamment (Figure 47, (Burton *et al.* 2002; Inda *et al.* 2003). La présence de hot spots d'amplification nécessite des investigations plus poussées de même que l'analyse concomitante du nombre de copies avec l'état allélique représenté par la LOH (Loss Of Heterozygosity). Nous incluons actuellement de nouveaux échantillons tumoraux.

B - Analyse des profils d'activation des voies anti-apoptotiques

La deuxième approche utilisée pour expliquer la différence de survie entre les deux groupes de patients a consisté en la comparaison des profils d'activation des voies de signalisation anti-apoptotiques Akt et STAT3 par immunohistochimie.

Méthodes

Les pièces opératoires fixées ont été inclues en paraffine avant d'être coupées et déposées sur des lames silanisées et déparaffinées. Les coupes ont ensuite été soumises à un pré-traitement pour le démasquage des épitopes (30 min, solution CCI, No 950-124, Ventana Medical Systems). Les lames ont été incubées en présence de l'anticorps primaire, avant d'être exposées à un anticorps secondaire couplé à une enzyme. Les anticorps primaires utilisés sont spécifiquement dirigés contre pAkt-Ser 473 (1/50, 2h d'incubation, No 9271, Cell

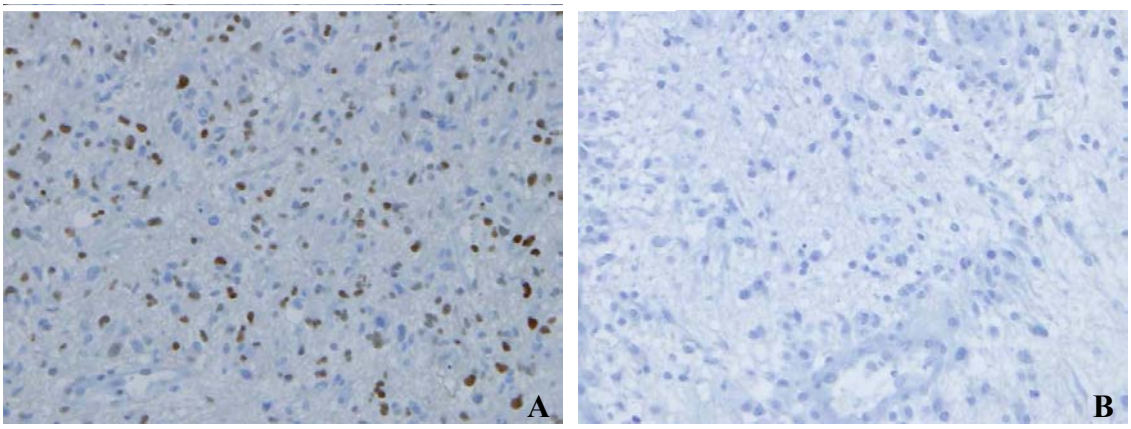


Figure 48. Détection immunohistochimique de pSTAT3 Tyr 705.
A, Exemple d'échantillon avec un signal positif (marquage nucléaire, Gr X 40). B, Exemple d'échantillon avec un signal négatif (Gr X 40).

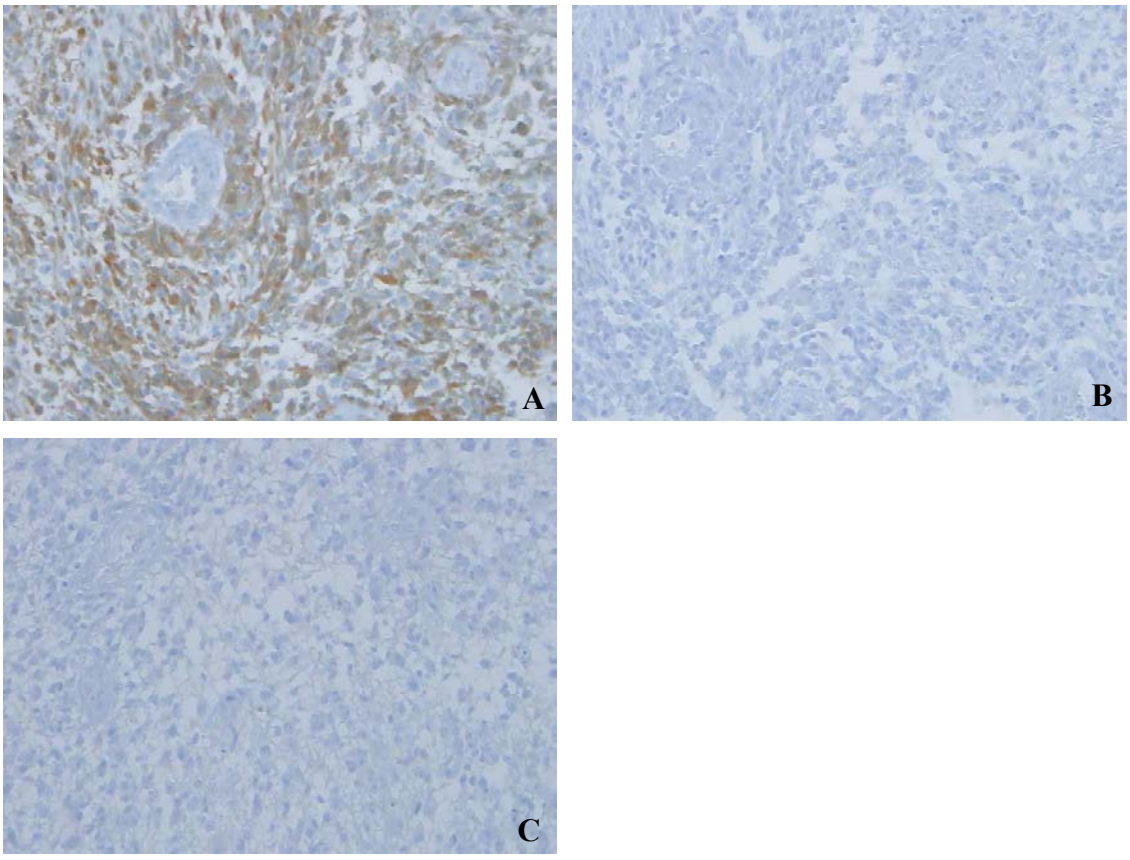


Figure 49. Détection immunohistochimique de pAkt Ser 473.
A, Exemple d'échantillon avec un signal positif (marquage membranaire et cytoplasmique, Gr X 40). B, Echantillon positif identique à A mais avec pré-traitement à la phosphatase (Gr X 40). C, Exemple d'échantillon avec un signal négatif (Gr X 40). Les difficultés rencontrées dans la mise au point des bonnes conditions expérimentales nous ont emmené à vérifier la spécificité du signal. La disparition du signal en B, atteste de la spécificité de la détection obtenue en A.

Signaling) ou bien contre pSTAT3-Tyr705 (1/10, 44min d'incubation, No 9145, Cell Signaling). La détection a été réalisée grâce à un kit (UltraView™ Universal DAB Detection Kit, No 760-500, Ventana) contenant l'anticorps secondaire et le DAB. Ce kit a été utilisé sur un automate Ventana Nexes (Ventana). Brièvement, la réaction chromogène se base sur la conversion d'un chromogène DAB en produit de réaction visible au niveau du site de liaison antigène-anticorps. Après contre coloration avec de l' hématoxyline de Mayer afin d'obtenir une coloration des noyaux, les lames ont été observées sous microscopie optique (Olympus BX60).

Etat d'avancement des travaux et perspectives

Les lames ont déjà été marquées et lues concernant l'activation de la voie STAT3 (Figure 48). Les difficultés rencontrées dans la mise au point de la détection de pAkt ont retardé l'exploitation des résultats. Actuellement toutes les conditions de marquage et de détection ont été mises au point pour pAkt (Figure 49). Nous allons très prochainement réaliser le marquage sur la série des 31 gliomes. L'ensemble des données obtenues sera ensuite confronté aux données cliniques afin de détecter une éventuelle corrélation entre la survie des patients et l'activation d'une ou bien des deux voies anti-apoptotiques.

Conclusion Générale et Perspectives

Les glioblastomes, tumeurs hautement résistantes, sont les tumeurs cérébrales de l'adulte les plus fréquentes et les plus graves. La radiothérapie qui permet d'allonger la survie des patients est le traitement de référence de ces tumeurs. Leur pronostic reste relativement sombre avec une médiane de survie d'environ 12 mois, le plus souvent en raison d'une récidive à l'intérieur même du volume irradié. L'objectif général de l'équipe et de ma thèse est d'identifier des cibles moléculaires potentiellement impliquées dans la radiorésistance des glioblastomes humains puis de les neutraliser dans le but d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie.

L'équipe possédait à mon arrivée de nombreuses données sur le rôle de l'IL-6 dans les GBM. Les travaux antérieurs du laboratoire avaient démontré : (I) une association forte entre l'agressivité de la tumeur et le niveau d'expression des messagers IL-6 (Rolhion ***et al.*** 2001) ; (II) une amplification génique et une augmentation de l'expression de l'IL-6 dans des glioblastomes primaires et des lignées de GBM (Tchirkov ***et al.*** 2001) ; (III) une résistance à l'irradiation de la fraction cellulaire productrice d'IL-6 (Dubost ***et al.*** 2002).

Nous avons au début de ce travail contribué à la mise en évidence d'une association entre une amplification avec surexpression du gène *IL-6* et un mauvais pronostic. La médiane de survie des patients chute de 22 à 6 mois entre le groupe IL-6 non amplifié et amplifié (Article I). Ce résultat valide donc l'IL-6 comme cible thérapeutique dans les glioblastomes. Nous avons recherché à savoir si la neutralisation de la voie de signalisation IL-6 induisait une radiosensibilisation *in vitro*. Bien que nous n'ayons pas établi de corrélation entre la radiorésistance intrinsèque et le niveau d'expression et production d'IL-6 *in vitro,* les données de la littérature nous ont incité à explorer le potentiel thérapeutique d'un blocage des voies PI3K/Akt et JAK/STAT3 situées en aval de l'IL-6. L'inhibition de la voie Akt, dont l'activation a été corrélée à la radiorésistance intrinsèque, permet de radiosensibiliser les glioblastomes *in vitro* alors que celle de la voie STAT3 s'est révélée sans impact sur la sensibilité à l'irradiation.

En accord avec ces résultats, la deuxième approche, consistant en l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'IL-6 ou les sous unités qui composent son récepteur conduit à une inactivation de la voie STAT3 sans impact sur la radiorésistance (Article III). Au vu des données apportées par ce travail il semble que l'IL-6, malgré son statut de facteur de pronostique, et la voie STAT3 ne soient pas impliqués dans la radiorésistance intrinsèque contrairement à la voie Akt. Une question reste cependant en suspens : l'amplification de l'*IL-6* est-elle un phénomène unique ou bien le révélateur d'un phénotype amplificateur plus global qui pourrait être caractéristique d'un sous-groupe de GBM particulièrement agressif ?

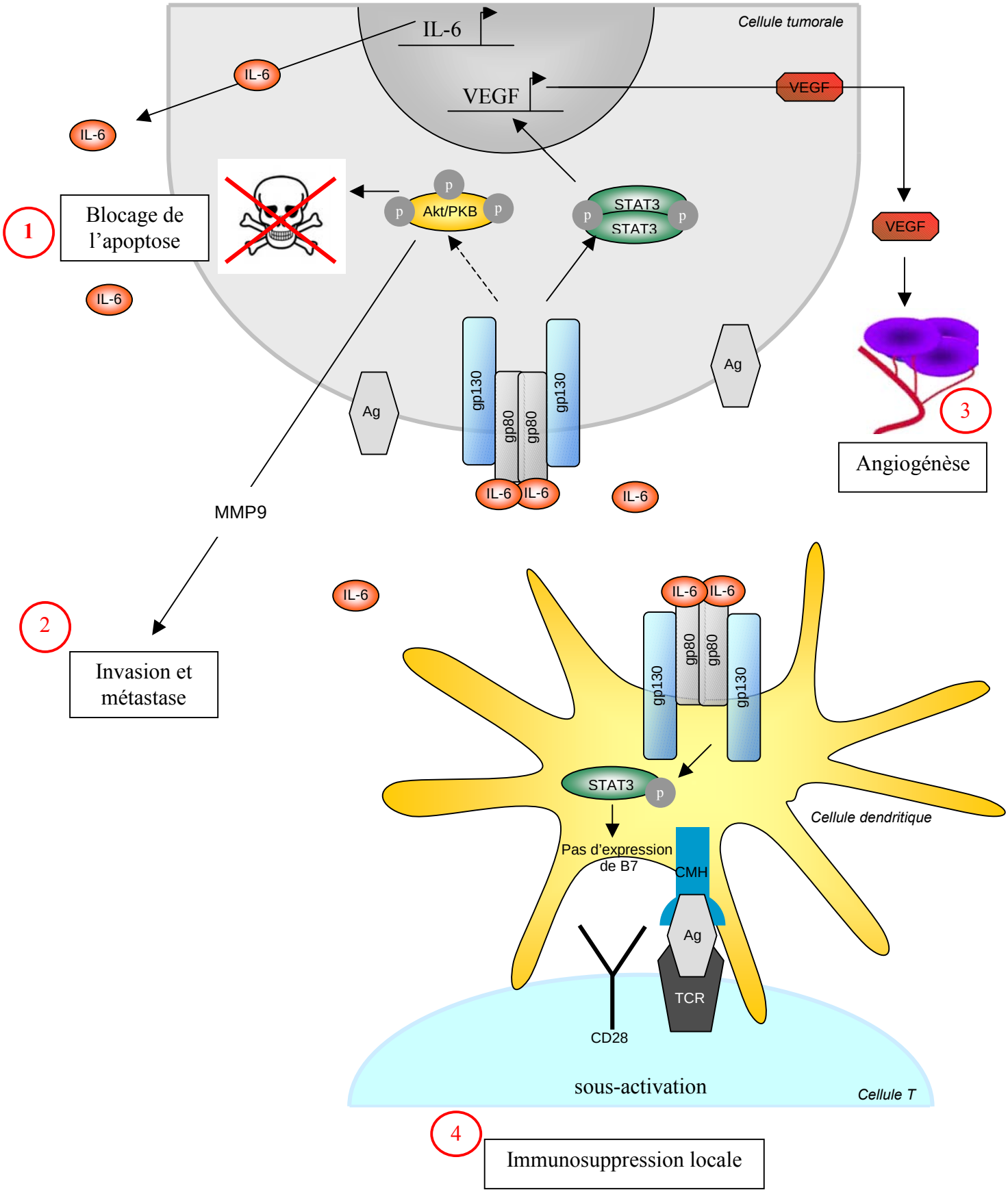


Figure 50. Rôle de la voie IL-6 sur la cellule tumorale et son micro-environnement.

La poursuite des travaux en immunohistochimie sur la comparaison, entre les groupes avec et sans amplification de l'*IL-6,* des profils d'activation des deux voies pourra compléter les données *in vitro*. Les premiers résultats des analyses comparatives de ces deux groupes par micro-arrays sont positifs puisqu'ils font état de la variation significative d'expression d'un groupe de gènes impliqués dans les processus inflammatoires entre les 2 groupes. Nous pouvons supposer que l'IL-6 jouerait donc un rôle important dans les relations entre l'hôte et la tumeur et plus particulièrement au niveau du phénomène d'immunosuppression locale ; celui-ci serait sous le contrôle de la voie STAT3. Des études sont également en cours sur la recherche de spots d'amplification associés à l'amplification de *l'IL-6*.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse associés aux données de la littérature nous ont conduit à proposer un schéma global de l'action de la voie de signalisation l'IL-6 et des deux voies largement étudiées dans ce manuscrit à savoir Akt et STAT3 (Figure 50). L'amplification et la forte expression du gène *IL-6* conduisent à une libération massive d'IL-6 dans le milieu extracellulaire. Après formation du récepteur actif, l'IL-6 conduit à l'activation des voies de signalisation intracellulaires.

Si l'activation de la voie STAT3 est clairement associée à l'action autocrine de l'IL-6 produite par la cellule tumorale (Article III), les choses semblent plus complexes pour la voie Akt. S'il est bien connu que l'IL-6 peut conduire à une activation de cette voie, l'absence d'effet d'une inhibition de l'IL-6 sur le niveau d'activation d'Akt suggère que l'IL-6 n'est pas le principal activateur de la kinase ou bien que d'autres signaux convergents rendent invisible cette inhibition. En effet, l'activation de la voie Akt peut être indépendante des récepteurs tyrosine kinase et notamment être associée à une amplification ou une mutation du gène de la PI3K, à une amplification du gène Akt, à l'activation d'oncogène situé en amont d'Akt tel que RAS ou bien encore à la mutation ou la baisse d'expression de PTEN (Schuurbiers *et al.* 2009).

La voie Akt conduit à la mise en jeu de mécanismes anti-apoptotiques (1) mais elle participe également au pouvoir métastatique et au caractère invasif de la cellule tumorale en augmentant l'expression de la protéine MMP9 (2). L'activation de la voie STAT3 induit une augmentation de la transcription du gène *VEGF* favorisant l'angiogénèse (3). L'IL-6 produite par la cellule tumorale peut aussi agir sur les cellules dendritiques, qui jouent le rôle de cellule présentatrice d'antigène. L'activation de la voie STAT3 induite sur ces cellules diminue l'expression de la protéine B7. L'absence de ce marqueur de surface sur la cellule dendritique a pour effet de diminuer la co-stimulation des cellules T en dessous de leur seuil d'activation, protégeant ainsi la cellule tumorale d'une action cytotoxique de l'hôte (4).

cibles	références
PARP	Chalmers 2004; Dungey *et al.* 2009; Dungey *et al.* 2008; Russo *et al.* 2009
HDAC	Camphausen *et al.* 2005; Chinnaiyan *et al.* 2008; Kim *et al.* 2004; Lopez *et al.* 2007
EGFR	Contessa *et al.* 2006; Lammering *et al.* 2003; Lammering *et al.* 2001; Schmidt-Ullrich *et al.* 2003; Stea *et al.* 2003
Voie PI3K/Akt/mTOR	Chen *et al.* 2008; Jiang *et al.* 2007; Kao *et al.* 2007; Kubota *et al.* 2000; Nakamura *et al.* 2005; Shinohara *et al.* 2005
Voie NFκB	Ding *et al.* 2003; Russell *et al.* 2002; Tsuboi *et al.* 2009
Voie MDM2/p53/p21	Kokunai *et al.* 2001; Wang *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2004
COX2	Bijnsdorp *et al.* 2007; Kuipers *et al.* 2007
DNA-PK	Daido *et al.* 2005
TOP1	Chen *et al.* 2005
GTPase Rho	Ader *et al.* 2003
HIF1	Schwartz *et al.* 2009
Protéines HSP	Aloy *et al.* 2008; Dungey *et al.* 2009
TRAF2	Zheng *et al.* 2008
IGF1-R & PDGFR	Carapancea *et al.* 2007
hTERT	Zhou *et al.* 2007

Tableau 10. Cibles moléculaires dans la radiosensibilisation des gliomes.
TRAF2 : TNFR-associated factor 2; TOP1 : Topoisomérase 1; COX2 : cyclo-oxygénase 2

L'IL-6 agirait donc via les voies Akt et STAT3 à la fois sur la cellule tumorale elle-même : blocage de l'apoptose ; et sur le micro-environnement : angiogénèse, invasion et immunosuppression.

Afin de poursuivre ces travaux, plusieurs outils ont également été développés au cours de cette thèse. Nous disposons ainsi de modèles de xénogreffes de glioblastomes chez la souris *Nude*. Ceux-ci pourront être utilisés dan le but de confirmer l'effet de l'inhibition d'Akt sur la radiorésistance *in vivo.* Nous avons également mis au point un système de contention permettant, sous anesthésie gazeuse, l'irradiation spécifique de la tumeur. Nous avons également initié avec le Dr Xavier Durando (Oncologue Médical au Centre Jean Perrin) un partenariat avec la société Novartis avec qui, un essai thérapeutique de phase I/II combinant irradiation et blocage de la voie PI3K/Akt, est en développement chez les patients porteurs de glioblastome. D'autre part, nous prévoyons d'étudier le mécanisme d'action de l'inhibiteur (BEZ235, Novartis) sur les modèles cellulaires de glioblastome disponibles au laboratoire. La poursuite de l'analyse des données obtenues par micro-arrays représente une source d'identification d'autres cibles potentielles impliquées dans la résistance des glioblastomes à la radiothérapie.

La neutralisation des mécanismes anti-apoptotiques envisagée dans cette étude fait partie des nombreuses cibles thérapeutiques développées à l'heure actuelle afin de sensibiliser les cellules tumorales à l'irradiation. Parmi celles qui sont en plein développement, notre équipe participe à un projet de ciblage des systèmes de réparation. Cet axe de recherche développé en partenariat avec la société DNA Therapeutics et plusieurs équipes de recherche* vise à sensibiliser les gliomes à la radiothérapie en saturant le système de réparation NHEJ grâce à des leurres d'ADN appelés « Dbaits » (Quanz *et al.* 2009). Nous souhaitons à terme combiner cette approche à celle d'une neutralisation de la voie Akt afin d'augmenter l'effet thérapeutique.

D'autres cibles thérapeutiques ont été envisagées en vue de radiosensibiliser les gliomes à la radiothérapie. Le tableau 10 récapitule les cibles moléculaires qui ont été envisagées au cours des dernières années. Il apparaît que les récepteurs membranaires et les voies de signalisation intracellulaires souvent dérégulées sont parmi les cibles les mieux caractérisées. La redondance des voies de survie à l'origine de la résistance à la radiothérapie suggère fortement que la combinaison de plusieurs approches de radiosensibilisation conduise à une potentialisation encore plus importante du traitement.

* DNA Therapeutics (Jian-Sheng Sun), Institut Curie (Marie Dutreix), Clinique Vétérinaire de Maison Alfort (Patrick Devauchelle), Institut Albert Bonniot (Jean-Luc Coll), Institut des Neurosciences de Grenoble (Chantal Remy).

Autres Publications

L'équipe au sein de laquelle j'ai effectué ma thèse développe, en plus de la thématique de la radiorésistance des glioblastomes, d'autres aspects de recherche avec notamment un projet d'étude des mécanismes de résistance mis en jeu dans la leucémie lymphoïde chronique. Dans ce cadre, j'ai participé à deux autres études portant :

(I) sur la validation clinique de Mcl-1 L comme cible thérapeutique potentielle dans la leucémie lymphoïde chronique (article IV) ;

(II) sur l'étude de gènes d'intérêts co-exprimés avec Mcl-1L dans la leucémie lymphoïde chronique (Article V).

Article IV

Low MCL-1 mRNA expression correlates with prolonged survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia

Véronèse L, Tournilhac O, Verrelle P, Davi F, Dighiero G, Chautard E, Veyrat-Masson R, Kwiatkowski F, Goumy C, Vago P, Travade P, Tchirkov A.

*Leukemia. 2008 Jun;**22(6):1291-3.***

Low *MCL-1* mRNA expression correlates with prolonged survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia

Leukemia (2008) **22,** 1291–1293; doi:10.1038/sj.leu.2405052; published online 29 November 2007

B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is a heterogeneous malignant disease that involves deregulated apoptosis. Overexpression of anti-apoptotic proteins of the *BCL-2* (B-cell lymphoma gene-2) family such as BCL-2 and MCL-1 (myeloid cell leukemia-1) is commonly detected in B-CLL. Higher levels of MCL-1 have been correlated with a poor treatment response.[1] *MCL-1* gene silencing by RNA interference was reported to induce apoptosis in B-CLL cells, suggesting that the *MCL-1* gene might be a therapeutic target.[2] Still, the impact of different *MCL-1* gene expression levels on the prognosis of B-CLL patients remains unknown.

To address this issue, we quantified the expression of *MCL-1* gene in 119 B-CLL patients and correlated the results with patient survival and known prognostic markers.

This study was retrospective. Seventy-nine men and 40 women (median age of 62 years) were diagnosed with B-CLL between January 1980 and March 2006 at the Clermont-Ferrand Hospital, Pasteur Institute and Pitié-Salpêtrière Hospital (France). Peripheral blood samples were obtained after informed consent. Mononuclear cells were isolated and cryopreserved. At the time of sampling, 69 patients were in Binet stage A, 31 in Binet stage B and 19 in Binet stage C. The median interval from diagnosis to sampling was 2 months. Treatment decisions and modalities in all centers were based on the French Cooperative Group guidelines. Stage A patients remained untreated until disease progression. Of note, all samples from stage A patients were obtained before any therapy. Stage B/C patients received early treatment, mainly chlorambucil or fludarabine as a first-line therapy. Median follow-up for the whole population was 9 years.

The amount of the full-length *MCL-1* transcript encoding the anti-apoptotic isoform of MCL-1 protein (MCL-1L) was assessed using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR (RQ-PCR) and normalized for β-glucuronidase (*GUS*) gene expression, using previously reported primers.[3,4] The median percentage of tumor lymphocytes in patient samples was 74% (37–99%, range) as assessed with immunophenotype analysis ($n=69$). Residual normal cells did not significantly affect the determination of *MCL-1* mRNA, since there was no difference in *MCL-1* levels between the samples with >74% tumor purity and those with <74% purity (Kruskall–Wallis test, $P=0.41$, NS). In 18 samples, we quantified MCL-1 protein expression using flow cytometry and found that the mRNA and protein levels were significantly correlated (Figure 1), suggesting that the amount of *MCL-1* mRNA was predictive of the MCL-1 protein expression.

The *MCL-1*/*GUS* ratio was highly variable within a range of 10–776, with a median value of 85. We scored the relative level of *MCL-1* mRNA as low (first tertile, <55), intermediate (second tertile, 55–133) and high (third tertile, >133) and compared the survival in these groups. The survival times were not different in patients with intermediate and high *MCL-1* expression (log-rank test, $P=0.78$). However, patients expressing *MCL-1* at intermediate/high levels (⩾55) have significantly shorter survival than patients expressing *MCL-1* at low levels (<55). This relationship was significant within the whole patient population ($P=0.00092$; Figure 2a) and among stage A patients ($P=0.002$; Figure 2b). Moreover, the time to first therapy was significantly shorter in previously untreated stage A patients with intermediate/high levels of *MCL-1* mRNA compared with those with low levels of *MCL-1* mRNA ($P=0.00088$; Figure 2c).

In a multivariate Cox analysis with the major prognostic indicators of B-CLL,[5] Binet stage ($P=0.013$) and immunoglobulin V gene (IgV) mutational status ($P=0.0014$), *MCL-1* mRNA expression was an independent, significant predictor of overall survival ($P=0.0093$). The hazard ratio for higher *MCL-1* expression (⩾55) was 7.0 (95% confidence interval 1.6–30.6).

In addition, *MCL-1* mRNA levels did not correlate with clinical stage and known biological prognostic markers of B-CLL[5] such as IgV mutational status ($n=87$), CD38 expression ($n=69$), serum thymidine kinase ($n=62$) and β2-microglobulin ($n=63$) levels, lymphocyte doubling time ($n=64$) and human

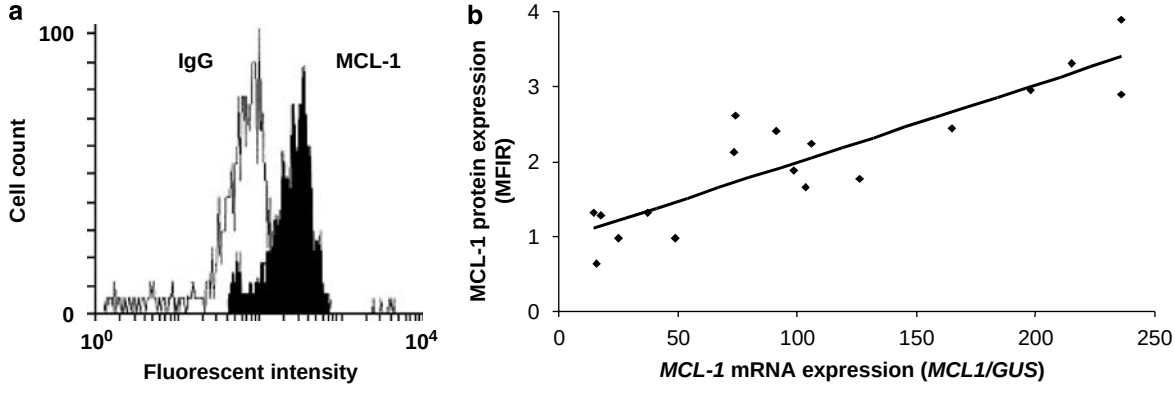


Figure 1 (**a**) The lymphocyte population from B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) samples was examined for the myeloid cell leukemia-1 (MCL-1) protein expression by intracellular staining and flow cytometry. Cells were incubated with the MCL-1L antibody and control IgG antibody, and MCL-1 and IgG were quantified by the mean fluorescence intensity (MFI). The MCL-1 value was normalized by dividing the MCL-1 value by the control IgG value, obtaining the MFI ratio (MFIR) for each sample. The graph demonstrates the MCL-1 and control IgG staining patterns in a B-CLL sample (MFIR of 3.9). (**b**) Correlation between *MCL-1* mRNA and MCL-1 protein expression levels in primary B-CLL cells. The *MCL-1* mRNA level was measured using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR and expressed as an *MCL-1*/*GUS* ratio multiplied by 100.

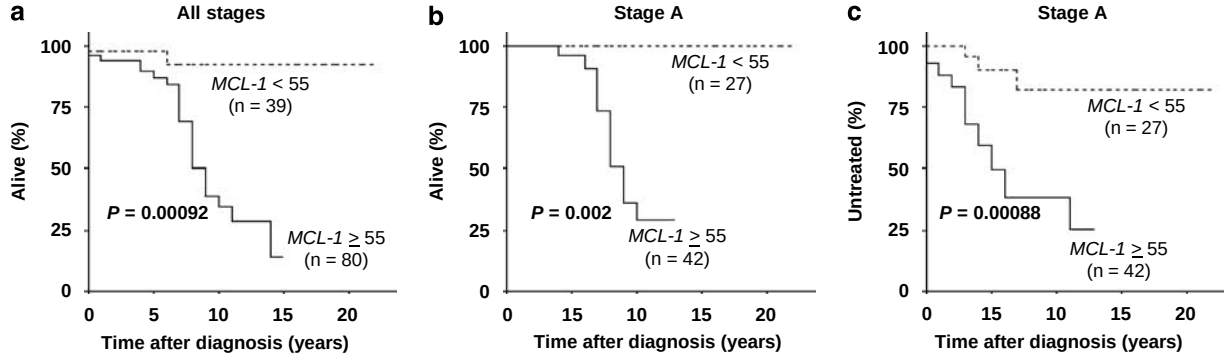


Figure 2 Overall survival in the whole B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) patient population (**a**), in stage A patients (**b**) and treatment-free survival in stage A patients (**c**) as a function of myeloid cell leukemia-1 (*MCL-1*) mRNA expression. Patients expressing *MCL-1* at low levels (<55) have significantly longer overall and treatment-free survival when compared with those expressing *MCL-1* at intermediate/high levels ($\geqslant 55$).

telomerase reverse-transcriptase mRNA expression ($n=113$) (data not shown).

We also determined the levels of *BCL-2* gene expression using RQ-PCR[6] in the whole B-CLL cohort. The *BCL-2*/*GUS* ratio varied between 15 and 1780 with a median of 385. The level of *BCL-2* expression was on average fivefold higher than the level of *MCL-1* mRNA (Kruskall–Wallis test, $P<10^{-7}$). The expression of *BCL-2* was less variable (82%, coefficient of variation) than the expression of *MCL-1* (105%, coefficient of variation). Of note, the levels of *BCL-2* and *MCL-1* transcripts were significantly correlated (Spearman's rank test, $r=0.42$, $P=0.000016$). To assess the relative prognostic importance of *BCL-2* and *MCL-1* transcript levels, we included these two parameters in a Cox model for overall survival. *MCL-1* ($P=0.0092$) but not *BCL-2* gene expression ($P=0.52$) had a significant impact on prognosis. In a previous study, *BCL-2* mRNA was found to be overexpressed in most of the B-CLL samples and alone was not predictive of patient outcome.[7]

The current study shows that the level of *MCL-1* mRNA expression may be an independent prognostic marker in B-CLL, which is not correlated to traditional indicators of prognosis such as IgV gene mutation profile. In particular, a low *MCL-1* gene expression identifies stage A patients with indolent and stable disease and a longer time interval between diagnosis and need of therapy. Lower levels of MCL-1 protein expression have been previously correlated with the ability of patients with B-CLL to achieve a complete remission after treatment.[1] Of note, our data suggest that the *MCL-1* mRNA and protein levels in B-CLL are correlated. Taken together, these observations show that low *MCL-1* expression levels characterize B-CLL patients with a low risk of disease progression who also are likely to respond to treatment, which may be useful for the therapeutic management of cases with early B-CLL.

In the future prospective studies, it would be important to validate these results and explore if the *MCL-1* transcript level is predictive of a treatment response. It would also be essential to investigate in individual patients whether the *MCL-1* expression level remains stable during the course of the disease or increases during progression or development of drug resistance.

The prognostic role of *MCL-1* gene expression further implicates this pro-survival molecule in the pathogenesis of B-CLL. Given that most B-CLL cells contain high levels of BCL-2, it was suggested that the combination of MCL-1 and BCL-2 might provide a superior protection against apoptosis.[8] Of note, BCL-2 and MCL-1 can inhibit apoptosis by sequestering pro-death proteins. Del Gaizo Moore *et al*.[8] have recently observed that in B-CLL cells almost all pro-apoptotic BIM appeared to be present in complex with BCL-2. They suggested that in B-CLL cells with abundant BCL-2, this protein is so highly occupied by BIM molecules that the cells have very poor anti-apoptotic reserve, which may potentially explain the notable chemosensitivity of B-CLL. Upregulation of the *MCL-1* gene might provide additional survival capacities to B-CLL cells during physiological stress or drug treatment.

Specific downregulation of *MCL-1* gene expression by short interfering RNA has been recently shown to reduce the MCL-1 protein level and promote apoptosis and death of primary B-CLL cells.[2] In this regard, our finding that low *MCL-1* gene expression is related to a good prognosis may be relevant, supporting *MCL-1* as a potential therapeutic target. However, it should be noted that the downregulation of *MCL-1* influences only some of the death pathways and eliminates only a proportion of B-CLL cells. Targeting *MCL-1* expression in B-CLL could be effective in combination with other antitumor agents such as rituximab.[2]

L Véronèse[1,2], O Tournilhac[3], P Verrelle[2,4], F Davi[5], G Dighiero[6], E Chautard[2], R Veyrat-Masson[7], F Kwiatkowski[8], C Goumy[1], P Vago[1], P Travade[3] and A Tchirkov[1,2,4]

[1]*Université Clermont 1, UFR Médecine, CHU Clermont-Ferrand, Service de Cytogénétique Médicale, Clermont-Ferrand, France;*
[2]*EA 3846, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France;*
[3]*Service d'Hématologie Clinique, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France;*
[4]*Departement de Radiothérapie, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France;*
[5]*Service d'Hématologie Biologique & Université Pierre et Marie Curie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France;*
[6]*Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay;*
[7]*Service d'Hématologie Biologique, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France and*
[8]*Service Statistiques et Communications Médicales, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France*
E-mail: andrei.tchirkov@cjp.fr

References

1 Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S *et al*. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with *in vitro* and *in vivo* chemoresponses. *Blood* 1998; **91**: 3379–3389.

2 Hussain SR, Cheney CM, Johnson AJ, Lin TS, Grever MR, Caligiuri MA *et al*. Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 2144–2150.
3 Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Guicciardi ME, Frank DA *et al*. Interleukin-6 upregulates myeloid cell leukaemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinome cells. *Hepatology* 2005; **42**: 1329–1338.
4 Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E *et al*. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)—a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003; **17**: 2474–2486.
5 Montserrat E. New prognostic markers in CLL. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2006, 279–284.
6 Kienle DL, Korz C, Hosch B, Benner A, Mertens D, Habermann A *et al*. Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 3780–3792.
7 Aguilar-Santelises M, Rottenberg ME, Lewin N, Mellstedt H, Jondal M. Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to *in vitro* survival and clinical progression. *Int J Cancer* 1996; **69**: 114–119.
8 Del Gaizo Moore V, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, Letai A. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest* 2007; **117**: 112–121.

Article V

Strong correlation between VEGF and MCL-1 mRNA expression levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia

Véronèse L, Tournilhac O, Verrelle P, Davi F, Dighiero G, Chautard E, Veyrat-Masson R, Kwiatkowski F, Goumy C, Gouas L, Bay JO, Vago P, Tchirkov A.

Leukemia Research, accepté pour publication *2009*.

Leukemia Research xxx (2009) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Leukemia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/leukres

Strong correlation between *VEGF* and *MCL-1* mRNA expression levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia

Lauren Véronèse[a,b,c,d], Olivier Tournilhac[c,d], Pierre Verrelle[c,e], Frédéric Davi[f], Guillaume Dighiero[g], Emmanuel Chautard[c], Richard Veyrat-Masson[c,h], Fabrice Kwiatkowski[i], Carole Goumy[a,b], Laetitia Gouas[a,b], Jacques-Olivier Bay[c,d], Philippe Vago[a,b], Andrei Tchirkov[a,b,c,e,*]

[a] *Univ Clermont 1, Fac Médecine, Histologie Embryologie Cytogénétique, Clermont-Ferrand F-63001, France*
[b] *CHU Clermont-Ferrand, Cytogénétique Médicale, Clermont-Ferrand F-63003, France*
[c] *Univ Clermont 1, Fac Médecine, EA 3846, Clermont-Ferrand F-63011, France*
[d] *Service d'Hématologie Clinique Adulte, CHU, Clermont-Ferrand F-63003, France*
[e] *Département de Radiothérapie, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand F-63011, France*
[f] *Service d'Hématologie Biologique & Université Pierre et Marie Curie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris F-75013, France*
[g] *Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo 11400, Uruguay*
[h] *Service d'Hématologie Biologique, CHU, Clermont-Ferrand F-63003, France*
[i] *Service Statistiques et Communications Médicales, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand F-63011, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 January 2009
Received in revised form 30 April 2009
Accepted 4 May 2009
Available online xxx

Keywords:
B-CLL
Gene expression
VEGF
IL-6
MCL-1
Prognosis

ABSTRACT

Expression of the anti-apoptotic myeloid cell leukemia-1 (*MCL-1*) gene is a novel prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). Vascular and endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-6 (IL-6) are able to upregulate *MCL-1* via autocrine signaling loops. In 88 B-CLL patients, we found a strong correlation of *MCL-1* gene expression with *VEGF* ($P < 10^{-7}$) but not with *IL-6* mRNA levels. *VEGF* but not *IL-6* expression influenced patient prognosis. *VEGF* may be a positive autocrine *in vivo* regulator of *MCL-1* in B-CLL. Inhibition of VEGF and its signaling may prove to be useful in the treatment of B-CLL patients.
© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Recent clinical studies have demonstrated an important prognostic role for expression of the anti-apoptotic myeloid cell leukemia-1 (*MCL-1*) gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) [1,2]. B-CLL patients expressing high levels of *MCL-1* mRNA and protein have shorter overall survival than patients with low expression levels [1,2]. In addition, specific down-regulation of *MCL-1* gene expression was found to promote apoptosis and death of primary B-CLL cells, suggesting the possibility of anti-MCL-1 therapy [3]. In this context, it seems to be essential to investigate molecular mechanisms responsible for the overexpression of *MCL-1* gene in B-CLL.

Vascular and endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-6 (IL-6) are multifunctional cytokines known to stimulate *MCL-1* gene expression in lymphoproliferative disorders and solid tumors [4–8]. The results of *in vitro* experiments suggested that these cytokines may upregulate *MCL-1* via autocrine signaling loops [5–9], which was demonstrated in particular for VEGF in cultured malignant B-cells [5,6,9]. So far, a possible activation of such mechanisms in B-CLL has not been investigated *in vivo*. Correlated expression of *MCL-1* and *VEGF* and/or *MCL-1* and IL-6 genes at the mRNA level in cells from patients with B-CLL would provide evidence supporting the autocrine cytokine-dependent mechanism regulating the *MCL-1* gene. The expression of these cytokine genes may also play a role in B-CLL prognosis. To address these issues, we quantified the levels of *VEGF* and *IL-6* mRNA and tested correlations between the expres-

* Corresponding author at: Service de Cytogénétique Médicale, CHU, UFR Médecine, Place Henri Dunant - BP 38, 63001 Clermont-Ferrand Cedex 1, France. Tel.: +33 4 73 17 81 10; fax: +33 4 73 26 91 82.
E-mail addresses: andrei.tchirkov@cjp.fr, atchirkov@chu-clermontferrand.fr (A. Tchirkov).

0145-2126/$ – see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.leukres.2009.05.003

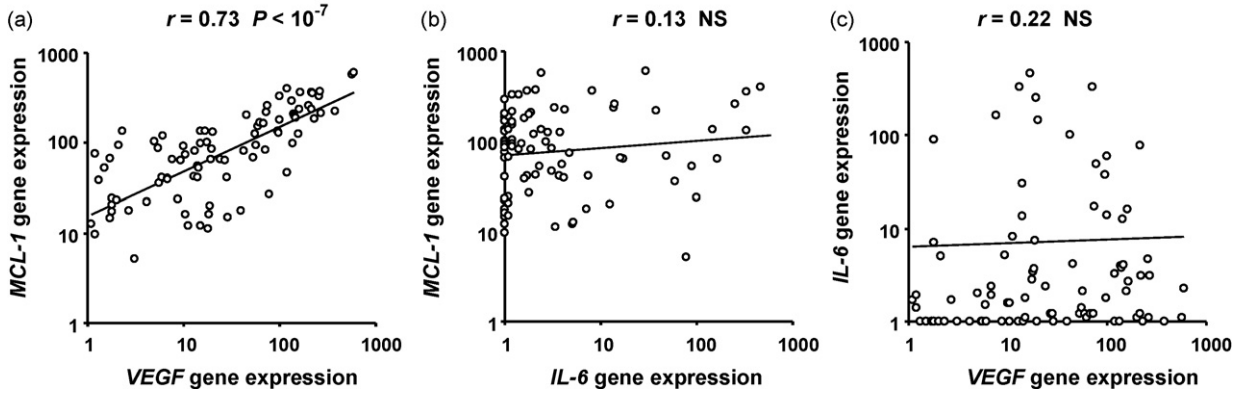


Fig. 1. The amount of *MCL-1* gene transcripts in B-CLL cells was strongly correlated with the level of *VEGF* gene expression (a), whereas no correlation was found between *IL-6* and *MCL-1* expression (b). The levels of *VEGF* and *IL-6* mRNA were not correlated (c).

sion of these genes and level of the anti-apoptotic *MCL-1* transcript in 88 B-CLL patients. We also assessed the clinical impact of *VEGF* and *IL-6* gene expression levels in this patient cohort.

2. Materials and methods

2.1. Patients and samples

This retrospective study included 88 patients (59 men and 29 women, mean age of 60 years) who were diagnosed with B-CLL between January 1980 and March 2006 at the Clermont-Ferrand Hospital, Pasteur Institute and Pitié-Salpêtrière Hospital (France). Peripheral blood samples were obtained after informed consent. Mononuclear cells (MNC) were isolated from the whole blood by means of a standard ficoll procedure and cryopreserved until RNA extraction. The mean percentage of tumor lymphocytes in the MNC samples was 77 ± 15% (SD). At the time of sampling, 49 patients were in Binet stage A, 25 in stage B and 14 in stage C. In 67 out of 88 cases (76%) the samples were obtained at diagnosis. Treatment decisions and modalities in all centers were based on the French Cooperative Group guidelines. Median follow-up was 9.5 years.

2.2. Real-time quantitative reverse transcriptase-PCR (RQ-PCR)

The amounts of *VEGF* and *IL-6* transcripts were assessed using RQ-PCR and normalized for beta-glucuronidase (*GUS*) gene expression, using previously reported primers [10–12]. The full-length *MCL-1* transcript encoding the anti-apoptotic isoform of MCL-1 protein (MCL-1L) was quantified as described elsewhere [1]. The results were expressed as the ratio between transcript numbers of the target and control gene multiplied by 100. All PCR experiments were performed in triplicate. In addition, all the samples included in the study had *GUS* values within the reference range observed in routine conditions on fresh samples [10].

2.3. Analysis of immunoglobulin V gene (IgV) mutational status and immunophenotyping

Patient cDNA samples ($n = 80$) were amplified using primers for the V_H gene, cloned and sequenced as previously reported [13]. Homology of ≥98% to the germ line sequence was used to define the absence of IgV mutations. Immunophenotypic analysis ($n = 69$) was performed on fresh blood samples or cryopreserved cells to measure the percentage of $CD38^+$ cells in the $CD19^+/CD5^+$ fraction using the same approach in the three centers participating in the study [14]. Samples with ≥30% of $CD38^+$ cells were considered as CD38 positive.

2.4. Statistical analysis

The Kruskal–Wallis test, Spearman's rank correlation test (in samples from a non-normally distributed population) and linear regression analysis were used to study the relationship between characteristics. Overall patient survival was calculated using the Kaplan–Meier method and survival curves were compared using the log-rank test. Univariate and multivariate analyses were performed using the Cox regression model.

3. Results

In MNC samples from 88 B-CLL patients, *VEGF* and *MCL-1* expression levels assessed with RQ-PCR were positively and very significantly correlated (linear regression analysis, $r = 0.73$, $P < 10^{-7}$; Fig. 1a). No significant relationship was found between *IL-6* and *MCL-1* or between *VEGF* and *IL-6* expression in this patient cohort (Spearman's rank correlation, NS, Fig. 1b and c). Correlated expression of *VEGF* and *MCL-1* mRNA in malignant B-CLL lymphocytes may implicate *VEGF* as an autocrine regulator of *MCL-1*.

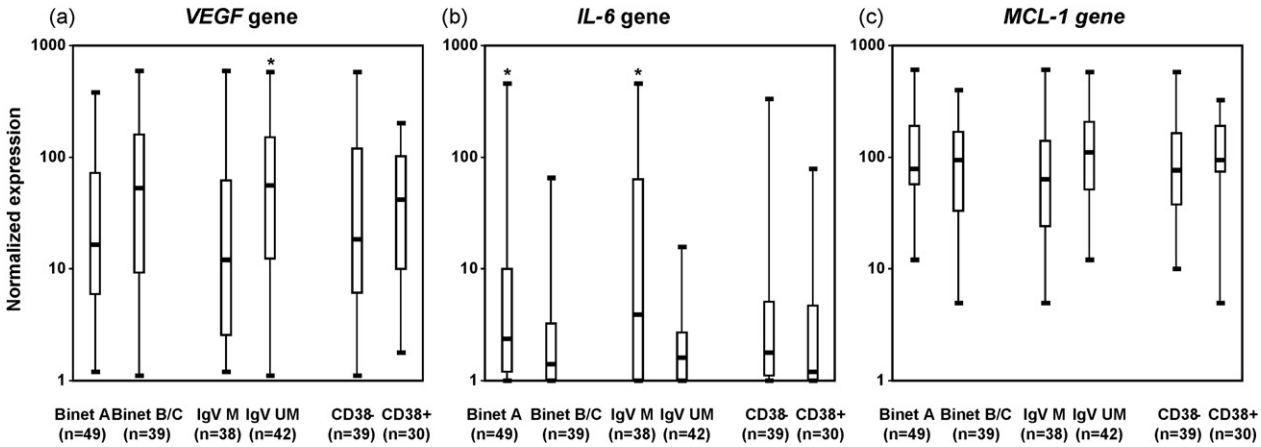


Fig. 2. Box plots (minimum, lower quartile, median, upper quartile and maximum) showing the levels of *VEGF* (a), *IL-6* (b) and *MCL-1* (c) mRNA in B-CLL patients divided in two subgroups according to Binet stages (A *vs* B/C), IgV mutation profile (mutated, M *vs* unmutated, UM) and CD38 expression ($CD38^-$ *vs* $CD38^+$). Statistically significant differences are indicated by asterisks.

Please cite this article in press as: Véronèse L, et al. Strong correlation between *VEGF* and *MCL-1* mRNA expression levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leuk Res (2009), doi:10.1016/j.leukres.2009.05.003

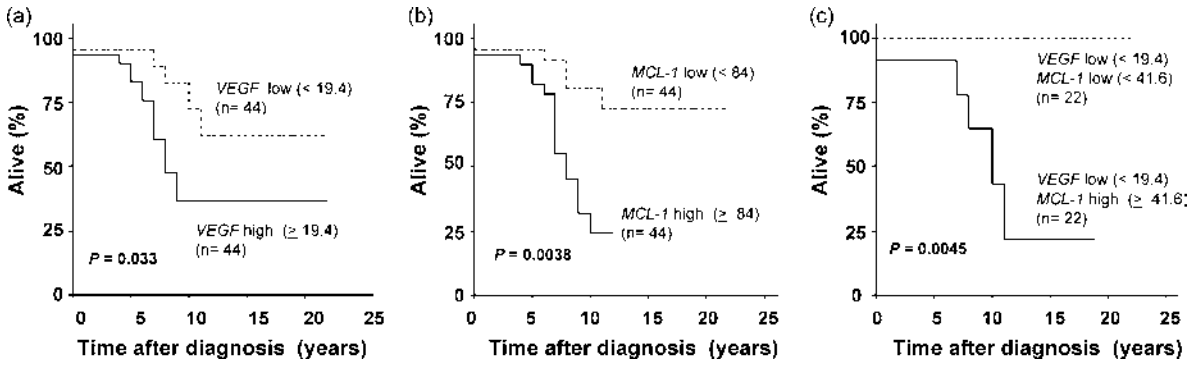


Fig. 3. Kaplan-Meier curves showing survival for B-CLL patients with low and high *VEGF* (a) and *MCL-1* (b) gene expression levels. Kaplan-Meier curves assessing the impact of *MCL-1* expression level on survival of patients with a low *VEGF* gene expression (c). High *MCL-1* transcript levels (above median *MCL-1* value in this patient population) were significantly associated with shorter survival.

To evaluate the clinical impact of *VEGF* and *IL-6* gene expression, we first compared their levels with well-established prognostic markers of B-CLL such as Binet stage, IgV mutation status and CD38 expression (Fig. 2a and b). *VEGF* expression did not correlate with disease stage, but transcript numbers were higher in cases showing IgV unmutated profile associated with worse prognosis (Kruskal–Wallis test, $P = 0.016$). *IL-6* expression was significantly higher in the early B-CLL subgroup (Binet stage A, $P = 0.033$) and in good-prognosis IgV mutated cases ($P = 0.024$). No association was found between the *VEGF* and *IL-6* gene expression and CD38 positivity. In addition, *MCL-1* gene expression was not related to any of these established prognostic factors (Fig. 2c).

The number of *VEGF* transcripts, used as a continuous variable in univariate Cox model, was a significant predictor of overall survival ($P = 0.029$). Overall survival times were then compared between the B-CLL groups with low (below median) and high (above median) *VEGF* expression. Fig. 3a shows that survival times were longer in patients with low *VEGF* levels and shorter in patients with high *VEGF* levels (log-rank test, $P = 0.033$), which supported the prognostic role of *VEGF*. *IL-6* expression levels were not predictive of survival in univariate Cox model ($P = 0.52$, NS).

As expected, the level of *MCL-1* gene expression had significant impact on the survival of B-CLL patients as a continuous variable in univariate Cox model ($P = 0.0015$) and in log-rank test, using the median value of the whole population (84.0) as a cut-off point (Fig. 3b, $P = 0.0038$). Residual analysis of the linear regression between *VEGF* and *MCL-1* transcript levels revealed an abnormal population with low *VEGF* but high *MCL-1* expression. As higher *MCL-1* mRNA levels were associated with worse prognosis, we stratified 44 patients with low *VEGF* according to the median *MCL-1* level in this group (41.6) and compared survival times between the subgroups. Patients with low *VEGF* but high *MCL-1* expression had shorter survival than patients expressing both genes at low levels ($P = 0.0045$, Fig. 3c), indicating that the prognostic impact of *MCL-1* level may overwhelm the prognostic value of *VEGF* level. In patients with high amounts of *VEGF* mRNA, the overall level of *MCL-1* transcript was also high. In this group, *MCL-1* level did not influence the impact of *VEGF* on patient survival (data not shown). Of note, Binet A and B/C stages were equally distributed among different patient groups and subgroups analyzed here.

In a bivariate Cox analysis with the IgV mutational status, the strongest biological indicator of B-CLL prognosis, the level of *VEGF* expression was a significant prognostic factor ($P = 0.018$) with the hazard ratio of 3.2 (95%CI 1.2–8.4). In a multivariate Cox analysis, including IgV mutational status ($P = 0.0061$), and *MCL-1* ($P = 0.029$), the level of *VEGF* expression was no longer predictive of survival, which may be explained by a tight correlation between *VEGF* and *MCL-1* transcript numbers and a stronger prognostic value of *MCL-1* expression.

4. Discussion

MCL-1 mRNA and protein expression, leading to enhanced survival of tumor cells, has emerged as a novel molecular prognostic factor in B-CLL patients [1,2]. In a longitudinal patient analysis, the expression of the *MCL-1* gene product in B-CLL cells was found to be remarkably constant over time [2]. These stable expression levels may be maintained by cytokines, which are constitutively produced by malignant lymphocytes and may function in autocrine pathways regulating the *MCL-1* gene. In the present study, we explored the correlation of *VEGF* and *IL-6* mRNA levels in leukemic cells with the amount of *MCL-1* mRNA and evaluated a potential clinical significance of the expression of these cytokine genes in 88 B-CLL patients.

In B-CLL samples, we found a strong correlation between *VEGF* and *MCL-1* mRNA levels, providing evidence that *VEGF* may be a positive autocrine *in vivo* regulator of *MCL-1*. The coefficient of determination (r^2) indicates that different *VEGF* transcript levels could explain 53% of the variability in *MCL-1* expression. These results are in line with previous experimental studies regarding the involvement of *VEGF* in the regulation of *MCL-1* expression in B-CLL [5,6,9]. VEGF was shown to upregulate *MCL-1* mRNA and protein in B-CLL cells and to increase cell survival [5]. Co-expression of *VEGF* and its receptors [15,16] by B-CLL cells suggested the possibility of an autocrine survival loop. Pepper et al. [9] demonstrated in purified cell-sorted B-CLL cultures that the pro-survival effect of autocrine VEGF was neutralized by an intracellular inhibitor of VEGF receptor signaling, whereas an extracellularly acting anti-VEGF antibody could not block this effect. Thus, B-CLL cells appeared to utilize an internal autocrine VEGF survival loop. The inhibition of VEGF receptor signaling in B-CLL cells was found to result in the down-regulation of MCL-1 and induction of apoptosis in other studies [5,6].

VEGF gene expression appears to be clinically relevant in B-CLL. In our study, the level of *VEGF* mRNA was significantly higher in the aggressive disease form with unmutated IgV gene profile. Further analysis indicated that, independently of their IgV mutational status, B-CLL patients with high *VEGF* levels had shortened survival. Nevertheless, *VEGF* prognostic value was not independent of the *MCL-1* expression level. A multivariate Cox model was in favor of *MCL-1*, suggesting that this gene is a stronger predictor of survival than *VEGF*. The impact of *MCL-1* was seen particularly in cases with low *VEGF* levels that overexpressed the *MCL-1* gene and had an adverse prognosis.

The cases with discordant *VEGF* and *MCL-1* expression outline the role of other mechanisms regulating *MCL-1* in B-CLL. In particular, sustained signaling through B-cell receptor has been associated with prolonged activation of serine/threonine kinase AKT [17],

Please cite this article in press as: Véronèse L, et al. Strong correlation between *VEGF* and *MCL-1* mRNA expression levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leuk Res (2009), doi:10.1016/j.leukres.2009.05.003

which may lead to MCL-1 up-regulation at transcriptional and/or post-transcriptional levels [18,19].

Our study of *IL-6* expression in B-CLL yielded interesting negative results, showing that neither *MCL-1* gene expression nor patient outcomes were related to the level of tumor-derived *IL-6* mRNA. The cell survival action of autocrine IL-6 in some solid tumors seems to be mediated by MCL-1 [7,8], and overexpression of the *IL-6* gene in tumor cells was associated with a poor prognosis [12]. Of note, IL-6 has been implicated as a direct controller of *MCL-1* gene transcription [7]. The capacity of B-CLL cells to express IL-6 and its membrane receptor [19,20] was suggestive of the existence of an autocrine IL-6 loop leading to *MCL-1* gene overexpression, but our results do not support this mechanism.

Alternatively, a paracrine signaling involving IL-6 produced by non-malignant cells might contribute to *MCL-1* gene up-regulation and apoptosis prevention in B-CLL as it was for example shown for IL-6 derived from endothelial cells [21]. The measurements of plasma or serum IL-6 levels may have prognostic significance. Previous reports showed correlations between the IL-6 protein level and advanced disease stage and shorter survival in B-CLL [22,23]. Further studies comparing *IL-6* mRNA and protein levels in malignant cells as well as plasma IL-6 protein levels are needed to understand better the role of IL-6 in B-CLL.

5. Conclusion

In summary, our results indicate that VEGF may play a role in B-CLL progression, which is most likely to be related to the stimulation of *MCL-1* gene expression. Since *VEGF* and *MCL-1* genes are overexpressed in poor-prognosis B-CLL, inhibition of VEGF and its signaling may prove to be useful in the treatment of these patients.

Conflict of interest

None.

Acknowledgement

This study was supported by the Ligue contre le Cancer (Auvergne, France).

Contributions. LV performed the experiments, analyzed the data and drafted the manuscript; OT, PV, FD, GD, EC, RVM, FK, CG, LG, JOB, PV contributed to the design of the study, to the work and to the interpretation of results and critically reviewed the manuscript; AT designed the study, analyzed the data and wrote the final manuscript version.

References

[1] Véronèse L, Tournilhac O, Verrelle P, Davi F, Dighiero G, Chautard E, et al. Low MCL-1 mRNA expression correlates with prolonged survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 2008;22:1291–3.
[2] Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, Hiller L, et al. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. Blood 2008;112:3807–17.
[3] Hussain SR, Cheney CM, Johnson AJ, Lin TS, Grever MR, Caligiuri MA, et al. Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. Clin Cancer Res 2007;13:2144–50.
[4] Le Gouill S, Podar K, Amiot M, Hideshima T, Chauhan D, Ishitsuka K, et al. VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. Blood 2004;104:2886–92.
[5] Lee YK, Bone ND, Strege AK, Shanafelt TD, Jelinek DF, Kay NE. VEGF receptor phophorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigalloatechin-3-gallate (EGCG) in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Blood 2004;104:788–94.
[6] Lee YK, Shanafelt TD, Bone ND, Strege AK, Jelinek DF, Kay NE. VEGF receptors on chronic lymphocytic leukaemia (CLL) B cells interact with STAT1 and 3: implications for apoptosis resistance. Leukemia 2005;19:513–23.
[7] Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Guicciardi ME, Frank DA, et al. Interleukin-6 upregulates myeloid cell leukaemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinome cells. Hepatology 2005;42:1329–38.
[8] Cavarretta IT, Neuwirt H, Zaki MH, Steiner H, Hobisch A, Nemeth JA, et al. Mcl-1 is regulated by IL-6 and mediates the survival activity of the cytokine in a model of late stage prostate carcinoma. Adv Exp Med Biol 2008;617:547–55.
[9] Pepper C, Ward R, Lin TT, Brennan P, Starczynski J, Musson M, et al. Highly purified $CD38^{+}$ and $CD38^{-}$ sub-clones derived from the same chronic lymphocytic leukemia patient have distinct gene expression signatures despite their monoclonal origin. Leukemia 2007;21:687–96.
[10] Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)—a Europe against cancer program. Leukemia 2003;17:2474–86.
[11] Zhou YH, Tan F, Hess KR, Yung WK. The expression of PAX6, PTEN, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in gliomas: relationship to tumor grade and survival. Clin Cancer Res 2003;9:3369–75.
[12] Tchirkov A, Khalil T, Chautard E, Mokhtari K, Véronèse L, Irthum B, et al. Interleukin-6 gene amplification and shortened survival in glioblastoma patients. Br J Cancer 2007;96:474–6.
[13] Maloum K, Pritsch O, Magnac C, Vuillier F, Dighiero G, Troussard X, et al. Expression of unmutated VH genes is a detrimental prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2000;96:377–9.
[14] Ghia P, Guida G, Stella S, Gottardi D, Geuna M, Strola G, et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. Blood 2003;101:1262–9.
[15] Chen H, Treweeke AT, West DC, Till KJ, Cawley JC, Zuzel M, et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukaemia cells. Blood 2000;96:3181–7.
[16] Bayrey O, Boycov O, Kaganovsky E, Zimra Y, Shaklai M, Rabizadeh E. All three receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) are expressed on B-chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells. Leuk Res 2004;28:243–8.
[17] Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. Blood 2008;111:846–55.
[18] Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF. The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. Mol Cell Biol 1999;19:6195–206.
[19] Biondi A, Rossi V, Barbui T, Bettoni S, Sironi M, Mantovani A, et al. Constitutive expression of the interleukin-6 gene in chronic lymphocytic leukaemia. Blood 1989;73:1279–84.
[20] Lavabre-Bertrand T, Exbrayat C, Liautard J, Gaillard JP, Baskevitch PP, Poujol N, et al. Detection of membrane and soluble interleukin-6 receptor in lymphoid malignancies. Br J Haematol 1995;91:871–7.
[21] Moreno A, Villar ML, Cámara C, Luque R, Cespón C, González-Porqué P, et al. Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. Blood 2001;97:242–9.
[22] Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee BN, Lerner S, et al. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. Blood 2001;97:256–63.
[23] Lai R, O'Brien S, Maushouri T, Rogers A, Kantarjian H, Keating M, et al. Prognostic value of plasma interleukin-6 levels in patients with chronic lymphocytic leukemia. Cancer 2002;95:1071–5.

Please cite this article in press as: Véronèse L, et al. Strong correlation between *VEGF* and *MCL-1* mRNA expression levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leuk Res (2009), doi:10.1016/j.leukres.2009.05.003

Références Bibliographiques

2001. Randomized trial of procarbazine, lomustine, and vincristine in the adjuvant treatment of high-grade astrocytoma: a Medical Research Council trial. *J Clin Oncol* **19:** 509-518.

Abe, K., Hirai, M., Mizuno, K., Higashi, N., Sekimoto, T., Miki, T., Hirano, T., and Nakajima, K. 2001. The YXXQ motif in gp 130 is crucial for STAT3 phosphorylation at Ser727 through an H7-sensitive kinase pathway. *Oncogene* **20:** 3464-3474.

Abraham, R.T. 2003. Checkpoint signaling: epigenetic events sound the DNA strand-breaks alarm to the ATM protein kinase. *Bioessays* **25:** 627-630.

Abrey, L.E. and Mason, W.P. 2003. *FAST FACTS : BRAIN TUMORS*. Oxford.

Ader, I., Delmas, C., Bonnet, J., Rochaix, P., Favre, G., Toulas, C., and Cohen-Jonathan-Moyal, E. 2003. Inhibition of Rho pathways induces radiosensitization and oxygenation in human glioblastoma xenografts. *Oncogene* **22:** 8861-8869.

Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. 2008. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* **10:** 619-624.

Albanese, J. and Dainiak, N. 2003. Modulation of intercellular communication mediated at the cell surface and on extracellular, plasma membrane-derived vesicles by ionizing radiation. *Exp Hematol* **31:** 455-464.

Aloy, M.T., Hadchity, E., Bionda, C., Diaz-Latoud, C., Claude, L., Rousson, R., Arrigo, A.P., and Rodriguez-Lafrasse, C. 2008. Protective role of Hsp27 protein against gamma radiation-induced apoptosis and radiosensitization effects of Hsp27 gene silencing in different human tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **70:** 543-553.

Andrieu-Abadie, N. and Levade, T. 2002. Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1585:** 126-134.

Audebert, M., Salles, B., Weinfeld, M., and Calsou, P. 2006. Involvement of polynucleotide kinase in a poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway. *J Mol Biol* **356:** 257-265.

Averbeck, D. 2008. Effets des rayonnements. In *Radiobiologie* (ed. Hermann/Médecine), pp. 79-182. Tubiana, M., Paris.

Baatout, S., Derradji, H., Petitfour, O., von Suchodoletz, H., and Mergeay, M. 2002. [Mechanisms of radio-induced apoptosis]. *Can J Physiol Pharmacol* **80:** 629-637.

Baker, S.J. and Reddy, E.P. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* **17:** 3261-3270.

Baldi, I., Loiseau, H., and Kantor, G. 2000. Cancer du système nerveux central. In *Les cancers professionnels* (ed. M. Orange), pp. 613-629. Pairon, J.C. , Brochard, P., Le Bourgeois, J.P., Ruffie, P.

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

Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A.B., Shi, Q., McLendon, R.E., Bigner, D.D., and Rich, J.N. 2006b. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* **66:** 7843-7848.

Barre, B., Vigneron, A., Perkins, N., Roninson, I.B., Gamelin, E., and Coqueret, O. 2007. The STAT3 oncogene as a predictive marker of drug resistance. *Trends Mol Med* **13:** 4-11.

Bauman, G.S., Ino, Y., Ueki, K., Zlatescu, M.C., Fisher, B.J., Macdonald, D.R., Stitt, L., Louis, D.N., and Cairncross, J.G. 2000. Allelic loss of chromosome 1p and radiotherapy plus chemotherapy in patients with oligodendrogliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **48:** 825-830.

Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F., and Delattre, J.Y. 2003. Primary brain tumours in adults. *Lancet* **361:** 323-331.

Biernat, W., Kleihues, P., Yonekawa, Y., and Ohgaki, H. 1997. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **56:** 180-185.

Bijnsdorp, I.V., van den Berg, J., Kuipers, G.K., Wedekind, L.E., Slotman, B.J., van Rijn, J., Lafleur, M.V., and Sminia, P. 2007. Radiosensitizing potential of the selective cyclooygenase-2 (COX-2) inhibitor meloxicam on human glioma cells. *J Neurooncol* **85:** 25-31.

Blazek, E.R., Foutch, J.L., and Maki, G. 2007. Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **67:** 1-5.

Bleehen, N.M. and Stenning, S.P. 1991. A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. The Medical Research Council Brain Tumour Working Party. *Br J Cancer* **64:** 769-774.

Boch, A.L. 2004. Métastases cérébrales. In *Tumeurs cérébrales : du diagnostic au traitement* (ed. Masson), pp. 259-265. Philippon, J., Paris.

Boch, A.L. and Menei, P. 2004. Génétique et biologie moléculaire. In *Tumeurs cérébrales : du diagnostic au traitement* (ed. Masson), pp. 17-30. Philippon, J., Paris.

Bollinger, C.R., Teichgraber, V., and Gulbins, E. 2005. Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim Biophys Acta* **1746:** 284-294.

Bondy, M.L., Scheurer, M.E., Malmer, B., Barnholtz-Sloan, J.S., Davis, F.G., Il'yasova, D., Kruchko, C., McCarthy, B.J., Rajaraman, P., Schwartzbaum, J.A. et al. 2008. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* **113:** 1953-1968.

Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S., and Pommier, Y. 2008. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* **8:** 957-967.

Borges, H.L., Linden, R., and Wang, J.Y. 2008. DNA damage-induced cell death: lessons from the central nervous system. *Cell Res* **18:** 17-26.

Borsellino, N., Belldegrun, A., and Bonavida, B. 1995. Endogenous interleukin 6 is a resistance factor for cis-diamminedichloroplatinum and etoposide-mediated cytotoxicity of human prostate carcinoma cell lines. *Cancer Res* **55:** 4633-4639.

Bouvier-Labit, C., Chinot, O., Ochi, C., Gambarelli, D., Dufour, H., and Figarella-Branger, D. 1998. Prognostic significance of Ki67, p53 and epidermal growth factor receptor immunostaining in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* **24:** 381-388.

Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19:** 2474-2488.

Brach, M.A., Gruss, H.J., Kaisho, T., Asano, Y., Hirano, T., and Herrmann, F. 1993. Ionizing radiation induces expression of interleukin 6 by human fibroblasts involving activation of nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* **268:** 8466-8472.

Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J., and Pouyssegur, J. 2007. Hypoxia and cancer. *J Mol Med* **85:** 1301-1307.

Brantley, E.C., Nabors, L.B., Gillespie, G.Y., Choi, Y.H., Palmer, C.A., Harrison, K., Roarty, K., and Benveniste, E.N. 2008. Loss of protein inhibitors of activated STAT-3 expression in glioblastoma multiforme tumors: implications for STAT-3 activation and gene expression. *Clin Cancer Res* **14:** 4694-4704.

Bromberg, J. and Darnell, J.E., Jr. 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19:** 2468-2473.

Buckner, J.C., Brown, P.D., O'Neill, B.P., Meyer, F.B., Wetmore, C.J., and Uhm, J.H. 2007. Central nervous system tumors. *Mayo Clin Proc* **82:** 1271-1286.

Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, C., Frohwein, U., and Schulte-Hermann, R. 2000. Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann N Y Acad Sci* **926:** 1-12.

Burton, E.C., Lamborn, K.R., Feuerstein, B.G., Prados, M., Scott, J., Forsyth, P., Passe, S., Jenkins, R.B., and Aldape, K.D. 2002. Genetic aberrations defined by comparative genomic hybridization distinguish long-term from typical survivors of glioblastoma. *Cancer Res* **62:** 6205-6210.

Burton, T.R., Eisenstat, D.D., and Gibson, S.B. 2009. BNIP3 (Bcl-2 19 kDa interacting protein) acts as transcriptional repressor of apoptosis-inducing factor expression preventing cell death in human malignant gliomas. *J Neurosci* **29:** 4189-4199.

Burton, T.R. and Gibson, S.B. 2009. The role of Bcl-2 family member BNIP3 in cell death and disease: NIPping at the heels of cell death. *Cell Death Differ* **16:** 515-523.

Burton, T.R., Henson, E.S., Baijal, P., Eisenstat, D.D., and Gibson, S.B. 2006. The pro-cell death Bcl-2 family member, BNIP3, is localized to the nucleus of human glial cells: Implications for glioblastoma multiforme tumor cell survival under hypoxia. *Int J Cancer* **118:** 1660-1669.

Cairncross, J.G., Ueki, K., Zlatescu, M.C., Lisle, D.K., Finkelstein, D.M., Hammond, R.R., Silver, J.S., Stark, P.C., Macdonald, D.R., Ino, Y. et al. 1998. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* **90:** 1473-1479.

Camphausen, K., Cerna, D., Scott, T., Sproull, M., Burgan, W.E., Cerra, M.A., Fine, H., and Tofilon, P.J. 2005. Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by valproic acid. *Int J Cancer* **114:** 380-386.

Canute, G.W., Longo, S.L., Longo, J.A., Winfield, J.A., Nevaldine, B.H., and Hahn, P.J. 1996. Hydroxyurea accelerates the loss of epidermal growth factor receptor genes amplified as double-minute chromosomes in human glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* **39:** 976-983.

Carapancea, M., Cosaceanu, D., Budiu, R., Kwiecinska, A., Tataranu, L., Ciubotaru, V., Alexandru, O., Banita, M., Pisoschi, C., Backlund, M.L. et al. 2007. Dual targeting of IGF-1R and PDGFR inhibits proliferation in high-grade gliomas cells and induces radiosensitivity in JNK-1 expressing cells. *J Neurooncol* **85:** 245-254.

Cavaillon, J.M. 1996. *Les cytokines*. Masson edition., Paris.

Chakravarti, A., Zhai, G., Suzuki, Y., Sarkesh, S., Black, P.M., Muzikansky, A., and Loeffler, J.S. 2004. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol* **22:** 1926-1933.

Chalmers, A.J. 2004. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and ionizing radiation: sensor, signaller and therapeutic target. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **16:** 29-39.

Chan, A.S., Leung, S.Y., Wong, M.P., Yuen, S.T., Cheung, N., Fan, Y.W., and Chung, L.P. 1998. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the anaplastic progression of astrocytoma, oligodendroglioma, and ependymoma. *Am J Surg Pathol* **22:** 816-826.

Chang, C.H., Horton, J., Schoenfeld, D., Salazer, O., Perez-Tamayo, R., Kramer, S., Weinstein, A., Nelson, J.S., and Tsukada, Y. 1983. Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. A joint Radiation Therapy Oncology Group and Eastern Cooperative Oncology Group study. *Cancer* **52:** 997-1007.

Chang, C.Y., Li, M.C., Liao, S.L., Huang, Y.L., Shen, C.C., and Pan, H.C. 2005. Prognostic and clinical implication of IL-6 expression in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci* **12:** 930-933.

Chen, A.Y., Shih, S.J., Garriques, L.N., Rothenberg, M.L., Hsiao, M., and Curran, D.P. 2005. Silatecan DB-67 is a novel DNA topoisomerase I-targeted radiation sensitizer. *Mol Cancer Ther* **4:** 317-324.

Chen, J.S., Zhou, L.J., Entin-Meer, M., Yang, X., Donker, M., Knight, Z.A., Weiss, W., Shokat, K.M., Haas-Kogan, D., and Stokoe, D. 2008. Characterization of structurally distinct, isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors in combination with radiation in the treatment of glioblastoma. *Mol Cancer Ther* **7:** 841-850.

Chinnaiyan, P., Cerna, D., Burgan, W.E., Beam, K., Williams, E.S., Camphausen, K., and Tofilon, P.J. 2008. Postradiation sensitization of the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Clin Cancer Res* **14:** 5410-5415.

Choe, G., Horvath, S., Cloughesy, T.F., Crosby, K., Seligson, D., Palotie, A., Inge, L., Smith, B.L., Sawyers, C.L., and Mischel, P.S. 2003. Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. *Cancer Res* **63:** 2742-2746.

Choi, C., Gillespie, G.Y., Van Wagoner, N.J., and Benveniste, E.N. 2002. Fas engagement increases expression of interleukin-6 in human glioma cells. *J Neurooncol* **56:** 13-19.

Chow, D., He, X., Snow, A.L., Rose-John, S., and Garcia, K.C. 2001. Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex. *Science* **291:** 2150-2155.

Cloughesy, T.F. and Black, K.L. 1999. Peritumoral Edema. In *The Gliomas* (ed. W.B.S. Compagny), pp. 107-114. Berger, M.S.

Wilson, C.B., Philadelphia.

Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L.W., Neufeld, G., and Levi, B.Z. 1996. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **271:** 736-741.

Contessa, J.N., Abell, A., Valerie, K., Lin, P.S., and Schmidt-Ullrich, R.K. 2006. ErbB receptor tyrosine kinase network inhibition radiosensitizes carcinoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **65:** 851-858.

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

Cornforth, M.N. 2006. Perspectives on the formation of radiation-induced exchange aberrations. *DNA Repair (Amst)* **5:** 1182-1191.

Cremer, C., Munkel, C., Granzow, M., Jauch, A., Dietzel, S., Eils, R., Guan, X.Y., Meltzer, P.S., Trent, J.M., Langowski, J. et al. 1996. Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations. *Mutat Res* **366:** 97-116.

Daido, S., Yamamoto, A., Fujiwara, K., Sawaya, R., Kondo, S., and Kondo, Y. 2005. Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy. *Cancer Res* **65:** 4368-4375.

Daumas-Duport, C., Beuvon, F., Varlet, P., and Fallet-Bianco, C. 2000. [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. *Ann Pathol* **20:** 413-428.

Daumas-Duport, C., Tucker, M.L., Kolles, H., Cervera, P., Beuvon, F., Varlet, P., Udo, N., Koziak, M., and Chodkiewicz, J.P. 1997. Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria. *J Neurooncol* **34:** 61-78.

Del Maestro, R.F. 1999. Angiogenesis. In *The Gliomas* (ed. W.B.S. Compagny), pp. 87-106. Berger, M.S., Wilson, C.B., Philadelphia.

del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G. 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278:** 687-689.

Ding, G.R., Honda, N., Nakahara, T., Tian, F., Yoshida, M., Hirose, H., and Miyakoshi, J. 2003. Radiosensitization by inhibition of IkappaB-alpha phosphorylation in human glioma cells. *Radiat Res* **160:** 232-237.

Dubost, J.J., Rolhion, C., Tchirkov, A., Bertrand, S., Chassagne, J., Dosgilbert, A., and Verrelle, P. 2002. Interleukin-6-producing cells in a human glioblastoma cell line are not affected by ionizing radiation. *J Neurooncol* **56:** 29-34.

Ducray, F. 2008. [Biology of gliomas]. *Cancer Radiother* **12:** 663-668.

Ducray, F., Idbaih, A., de Reynies, A., Bieche, I., Thillet, J., Mokhtari, K., Lair, S., Marie, Y., Paris, S., Vidaud, M. et al. 2008. Anaplastic oligodendrogliomas with 1p19q codeletion have a proneural gene expression profile. *Mol Cancer* **7:** 41.

Dumont, A., Hehner, S.P., Schmitz, M.L., Gustafsson, J.A., Liden, J., Okret, S., van der Saag, P.T., Wissink, S., van der Burg, B., Herrlich, P. et al. 1998. Cross-talk between steroids and NF-kappa B: what language? *Trends Biochem Sci* **23:** 233-235.

Dungey, F.A., Caldecott, K.W., and Chalmers, A.J. 2009. Enhanced radiosensitization of human glioma cells by combining inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase with inhibition of heat shock protein 90. *Mol Cancer Ther* **8:** 2243-2254.

Dungey, F.A., Loser, D.A., and Chalmers, A.J. 2008. Replication-dependent radiosensitization of human glioma cells by inhibition of poly(ADP-Ribose) polymerase: mechanisms and therapeutic potential. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **72:** 1188-1197.

Dupont, V.N., Gentien, D., Oberkampf, M., De Rycke, Y., and Blin, N. 2007. A gene expression signature associated with metastatic cells in effusions of breast carcinoma patients. *Int J Cancer* **121:** 1036-1046.

Edwards, L.A., Thiessen, B., Dragowska, W.H., Daynard, T., Bally, M.B., and Dedhar, S. 2005. Inhibition of ILK in PTEN-mutant human glioblastomas inhibits PKB/Akt activation, induces apoptosis, and delays tumor growth. *Oncogene* **24:** 3596-3605.

Edwards, L.A., Woo, J., Huxham, L.A., Verreault, M., Dragowska, W.H., Chiu, G., Rajput, A., Kyle, A.H., Kalra, J., Yapp, D. et al. 2008. Suppression of VEGF secretion and changes in glioblastoma multiforme microenvironment by inhibition of integrin-linked kinase (ILK). *Mol Cancer Ther* **7:** 59-70.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35:** 495-516.

Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B., and Herman, J.G. 2000. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* **343:** 1350-1354.

Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A.C., Mao, Y., Miao, R.Q. et al. 2008. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J* **27:** 1932-1943.

Favaudon, V. 2008. Effets celluaires des rayonnements ionisants . radiosensibilité, cycle cellulaire et mort cellulaire. In *Radiobiologie* (ed. Hermann/Médecine), pp. 187-234. Tubiana, M., Paris.

Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D., and Hemmings, B.A. 2004. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **279:** 41189-41196.

Fertil, B. and Malaise, E.P. 1981. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **7:** 621-629.

Fertil, B. and Malaise, E.P. 1985. Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: analysis of 101 published survival curves. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **11:** 1699-1707.

Fiebich, B.L., Lieb, K., Berger, M., and Bauer, J. 1995. Stimulation of the sphingomyelin pathway induces interleukin-6 gene expression in human astrocytoma cells. *J Neuroimmunol* **63:** 207-211.

Figarella-Branger, D. and Bouvier, C. 2005. [Histological classification of human gliomas: state of art and controversies]. *Bull Cancer* **92:** 301-309.

Fischer, U., Radermacher, J., Mayer, J., Mehraein, Y., and Meese, E. 2008. Tumor hypoxia: Impact on gene amplification in glioblastoma. *Int J Oncol* **33:** 509-515.

Fleming, T.P., Saxena, A., Clark, W.C., Robertson, J.T., Oldfield, E.H., Aaronson, S.A., and Ali, I.U. 1992. Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res* **52:** 4550-4553.

Franke, T.F. 2008. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* **27:** 6473-6488.

Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K., and Hirano, T. 1996. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* **5:** 449-460.

Gardès-Albert, M. 2008. Chimie sous rayonnement. In *Radiobiologie* (ed. Hermann/Médecine), pp. 41-73. Tubiana, M., Paris.

Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P.C., and Graeve, L. 1996. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem* **271:** 12991-12998.

Giannini, C., Burger, P.C., Berkey, B.A., Cairncross, J.G., Jenkins, R.B., Mehta, M., Curran, W.J., and Aldape, K. 2008. Anaplastic oligodendroglial tumors: refining the correlation among histopathology, 1p 19q deletion and clinical outcome in Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *Brain Pathol* **18:** 360-369.

Gloire, G., Charlier, E., and Piette, J. 2008. Regulation of CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis by protein phosphatases. *Biochem Pharmacol* **76:** 1451-1458.

Gordon, S. and Taylor, P.R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5:** 953-964.

Goswami, S., Gupta, A., and Sharma, S.K. 1998. Interleukin-6-mediated autocrine growth promotion in human glioblastoma multiforme cell line U87MG. *J Neurochem* **71:** 1837-1845.

Graner, M.W., Alzate, O., Dechkovskaia, A.M., Keene, J.D., Sampson, J.H., Mitchell, D.A., and Bigner, D.D. 2008. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB J*.

Grauer, O.M., Nierkens, S., Bennink, E., Toonen, L.W., Boon, L., Wesseling, P., Sutmuller, R.P., and Adema, G.J. 2007. CD4+FoxP3+ regulatory T cells gradually accumulate in gliomas during tumor growth and efficiently suppress antiglioma immune responses in vivo. *Int J Cancer* **121:** 95-105.

Gray, F., Mokhtari, K., and Poirier, J. 2004. Epidémiologie. In *Tumeurs cérébrales : du diagnostic au traitement* (ed. Masson), pp. 3-6. Philippon, J., Paris.

Green, D.R. and Kroemer, G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305:** 626-629.

Guan, B., Yue, P., Clayman, G.L., and Sun, S.Y. 2001. Evidence that the death receptor DR4 is a DNA damage-inducible, p53-regulated gene. *J Cell Physiol* **188:** 98-105.

Guichard, M., Dertinger, H., and Malaise, E.P. 1983. Radiosensitivity of four human tumor xenografts. Influence of hypoxia and cell-cell contact. *Radiat Res* **95:** 602-609.

Gulbins, E. and Kolesnick, R. 2002. Acid sphingomyelinase-derived ceramide signaling in apoptosis. *Subcell Biochem* **36:** 229-244.

Haas-Kogan, D., Shalev, N., Wong, M., Mills, G., Yount, G., and Stokoe, D. 1998. Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr Biol* **8:** 1195-1198.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100:** 57-70.

Hardell, L., Carlberg, M., and Hansson Mild, K. 2009. Epidemiological evidence for an association between use of wireless phones and tumor diseases. *Pathophysiology*.

Harrison, L. and Blackwell, K. 2004. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *Oncologist* **9 Suppl 5:** 31-40.

Hauge, C., Antal, T.L., Hirschberg, D., Doehn, U., Thorup, K., Idrissova, L., Hansen, K., Jensen, O.N., Jorgensen, T.J., Biondi, R.M. et al. 2007. Mechanism for activation of the growth factor-activated AGC kinases by turn motif phosphorylation. *EMBO J* **26:** 2251-2261.

Heeres, J.T. and Hergenrother, P.J. 2007. Poly(ADP-ribose) makes a date with death. *Curr Opin Chem Biol* **11:** 644-653.

Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374:** 1-20.

Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* **334 (Pt 2):** 297-314.

Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A. et al. 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* **324:** 73-76.

Hlatky, L., Hahnfeldt, P., and Folkman, J. 2002. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* **94:** 883-893.

Hoang-Xuan, K., He, J., Huguet, S., Mokhtari, K., Marie, Y., Kujas, M., Leuraud, P., Capelle, L., Delattre, J.Y., Poirier, J. et al. 2001. Molecular heterogeneity of oligodendrogliomas suggests alternative pathways in tumor progression. *Neurology* **57:** 1278-1281.

Hoang-Xuan, K., Idbaih, A., Mokhtari, K., and Sanson, M. 2005. [Towards a molecular classification of gliomas]. *Bull Cancer* **92:** 310-316.

Hoelzinger, D.B., Demuth, T., and Berens, M.E. 2007. Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. *J Natl Cancer Inst* **99:** 1583-1593.

Huang, P.H., Mukasa, A., Bonavia, R., Flynn, R.A., Brewer, Z.E., Cavenee, W.K., Furnari, F.B., and White, F.M. 2007. Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104:** 12867-12872.

Hussain, S.F., Kong, L.Y., Jordan, J., Conrad, C., Madden, T., Fokt, I., Priebe, W., and Heimberger, A.B. 2007. A novel small molecule inhibitor of signal transducers and activators of transcription 3 reverses immune tolerance in malignant glioma patients. *Cancer Res* **67:** 9630-9636.

Hussain, S.F., Yang, D., Suki, D., Aldape, K., Grimm, E., and Heimberger, A.B. 2006. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro Oncol* **8:** 261-279.

Inda, M.M., Fan, X., Munoz, J., Perot, C., Fauvet, D., Danglot, G., Palacio, A., Madero, P., Zazpe, I., Portillo, E. et al. 2003. Chromosomal abnormalities in human glioblastomas: gain in chromosome 7p correlating with loss in chromosome 10q. *Mol Carcinog* **36:** 6-14.

Inskip, P.D., Tarone, R.E., Hatch, E.E., Wilcosky, T.C., Shapiro, W.R., Selker, R.G., Fine, H.A., Black, P.M., Loeffler, J.S., and Linet, M.S. 2001. Cellular-telephone use and brain tumors. *N Engl J Med* **344:** 79-86.

Isomoto, H., Kobayashi, S., Werneburg, N.W., Bronk, S.F., Guicciardi, M.E., Frank, D.A., and Gores, G.J. 2005. Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* **42:** 1329-1338.

Iwamaru, A., Szymanski, S., Iwado, E., Aoki, H., Yokoyama, T., Fokt, I., Hess, K., Conrad, C., Madden, T., Sawaya, R. et al. 2007. A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo. *Oncogene* **26:** 2435-2444.

Jackson, S.P. 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* **23:** 687-696.

Jain, R.K. 1988. Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res* **48:** 2641-2658.

Jiang, Z., Pore, N., Cerniglia, G.J., Mick, R., Georgescu, M.M., Bernhard, E.J., Hahn, S.M., Gupta, A.K., and Maity, A. 2007. Phosphatase and tensin homologue deficiency in glioblastoma confers resistance to radiation and temozolomide that is reversed by the protease inhibitor nelfinavir. *Cancer Res* **67:** 4467-4473.

Jones, S.A., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N., and Fuller, G.M. 2001. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J* **15:** 43-58.

Jostock, T., Mullberg, J., Ozbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M.F., and Rose-John, S. 2001. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem* **268:** 160-167.

Kamimura, D., Ishihara, K., and Hirano, T. 2003. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **149:** 1-38.

Kao, G.D., Jiang, Z., Fernandes, A.M., Gupta, A.K., and Maity, A. 2007. Inhibition of phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation. *J Biol Chem* **282:** 21206-21212.

Kasza, A., Rogowski, K., Kilarski, W., Sobota, R., Bernas, T., Dobrucki, J., Travis, J., Koj, A., Bugno, M., and Kordula, T. 2001. Differential effects of oncostatin M and leukaemia inhibitory factor expression in astrocytoma cells. *Biochem J* **355:** 307-314.

Kim, D. and Chung, J. 2002. Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J Biochem Mol Biol* **35:** 106-115.

Kim, J.H., Shin, J.H., and Kim, I.H. 2004. Susceptibility and radiosensitization of human glioblastoma cells to trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **59:** 1174-1180.

Kim, S.J., Ju, J.W., Oh, C.D., Yoon, Y.M., Song, W.K., Kim, J.H., Yoo, Y.J., Bang, O.S., Kang, S.S., and Chun, J.S. 2002. ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status. *J Biol Chem* **277:** 1332-1339.

Kleihues, P. and Cavenee, W.K. 2000. *Pathology and genetics of tumours of the central nervous system*. IARC Press (International Agency forResearch on Cancer), Lyon (France).

Kokunai, T., Urui, S., Tomita, H., and Tamaki, N. 2001. Overcoming of radioresistance in human gliomas by p21WAF1/CIP1 antisense oligonucleotide. *J Neurooncol* **51:** 111-119.

Kolesnick, R. and Fuks, Z. 2003. Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* **22:** 5897-5906.

Konnikova, L., Kotecki, M., Kruger, M.M., and Cochran, B.H. 2003. Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. *BMC Cancer* **3:** 23.

Koul, D., Shen, R., Bergh, S., Lu, Y., de Groot, J.F., Liu, T.J., Mills, G.B., and Yung, W.K. 2005. Targeting integrin-linked kinase inhibits Akt signaling pathways and decreases tumor progression of human glioblastoma. *Mol Cancer Ther* **4:** 1681-1688.

Kourtis, N. and Tavernarakis, N. 2009. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death Differ* **16:** 21-30.

Kubota, N., Okada, S., Inada, T., Ohnishi, K., and Ohnishi, T. 2000. Wortmannin sensitizes human glioblastoma cell lines carrying mutant and wild type TP53 gene to radiation. *Cancer Lett* **161:** 141-147.

Kuipers, G.K., Slotman, B.J., Wedekind, L.E., Stoter, T.R., Berg, J., Sminia, P., and Lafleur, M.V. 2007. Radiosensitization of human glioma cells by cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition: independent on COX-2 expression and dependent on the COX-2 inhibitor and sequence of administration. *Int J Radiat Biol* **83:** 677-685.

Lahiri, S. and Futerman, A.H. 2007. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci* **64:** 2270-2284.

Lammering, G., Hewit, T.H., Valerie, K., Lin, P.S., Contessa, J.N., and Schmidt-Ullrich, R.K. 2003. Anti-erbB receptor strategy as a gene therapeutic intervention to improve radiotherapy in malignant human tumours. *Int J Radiat Biol* **79:** 561-568.

Lammering, G., Valerie, K., Lin, P.S., Mikkelsen, R.B., Contessa, J.N., Feden, J.P., Farnsworth, J., Dent, P., and Schmidt-Ullrich, R.K. 2001. Radiosensitization of malignant glioma cells through overexpression of dominant-negative epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* **7:** 682-690.

Lan, L., Nakajima, S., Oohata, Y., Takao, M., Okano, S., Masutani, M., Wilson, S.H., and Yasui, A. 2004. In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101:** 13738-13743.

Lantos, P.L., Vanderberg, S.R., and Kleihues, P. 1997. Tumors of the nervous system. In *Greenfield's neuropathology* (ed. Arnold), pp. 583-879, London.

Lartigau, E. 2008. Bases biologiques de la radiothérapie. In *Radiobiologie* (ed. Hermann/Médecine), pp. 289-345. Tubiana, M., Paris.

Lee, Y.J., Soh, J.W., Dean, N.M., Cho, C.K., Kim, T.H., Lee, S.J., and Lee, Y.S. 2002. Protein kinase Cdelta overexpression enhances radiation sensitivity via extracellular regulated protein kinase 1/2 activation, abolishing the radiation-induced G(2)-M arrest. *Cell Growth Differ* **13:** 237-246.

Lehnert, S. 2008a. Modulation of Radiation Response via Signal Transduction Pathways. In *Biomolecular action of ionizing radiation* (ed. T.F. Group), pp. 251-278, New York.

Lehnert, S. 2008b. Radiation-Induced Apoptosis. In *Biomolecular action of ionizing radiation* (ed. T.F. Group), pp. 279-305, New York.

Lehnert, S. 2008c. Repair of Radiation Damage to DNA. In *Biomolecular action of ionizing radiation* (ed. T.F. Group), pp. 141-174, New York.

Leibeling, D., Laspe, P., and Emmert, S. 2006. Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Histol* **37:** 225-238.

Letai, A.G. 2008. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat Rev Cancer* **8:** 121-132.

Li, J. and Yuan, J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* **27:** 6194-6206.

Li, Y., Tennekoon, G.I., Birnbaum, M., Marchionni, M.A., and Rutkowski, J.L. 2001. Neuregulin signaling through a PI3K/Akt/Bad pathway in Schwann cell survival. *Mol Cell Neurosci* **17:** 761-767.

Lichtor, T., Dohrmann, G.J., and Gurney, M.E. 1990. Cytokine gene expression by human gliomas. *Neurosurgery* **26:** 788-792; discussion 792-783.

Lin, H., Bondy, M.L., Langford, L.A., Hess, K.R., Delclos, G.L., Wu, X., Chan, W., Pershouse, M.A., Yung, W.K., and Steck, P.A. 1998. Allelic deletion analyses of MMAC/PTEN and DMBT1 loci in gliomas: relationship to prognostic significance. *Clin Cancer Res* **4:** 2447-2454.

Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., and Yu, J.S. 2006. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* **5:** 67.

Loeffler, S., Fayard, B., Weis, J., and Weissenberger, J. 2005. Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int J Cancer* **115:** 202-213.

Lomeña, F. 2008. Non-oncological positron emission tomography (PET): Brain imaging. *Médecine Nucléaire* **32:** 502-510.

Lopez, C.A., Feng, F.Y., Herman, J.M., Nyati, M.K., Lawrence, T.S., and Ljungman, M. 2007. Phenylbutyrate sensitizes human glioblastoma cells lacking wild-type p53 function to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **69:** 214-220.

Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. 2004. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* **3:** 997-1007.

MacFarlane, M. 2003. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett* **139:** 89-97.

Mahalingam, D., Szegezdi, E., Keane, M., Jong, S.D., and Samali, A. 2008. TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treat Rev*.

Maintz, D., Fiedler, K., Koopmann, J., Rollbrocker, B., Nechev, S., Lenartz, D., Stangl, A.P., Louis, D.N., Schramm, J., Wiestler, O.D. et al. 1997. Molecular genetic evidence for subtypes of oligoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **56:** 1098-1104.

Majno, G. and Joris, I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* **146:** 3-15.

Malaise, E.P., Charbit, A., Chavaudra, N., Combes, P.F., Douchez, J., and Tubiana, M. 1972. Change in volume of irradiated human metastases. Investigation of repair of sublethal damage and tumour repopulation. *Br J Cancer* **26:** 43-52.

Malanga, M. and Althaus, F.R. 2005. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network. *Biochem Cell Biol* **83:** 354-364.

Malkin, D. and Friend, S.H. 1992. The role of tumour suppressor genes in familial cancer. *Semin Cancer Biol* **3:** 121-130.

Manning, B.D. and Cantley, L.C. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129:** 1261-1274.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23:** 549-555.

Memmott, R.M. and Dennis, P.A. 2009. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal* **21:** 656-664.

Michels, J., Johnson, P.W., and Packham, G. 2005. Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol* **37:** 267-271.

Minder, C.E. and Pfluger, D.H. 2001. Leukemia, brain tumors, and exposure to extremely low frequency electromagnetic fields in Swiss railway employees. *Am J Epidemiol* **153:** 825-835.

Mishina, Y., Lee, C.H., and He, C. 2004. Interaction of human and bacterial AlkB proteins with DNA as probed through chemical cross-linking studies. *Nucleic Acids Res* **32:** 1548-1554.

Mittler, M.A., Walters, B.C., and Stopa, E.G. 1996. Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. *J Neurosurg* **85:** 1091-1094.

Miwa, H., Kanno, H., Munakata, S., Akano, Y., Taniwaki, M., and Aozasa, K. 2000. Induction of chromosomal aberrations and growth-transformation of lymphoblastoid cell lines by inhibition of reactive oxygen species-induced apoptosis with interleukin-6. *Lab Invest* **80:** 725-734.

Miyagami, M., Tazoe, M., and Nakamura, S. 1998. Expression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in association with neovascularization in human malignant gliomas. *Brain Tumor Pathol* **15:** 95-100.

Miyamoto, Y., Hosotani, R., Doi, R., Wada, M., Ida, J., Tsuji, S., Kawaguchi, M., Nakajima, S., Kobayashi, H., Masui, T. et al. 2001. Interleukin-6 inhibits radiation induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* **21:** 2449-2456.

Mladkova, N. and Chakravarti, A. 2009. Molecular profiling in glioblastoma: prelude to personalized treatment. *Curr Oncol Rep* **11:** 53-61.

Morales, A., Lee, H., Goni, F.M., Kolesnick, R., and Fernandez-Checa, J.C. 2007. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis* **12:** 923-939.

Morest, D.K. and Silver, J. 2003. Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia* **43:** 6-18.

Moscatello, D.K., Montgomery, R.B., Sundareshan, P., McDanel, H., Wong, M.Y., and Wong, A.J. 1996. Transformational and altered signal transduction by a naturally occurring mutant EGF receptor. *Oncogene* **13:** 85-96.

Muller, K. and Meineke, V. 2007. Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. *Exp Hematol* **35:** 96-104.

Murphy, G.M., Jr., Lee, Y.L., Jia, X.C., Yu, A.C., Majewska, A., Song, Y., Schmidt, K., and Eng, L.F. 1995. Tumor necrosis factor-alpha and basic fibroblast growth factor decrease glial fibrillary acidic protein and its encoding mRNA in astrocyte cultures and glioblastoma cells. *J Neurochem* **65:** 2716-2724.

Nakamura, J.L., Karlsson, A., Arvold, N.D., Gottschalk, A.R., Pieper, R.O., Stokoe, D., and Haas-Kogan, D.A. 2005. PKB/Akt mediates radiosensitization by the signaling inhibitor LY294002 in human malignant gliomas. *J Neurooncol* **71:** 215-222.

Nakamura, M., Watanabe, T., Klangby, U., Asker, C., Wiman, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. 2001. p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* **11:** 159-168.

Newcomb, E.W., Cohen, H., Lee, S.R., Bhalla, S.K., Bloom, J., Hayes, R.L., and Miller, D.C. 1998. Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol* **8:** 655-667.

Nicholson, K.M. and Anderson, N.G. 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* **14:** 381-395.

Niu, G., Wright, K.L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., Zhang, S., Wang, T., Sinibaldi, D., Coppola, D. et al. 2002. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* **21:** 2000-2008.

Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., and Weinert, T.A. 2002. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* **36:** 617-656.

O'Neill, D.W., Adams, S., and Bhardwaj, N. 2004. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood* **104:** 2235-2246.

Ohgaki, H. and Kleihues, P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* **170:** 1445-1453.

Omuro, A.M., Faivre, S., and Raymond, E. 2007. Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas. *Mol Cancer Ther* **6:** 1909-1919.

Ory, S. and Morrison, D.K. 2004. Signal transduction: implications for Ras-dependent ERK signaling. *Curr Biol* **14:** R277-278.

Philippon, J. 2004. Physiopathologie des tumeurs cérébrales. In *Tumeurs cérébrales : du diagnostic au traitement* (ed. Masson). Philippon, J., Paris.

Pontvert, D., Gaboriaud, G., and Gouders, D. 2004. Radiothérapie des tumeurs cérébrales. In *Tumeurs cérébrales : du diagnostic au traitement* (ed. Masson), pp. 79-91. Philippon, J., Paris.

Pouyssegur, J., Dayan, F., and Mazure, N.M. 2006. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **441:** 437-443.

Quanz, M., Berthault, N., Roulin, C., Roy, M., Herbette, A., Agrario, C., Alberti, C., Josserand, V., Coll, J.L., Sastre-Garau, X. et al. 2009. Small-molecule drugs mimicking DNA damage: a new strategy for sensitizing tumors to radiotherapy. *Clin Cancer Res* **15:** 1308-1316.

Rahaman, S.O., Harbor, P.C., Chernova, O., Barnett, G.H., Vogelbaum, M.A., and Haque, S.J. 2002. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene* **21:** 8404-8413.

Ram, R., Uziel, O., Eldan, O., Fenig, E., Beery, E., Lichtenberg, S., Nordenberg, Y., and Lahav, M. 2009. Ionizing radiation up-regulates telomerase activity in cancer cell lines by post-translational mechanism via ras/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Clin Cancer Res* **15:** 914-923.

Rasola, A. and Bernardi, P. 2007. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* **12:** 815-833.

Reich, N.C. and Liu, L. 2006. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* **6:** 602-612.

Reifenberger, G., Liu, L., Ichimura, K., Schmidt, E.E., and Collins, V.P. 1993. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* **53:** 2736-2739.

Reifenberger, J., Reifenberger, G., Liu, L., James, C.D., Wechsler, W., and Collins, V.P. 1994. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* **145:** 1175-1190.

Reifenberger, J., Ring, G.U., Gies, U., Cobbers, L., Oberstrass, J., An, H.X., Niederacher, D., Wechsler, W., and Reifenberger, G. 1996. Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol* **55:** 822-831.

Repovic, P., Fears, C.Y., Gladson, C.L., and Benveniste, E.N. 2003. Oncostatin-M induction of vascular endothelial growth factor expression in astroglioma cells. *Oncogene* **22:** 8117-8124.

Robledo, O., Fourcin, M., Chevalier, S., Guillet, C., Auguste, P., Pouplard-Barthelaix, A., Pennica, D., and Gascan, H. 1997. Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *J Biol Chem* **272:** 4855-4863.

Rolhion, C., Penault-Llorca, F., Kemeny, J.L., Lemaire, J.J., Jullien, C., Labit-Bouvier, C., Finat-Duclos, F., and Verrelle, P. 2001. Interleukin-6 overexpression as a marker of malignancy in human gliomas. *J Neurosurg* **94:** 97-101.

Ruano, Y., Mollejo, M., Camacho, F.I., Rodriguez de Lope, A., Fiano, C., Ribalta, T., Martinez, P., Hernandez-Moneo, J.L., and Melendez, B. 2008. Identification of survival-related genes of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma multiforme. *Cancer* **112:** 1575-1584.

Russell, J.S., Raju, U., Gumin, G.J., Lang, F.F., Wilson, D.R., Huet, T., and Tofilon, P.J. 2002. Inhibition of radiation-induced nuclear factor-kappaB activation by an anti-Ras single-chain antibody fragment: lack of involvement in radiosensitization. *Cancer Res* **62:** 2318-2326.

Russo, A.L., Kwon, H.C., Burgan, W.E., Carter, D., Beam, K., Weizheng, X., Zhang, J., Slusher, B.S., Chakravarti, A., Tofilon, P.J. et al. 2009. In vitro and in vivo radiosensitization of glioblastoma cells by the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor E7016. *Clin Cancer Res* **15:** 607-612.

Ruvolo, P.P. 2003. Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res* **47:** 383-392.

Saigusa, K., Hashimoto, N., Tsuda, H., Yokoi, S., Maruno, M., Yoshimine, T., Aoyagi, M., Ohno, K., Imoto, I., and Inazawa, J. 2005. Overexpressed Skp2 within 5p amplification detected by array-based comparative genomic hybridization is associated with poor prognosis of glioblastomas. *Cancer Sci* **96:** 676-683.

Sakaguchi, K., Ishibashi, T., Uchiyama, Y., and Iwabata, K. 2009. The multi-replication protein A (RPA) system--a new perspective. *FEBS J* **276:** 943-963.

Sanson, M. 1996. Gliomes familiaux. In *Biologie des tumeurs cérébrales gliales* (ed. A.E.E. 34), pp. 77-87, Montpellier.

Sanson, M., Thillet, J., and Hoang-Xuan, K. 2004. Molecular changes in gliomas. *Curr Opin Oncol* **16:** 607-613.

Santhanam, U., Ray, A., and Sehgal, P.B. 1991. Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88:** 7605-7609.

Sasaki, H., Zlatescu, M.C., Betensky, R.A., Ino, Y., Cairncross, J.G., and Louis, D.N. 2001. PTEN is a target of chromosome 10q loss in anaplastic oligodendrogliomas and PTEN alterations are associated with poor prognosis. *Am J Pathol* **159:** 359-367.

Schaefer, L.K., Ren, Z., Fuller, G.N., and Schaefer, T.S. 2002. Constitutive activation of Stat3alpha in brain tumors: localization to tumor endothelial cells and activation by the endothelial tyrosine kinase receptor (VEGFR-2). *Oncogene* **21:** 2058-2065.

Schmidt-Ullrich, R.K., Contessa, J.N., Lammering, G., Amorino, G., and Lin, P.S. 2003. ERBB receptor tyrosine kinases and cellular radiation responses. *Oncogene* **22:** 5855-5865.

Schmidt-Ullrich, R.K., Valerie, K., Fogleman, P.B., and Walters, J. 1996. Radiation-induced autophosphorylation of epidermal growth factor receptor in human malignant mammary and squamous epithelial cells. *Radiat Res* **145:** 81-85.

Schmidt, M.C., Antweiler, S., Urban, N., Mueller, W., Kuklik, A., Meyer-Puttlitz, B., Wiestler, O.D., Louis, D.N., Fimmers, R., and von Deimling, A. 2002. Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* **61:** 321-328.

Schuurbiers, O.C., Kaanders, J.H., van der Heijden, H.F., Dekhuijzen, R.P., Oyen, W.J., and Bussink, J. 2009. The PI3-K/AKT-pathway and radiation resistance mechanisms in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **4:** 761-767.

Schwartz, D.L., Powis, G., Thitai-Kumar, A., He, Y., Bankson, J., Williams, R., Lemos, R., Oh, J., Volgin, A., Soghomonyan, S. et al. 2009. The selective hypoxia inducible factor-1 inhibitor PX-478 provides in vivo radiosensitization through tumor stromal effects. *Mol Cancer Ther* **8:** 947-958.

Senaldi, G., Varnum, B.C., Sarmiento, U., Starnes, C., Lile, J., Scully, S., Guo, J., Elliott, G., McNinch, J., Shaklee, C.L. et al. 1999. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96:** 11458-11463.

Shapiro, W.R. and Shapiro, J.R. 2006. A changing paradigm of glioma biology. *Hematol Oncol Clin North Am* **20:** 1171-1191.

Shinohara, E.T., Cao, C., Niermann, K., Mu, Y., Zeng, F., Hallahan, D.E., and Lu, B. 2005. Enhanced radiation damage of tumor vasculature by mTOR inhibitors. *Oncogene* **24:** 5414-5422.

Sinclair, W.K. and Morton, R.A. 1966. X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells. *Radiat Res* **29:** 450-474.

Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63:** 5821-5828.

Siskind, L.J., Kolesnick, R.N., and Colombini, M. 2002. Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J Biol Chem* **277:** 26796-26803.

Siskind, L.J., Kolesnick, R.N., and Colombini, M. 2006. Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion* **6:** 118-125.

Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., and Breakefield, X.O. 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* **10:** 1470-1476.

Smith, J.S., Tachibana, I., Pohl, U., Lee, H.K., Thanarajasingam, U., Portier, B.P., Ueki, K., Ramaswamy, S., Billings, S.J., Mohrenweiser, H.W. et al. 2000. A transcript map of the chromosome 19q-arm glioma tumor suppressor region. *Genomics* **64:** 44-50.

Snyder, H., Robinson, K., Shah, D., Brennan, R., and Handrigan, M. 1993. Signs and symptoms of patients with brain tumors presenting to the emergency department. *J Emerg Med* **11:** 253-258.

Sonoda, Y., Kanamori, M., Deen, D.F., Cheng, S.Y., Berger, M.S., and Pieper, R.O. 2003. Overexpression of vascular endothelial growth factor isoforms drives oxygenation and growth but not progression to glioblastoma multiforme in a human model of gliomagenesis. *Cancer Res* **63:** 1962-1968.

Sonoda, Y., Ozawa, T., Aldape, K.D., Deen, D.F., Berger, M.S., and Pieper, R.O. 2001. Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res* **61:** 6674-6678.

Srivastava, S., Zou, Z.Q., Pirollo, K., Blattner, W., and Chang, E.H. 1990. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* **348:** 747-749.

Stea, B., Falsey, R., Kislin, K., Patel, J., Glanzberg, H., Carey, S., Ambrad, A.A., Meuillet, E.J., and Martinez, J.D. 2003. Time and dose-dependent radiosensitization of the glioblastoma multiforme U251 cells by the EGF receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa'). *Cancer Lett* **202:** 43-51.

Stiles, C.D. and Rowitch, D.H. 2008. Glioma stem cells: a midterm exam. *Neuron* **58:** 832-846.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U. et al. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352:** 987-996.

Sugawa, N., Ekstrand, A.J., James, C.D., and Collins, V.P. 1990. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87:** 8602-8606.

Suzuki, T., Maruno, M., Wada, K., Kagawa, N., Fujimoto, Y., Hashimoto, N., Izumoto, S., and Yoshimine, T. 2004. Genetic analysis of human glioblastomas using a genomic microarray system. *Brain Tumor Pathol* **21:** 27-34.

Taher, M.M., Hershey, C.M., Oakley, J.D., and Valerie, K. 2000. Role of the p38 and MEK-1/2/p42/44 MAP kinase pathways in the differential activation of human immunodeficiency virus gene expression by ultraviolet and ionizing radiation. *Photochem Photobiol* **71:** 455-459.

Tchirkov, A., Rolhion, C., Bertrand, S., Dore, J.F., Dubost, J.J., and Verrelle, P. 2001. IL-6 gene amplification and expression in human glioblastomas. *Br J Cancer* **85:** 518-522.

Terasima, T. and Tolmach, L.J. 1963. Variations in several responses of HeLa cells to x-irradiation during the division cycle. *Biophys J* **3:** 11-33.

Tohma, Y., Gratas, C., Biernat, W., Peraud, A., Fukuda, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. 1998. PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **57:** 684-689.

Toulany, M., Kasten-Pisula, U., Brammer, I., Wang, S., Chen, J., Dittmann, K., Baumann, M., Dikomey, E., and Rodemann, H.P. 2006. Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair. *Clin Cancer Res* **12:** 4119-4126.

Tsuboi, Y., Kurimoto, M., Nagai, S., Hayakawa, Y., Kamiyama, H., Hayashi, N., Kitajima, I., and Endo, S. 2009. Induction of autophagic cell death and radiosensitization by the pharmacological inhibition of nuclear factor-kappa B activation in human glioma cell lines. *J Neurosurg* **110:** 594-604.

Tubiana, M., Frindel, E., and Malaise, E. 1968. The application of radiobiologic knowledge and cellular kinetics to radiation therapy. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* **102:** 822-830.

Ueki, K., Ono, Y., Henson, J.W., Efird, J.T., von Deimling, A., and Louis, D.N. 1996. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* **56:** 150-153.

Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., and Zhivotovsky, B. 2008. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* **15:** 1153-1162.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160:** 1-40.

Vallat, A.V., Poirier, J., Gray, F., and Chatel, M. 1997. Tumeurs du système nerveux central. Classifications histologiques et topographiques, épidémiologie. In *Neurologie* (ed. P. Encycl Méd Chir (Elsevier).

Vallières, L. and Rivest, S. 2000. L'interleukine-6 dans le système nerveux central. *Médecine/Sciences* **16:** 936-944.

Van Ginderachter, J.A., Movahedi, K., Hassanzadeh Ghassabeh, G., Meerschaut, S., Beschin, A., Raes, G., and De Baetselier, P. 2006. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* **211:** 487-501.

van Loo, G., Saelens, X., van Gurp, M., MacFarlane, M., Martin, S.J., and Vandenabeele, P. 2002. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* **9:** 1031-1042.

Van Meir, E., Sawamura, Y., Diserens, A.C., Hamou, M.F., and de Tribolet, N. 1990. Human glioblastoma cells release interleukin 6 in vivo and in vitro. *Cancer Res* **50:** 6683-6688.

Van Snick, J. 1990. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* **8:** 253-278.

Verrelle, P. and Bourhis, J. 1997. [Modulation of cellular response to ionizing radiation: towards new molecular targets?]. *Cancer Radiother* **1:** 484-493.

Vidakovic, M., Poznanovic, G., and Bode, J. 2005. DNA break repair: refined rules of an already complicated game. *Biochem Cell Biol* **83:** 365-373.

Vit, J.P. and Rosselli, F. 2003. Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis. *Oncogene* **22:** 8645-8652.

von Deimling, A., Bender, B., Jahnke, R., Waha, A., Kraus, J., Albrecht, S., Wellenreuther, R., Fassbender, F., Nagel, J., Menon, A.G. et al. 1994. Loci associated with malignant progression in astrocytomas: a candidate on chromosome 19q. *Cancer Res* **54:** 1397-1401**.**

Walker, M.D., Green, S.B., Byar, D.P., Alexander, E., Jr., Batzdorf, U., Brooks, W.H., Hunt, W.E., MacCarty, C.S., Mahaley, M.S., Jr., Mealey, J., Jr. et al. 1980. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* **303:** 1323-1329.

Walker, M.D., Strike, T.A., and Sheline, G.E. 1979. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **5:** 1725-1731.

Wang, C.C., Liao, Y.P., Mischel, P.S., Iwamoto, K.S., Cacalano, N.A., and McBride, W.H. 2006. HDJ-2 as a target for radiosensitization of glioblastoma multiforme cells by the farnesyltransferase inhibitor R115777 and the role of the p53/p21 pathway. *Cancer Res* **66:** 6756-6762.

Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92:** 5510-5514.

Wang, H., Zhang, W., Huang, H.J., Liao, W.S., and Fuller, G.N. 2004. Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Lab Invest* **84:** 941-951.

Ward, J.F. 1988. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **35:** 95-125.

Ward, L.D., Howlett, G.J., Discolo, G., Yasukawa, K., Hammacher, A., Moritz, R.L., and Simpson, R.J. 1994. High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *J Biol Chem* **269:** 23286-23289.

Watanabe, K., Tachibana, O., Sata, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. 1996. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* **6:** 217-223; discussion 223-214.

Watters, J.J., Schartner, J.M., and Badie, B. 2005. Microglia function in brain tumors. *J Neurosci Res* **81:** 447-455.

Weinberg, R. 2007a. Cytoplasmic Signaling Circuitry Programs Many of the Traits of Cancer. In *The Biology of Cancer* (ed. G. Science), pp. p159-208, Portland.

Weinberg, R. 2007b. P53 and Apoptosis : Master Gauradian and Executioner. In *The Biology of Cancer* (ed. G. Science), pp. p307-356, Portland.

Weindel, K., Moringlane, J.R., Marme, D., and Weich, H.A. 1994. Detection and quantification of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in brain tumor tissue and cyst fluid: the key to angiogenesis? *Neurosurgery* **35:** 439-448; discussion 448-439.

Wen, P.Y. and Kesari, S. 2008. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* **359:** 492-507.

Weterings, E. and Chen, D.J. 2008. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* **18:** 114-124.

Woiciechowsky, C., Asadullah, K., Nestler, D., Glockner, F., Robinson, P.N., Volk, H.D., Vogel, S., and Lanksch, W.R. 1997. Different release of cytokines into the cerebrospinal fluid following surgery for intra- and extra-axial brain tumours. *Acta Neurochir (Wien)* **139:** 619-624.

Yamanaka, R., Tanaka, R., and Yoshida, S. 1993. Effects of irradiation on cytokine production in glioma cell lines. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **33:** 744-748.

Yang, J.Y., Xia, W., and Hu, M.C. 2006. Ionizing radiation activates expression of FOXO3a, Fas ligand, and Bim, and induces cell apoptosis. *Int J Oncol* **29:** 643-648.

Yasukawa, K., Hirano, T., Watanabe, Y., Muratani, K., Matsuda, T., Nakai, S., and Kishimoto, T. 1987. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J* **6:** 2939-2945.

Zhang, Y., Zhang, N., Dai, B., Liu, M., Sawaya, R., Xie, K., and Huang, S. 2008. FoxM1B transcriptionally regulates vascular endothelial growth factor expression and promotes the angiogenesis and growth of glioma cells. *Cancer Res* **68:** 8733-8742.

Zhang, Z., Wang, H., Prasad, G., Li, M., Yu, D., Bonner, J.A., Agrawal, S., and Zhang, R. 2004. Radiosensitization by antisense anti-MDM2 mixed-backbone oligonucleotide in in vitro and in vivo human cancer models. *Clin Cancer Res* **10:** 1263-1273.

Zheng, M., Morgan-Lappe, S.E., Yang, J., Bockbrader, K.M., Pamarthy, D., Thomas, D., Fesik, S.W., and Sun, Y. 2008. Growth inhibition and radiosensitization of glioblastoma and lung cancer cells by small interfering RNA silencing of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Cancer Res* **68:** 7570-7578.

Zhou, F.X., Liao, Z.K., Dai, J., Xiong, J., Xie, C.H., Luo, Z.G., Liu, S.Q., and Zhou, Y.F. 2007. Radiosensitization effect of zidovudine on human malignant glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **354:** 351-356.

Zhou, X.P., Li, Y.J., Hoang-Xuan, K., Laurent-Puig, P., Mokhtari, K., Longy, M., Sanson, M., Delattre, J.Y., Thomas, G., and Hamelin, R. 1999. Mutational analysis of the PTEN gene in gliomas: molecular and pathological correlations. *Int J Cancer* **84:** 150-154.