

# Instabilité du phénotype cellulaire et cellules initiateuses des gliomes

Marie-Pierre Junier<sup>1,2</sup> et Ariane Sharif<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Inserm, UMR894, Équipe Plasticité gliale, Université Paris V, 75006 Paris, France

<sup>2</sup> Hôpital Sainte-Anne, Département de Neuropathologie, 75014 Paris, France

<sup>3</sup> Inserm, Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, U837, Développement et Plasticité du Cerveau Postnatal, Université de Lille 2, IMPRT, Lille, France

Auteur correspondant : Marie-Pierre Junier, [marie-pierre.junier@inserm.fr](mailto:marie-pierre.junier@inserm.fr)

Reçu le 4 octobre 2010

**Résumé** – Les gliomes sont les plus fréquents des cancers primitifs du système nerveux central. L'identité des cellules dont ils dérivent demeure inconnue faute d'accès à un état pré-néoplasique. Le TGF $\alpha$  (*Transforming Growth Factor alpha*), un membre de la famille de l'EGF, est fréquemment surexprimé dès les gliomes de bas grade. Nous avons donc recherché si le TGF $\alpha$  pouvait exercer des effets tumorigènes sur les astrocytes en agissant sur la stabilité de leur phénotype. À l'aide de cultures d'astrocytes murins, dépourvues de progéniteurs et de cellules souches neurales résiduelles, nous avons démontré qu'un traitement de plusieurs jours par le TGF $\alpha$  induit la régression progressive et fonctionnelle d'une population d'astrocytes en neuroprogéniteurs. Cette régression ne s'accompagne d'aucun signe de transformation cancéreuse. Cependant, lorsque ces astrocytes dé-différenciés par le TGF $\alpha$  sont soumis à un stress oncogénique par irradiation gamma, ils acquièrent des propriétés cancéreuses, formant des tumeurs similaires à des gliomes de haut grade quand ils sont greffés dans le cerveau de souris immunodéprimées. L'irradiation gamma est par contre sans effet sur les astrocytes non exposés au TGF $\alpha$ . Ces résultats suggèrent que la plupart des gliomes contiennent des cellules tumorales possédant des propriétés de cellules souches (TSC). L'étude de 55 tumeurs cérébrales pédiatriques montre que des cellules tumorales possédant des propriétés de progéniteur ou de cellule souche neurale peuvent être isolées de la majorité des gliomes. L'analyse de survie des patients révèle une association positive entre l'isolement de TSC aux capacités d'auto-renouvellement prolongées et un taux plus élevé de mortalité.

**Mots clés** : EGFR / transdifférenciation / glie radiaire / erbB / gliome

**Abstract** – Instability of cell phenotype and tumor initiating cells in gliomas.

Gliomas, the most frequent primitive CNS tumors, have been suggested to originate from astrocytes or from neural progenitors/stem cells. However, the precise identity of the cells at the origin of gliomas remains a matter of debate because no pre-neoplastic state has been yet identified. TGF $\alpha$ , an EGF family member, is frequently over-expressed in the early stages of glioma progression. We questioned whether prolonged TGF $\alpha$  exposure affects the stability of the normal mature astrocyte phenotype and, eventually, their propensity to cancerous transformation. Using mouse astrocyte cultures devoid of residual neural stem cells or progenitors, we demonstrate that several days of TGF $\alpha$ -treatment result in the functional conversion of a population of mature astrocytes into radial glial cells, a population of neural progenitors, without any accompanying sign of cancerous transformation. In contrast, when astrocytes de-differentiated with TGF $\alpha$  were submitted to oncogenic stress using gamma irradiation, they acquired cancerous properties, forming high-grade glioma-like tumors after brain

**grafting. Gamma irradiation was without effect on astrocytes which were not treated with TGF $\alpha$ . These results suggested that most gliomas should contain tumor cells with stem-like properties (TSCs). Our study of 55 pediatric brain tumors show that tumor cells with stem cell-like or progenitor-like properties can be isolated from a majority of gliomas. Survival analysis showed an association between isolation of TSCs with extended self-renewal capabilities and a patient's higher mortality rate.**

**Key words:** EGFR / transdifferentiation / radial glia / erbB / glioma

Les tumeurs gliales, ou gliomes, sont les plus fréquentes des tumeurs primitives du système nerveux central (SNC). Elles sont très hétérogènes et le pronostic de leurs formes de haut grade demeure mauvais en dépit du développement de nouveaux traitements fondés sur l'alkylation de l'ADN et le blocage de la néo-angiogenèse. Les évolutions cliniques différentes de patients souffrant de gliomes apparemment similaires sur le plan histologique, associées à la nature invasive des gliomes malins limitent encore le développement de traitements curatifs.

L'identité des cellules à l'origine des gliomes demeure inconnue en raison de l'absence d'identification d'états pré-néoplasiques (Collins, 2004). L'observation de similarités morphologiques et immunohistochimiques entre les cellules tumorales des gliomes et des cellules macrogliales du SNC a d'abord conduit à considérer les astrocytes ou les oligodendrocytes comme les cellules mères des gliomes (Collins, 2004). Inversement, la coexistence au sein de la même tumeur de cellules aux phénotypes variés et l'isolement à partir des gliomes de haut grade de cellules tumorales possédant des propriétés de cellules souches (Galli *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004b) désigneraient plutôt les cellules souches neurales ou les progéniteurs comme sources cellulaires des gliomes. Le développement fréquent de gliomes à proximité de la zone sous-ventriculaire, un réservoir de cellules souches neurales aux fortes capacités migratoires chez l'adulte (Sanai *et al.*, 2005), est également en faveur de cette hypothèse. Néanmoins, les modèles expérimentaux développés chez la souris montrent que la transformation cancéreuse peut être achevée grâce à l'introduction d'oncogènes *via* des rétrovirus, non seulement dans des cellules souches neurales ou des progéniteurs exprimant la nestine, mais aussi dans des cellules considérées comme différenciées car exprimant un marqueur usuel des astrocytes, la GFAP. La probabilité de la transformation cancéreuse est toutefois plus grande pour les cellules immatures (Shih & Holland, 2004).

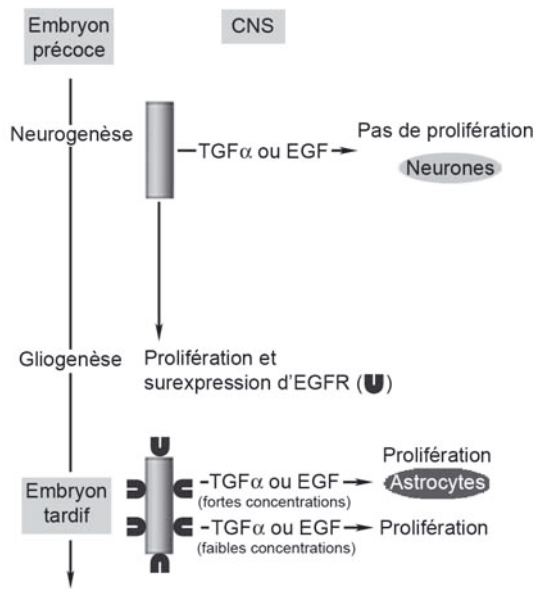
Considérées dans leur ensemble, ces données permettent d'envisager que les gliomes résultent non seulement d'altérations de la régulation du cycle et de la survie cellulaires mais aussi d'altérations dans le stade de différenciation des cellules matures, comme

cela a été proposé pour certains cancers épithéliaux (Harris, 2004).

Nous avons évalué cette hypothèse *in vitro* en cherchant d'abord à déterminer s'il était possible de modifier le stade de différenciation d'astrocytes normaux en réponse à de simples modifications de leur environnement. Cette recherche a été menée *in vitro* grâce à la manipulation de la signalisation EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) par l'un des ligands de ce récepteur, le *Transforming Growth Factor  $\alpha$*  (TGF $\alpha$ ) (Anton *et al.*, 1997).

Le couple TGF $\alpha$ -EGFR exerce des actions pléiotropes sur les astrocytes en conditions normales et pathologiques (Junier, 2000; Sharif & Prévot, 2010). Au cours de la gliogenèse, le complexe formé par le TGF $\alpha$  et son récepteur agit à différentes étapes du parcours qui mène de la cellule souche neurale à l'astrocyte (figure 1) (Reynolds & Weiss 1996; Weiss *et al.*, 1996; Jonakait *et al.*, 1998; Gregg & Weiss, 2003). Aux stades tardifs du développement du cortex, la différenciation des progéniteurs en astrocytes est déterminée par l'augmentation des taux d'expression d'EGFR et la ségrégation de ce dernier dans la cellule fille qui donnera l'astrocyte (Lillien, 1995; Burrows *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2005). La réduction du nombre d'astrocytes chez les souris présentant des défauts d'expression de TGF $\alpha$  ou d'EGFR constitue un argument de poids en faveur d'une implication physiologique du complexe TGF $\alpha$ -EGFR dans la gliogenèse (Weickert & Blum, 1995; Kornblum *et al.*, 1998; Sibilina *et al.*, 1998). Chez l'adulte, la surexpression du TGF $\alpha$  induit des modifications morphologiques évoquant la morphologie réactive adoptée par les astrocytes en réponse à une blessure du SNC (Rabchevsky *et al.*, 1998; Liu & Neufeld, 2004).

Le couple TGF $\alpha$ -EGFR constitue par ailleurs le module de signalisation le plus fréquemment dérégulé dans les gliomes. La surexpression du ligand a été rapportée dans la majorité des gliomes de l'adulte de tout grade (75 %) et s'accompagne de celle de son récepteur dans les gliomes de haut grade (pour revue, voir Junier, 2000). Cette surexpression aboutit à la stimulation de la prolifération, la motilité et la survie des cellules tumorales, faisant ainsi du couple TGF $\alpha$ -EGFR une des boucles autocrines trophiques majeures des gliomes (Tang *et al.*, 1997; Wechsler-Reya



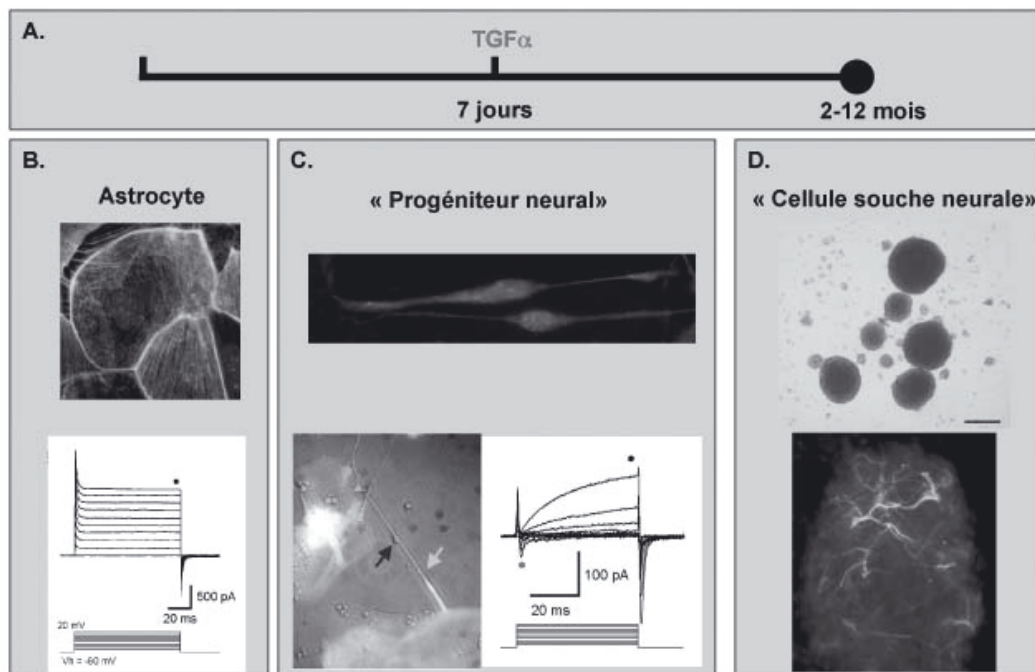
**Fig. 1.** De la cellule souche neurale à l'astrocyte : rôle de la signalisation EGFR. Cette représentation schématique reprend les données obtenues *in vivo* et *in vitro* sur les cellules souches neurales et les progéniteurs du cortex au cours du développement embryonnaire. Bien que la plupart des études résumées ici aient été menées avec le TGF $\alpha$ , ou aient démontré l'identité des effets exercés par le TGF $\alpha$  et l'EGF, certaines n'ont utilisé que l'EGF. Au cours du développement précoce, au moment de la neurogenèse, les progéniteurs (rectangles verticaux) expriment de faibles taux d'EGFR. Leur exposition au TGF $\alpha$  n'affecte pas leur prolifération mais favorise leur différenciation en neurones limbiques (Ferri & Levitt, 1995 ; Ferri *et al.*, 1996). Au fil de la maturation du SNC, les taux d'EGFR augmentent et rendent les progéniteurs sensibles aux effets mitogènes du TGF $\alpha$  et de l'EGF (Anchan *et al.*, 1991 ; Lillien & Cepko, 1992 ; Reynolds *et al.*, 1992 ; Burrows *et al.*, 1997). Ces effets mitogènes s'étendent aux progéniteurs de toutes les régions du SNC étudiées à ce jour, au moins *in vitro* (Santa-Olalla & Covarrubias, 1995 ; Jonakait *et al.*, 1998 ; Lillien & Wancio, 1998). Vers la fin de la période embryonnaire, au moment de la gliogenèse, le TGF $\alpha$  ou l'EGF, en sus de stimuler la prolifération des progéniteurs, induisent préférentiellement leur différenciation en astrocytes (Johe *et al.*, 1996 ; Burrows *et al.*, 1997 ; Lillien & Wancio, 1998 ; Kornblum *et al.*, 1999 ; Burrows *et al.*, 2000). La nature des effets exercés par TGF $\alpha$ /EGF sur les progéniteurs exprimant de forts taux de récepteurs dépend de la concentration de ligand. À faible concentration, le TGF $\alpha$  ou l'EGF n'affectent que la prolifération, alors qu'à forte concentration, ils favorisent préférentiellement une différenciation en phénotype astrocytaire (Lillien, 1995 ; Burrows *et al.*, 1997). La nature pléiotrope des effets exercés par TGF $\alpha$ /EGF souligne l'importance de mécanismes régulateurs, *via* les taux de récepteurs, de ligands et les interactions avec des molécules de l'environnement. Schéma établi d'après Temple (2001).

& Scott, 2001). Par ailleurs, l'activation soutenue de l'EGFR, en combinaison avec des mutations qui affectent le contrôle inhibiteur du cycle cellulaire, a également été impliquée dans la transformation tumorale des astrocytes (Bogler *et al.*, 1999 ; Bachoo *et al.*, 2002 ; Weiss *et al.*, 2002 ; Ding *et al.*, 2003). La seule surexpression du TGF $\alpha$  ou de l'EGFR ne suffit cependant pas à assurer la transformation cancéreuse des astrocytes chez les souris transgéniques (Rabchevsky *et al.*, 1998 ; Bachoo *et al.*, 2002). Ces données de la littérature et celles du champ de la cancérologie qui associent tumorigenèse et trouble de la différenciation nous ont conduits à déterminer dans quelle mesure la mise en jeu de la signalisation EGFR pouvait modifier le degré de maturité des astrocytes.

### Déstabilisation de l'état de différenciation des astrocytes par le TGF $\alpha$

Nous avons d'abord établi des cultures primaires d'astrocytes en milieu défini sans sérum à partir de cortex de souriceaux âgés de 1 à 10 jours. Les cultures étaient composées de 91 à 96 % de cellules exprimant la GFAP, un marqueur des astrocytes, les 9 à 4 % restants correspondant à des cellules microgliales identifiées par leur expression de CD11b. Deux études antérieures avaient détecté la présence à faible fréquence (0,1–10 %) de progéniteurs ou de cellules souches neurales résiduelles dans des cultures d'astrocytes maintenues en présence de sérum, grâce à leur capacité à croître sous la forme de sphères cellulaires flottantes, couramment appelées neurosphères (Laywell *et al.*, 2000 ; Imura *et al.*, 2003). Nous avons réalisé une série d'expériences de biologie cellulaire et d'immunocytochimie qui nous ont permis de vérifier que nos cultures, maintenues en milieu sans sérum et établies à partir de fragments de cortex disséqués à distance de la zone germinale où sont situés les corps cellulaires des progéniteurs neurales (Kriegstein & Gotz, 2003), étaient dépourvues de progéniteurs ou de cellules souches neurales résiduelles (Sharif *et al.*, 2007).

L'exposition prolongée d'astrocytes matures au TGF $\alpha$  induit leur régression en progéniteurs neurales de type cellules gliales radiaires (Sharif *et al.*, 2007). En une semaine de traitement au TGF $\alpha$ , les astrocytes acquièrent progressivement une forme bipolaire évoquant celle d'une population de progéniteurs présente au cours du développement : les cellules gliales radiaires (figure 2). Ces modifications morphologiques concernent la moitié des cellules de la culture ( $53 \pm 1,4$  %,  $n = 6$ ) et sont complètement réversibles par le sérum. Elles s'accompagnent de l'acquisition de l'expression des marqueurs moléculaires des cellules gliales radiaires BLBP/FABP7, Olig2 et RC2 ( $36,3 \pm 2,9$  % de cellules bipolaires immunoréactives pour RC2,  $n = 3$ , figure 2C) et surtout des



**Fig. 2.** Régession progressive et fonctionnelle sous l'action du TGF $\alpha$  d'une population d'astrocytes en cellules de type progéniteur neural en cellules de type cellule souche neurale. (A) Protocole de traitement prolongé des astrocytes au TGF $\alpha$ . Les astrocytes ont été cultivés en présence de TGF $\alpha$  pendant des périodes allant de 7 jours à un an. (B) Des astrocytes issus de cortex de souris âgées de 1 à 10 jours présentent une morphologie pavimenteuse caractéristique, ici visualisée après marquage du cytosquelette d'actine par la phalloïdine. L'enregistrement des propriétés électriques de ces cellules par des techniques de *patch-clamp* montre l'absence de courants dépendants du voltage. (C) Une semaine de traitement des astrocytes au TGF $\alpha$  induit leur régression en progéniteurs neuraux présentant les propriétés morphologiques et fonctionnelles des cellules gliales radiaires. En effet, les cellules traitées 7 jours au TGF $\alpha$  acquièrent une morphologie bipolaire, l'expression du marqueur RC2, la capacité à supporter la migration de neurones embryonnaires (flèche noire) le long de leurs prolongements (flèche blanche) et la capacité à se différencier en cellules présentant les propriétés électrophysiologiques de neuroblastes, telles que l'acquisition de courants dépendants du voltage. (D) La prolongation du traitement au TGF $\alpha$  sur plusieurs mois entraîne l'apparition de sphères de cellules flottantes qui possèdent les propriétés canoniques des cellules souches neurales (barre d'échelle = 200  $\mu$ m). Elles peuvent notamment donner naissance à des cellules exprimant le marqueur neuronal  $\beta$ III-tubuline. Les noyaux sont marqués au DAPI. D'après Sharif *et al.* (2007).

propriétés fonctionnelles de ces progéniteurs. En combinant des approches de biologie cellulaire, de *time-lapse* et d'électrophysiologie nous avons démontré que ces cellules permettent la migration des neurones embryonnaires et donnent naissance à des cellules ayant les propriétés électrophysiologiques de neuroblastes et exprimant les marqueurs neuronaux  $\beta$ III-tubuline et MAP-2. La prolongation du traitement au TGF $\alpha$  sur plusieurs mois entraîne l'apparition de sphères de cellules flottantes. Ces cellules se comportent comme des cellules souches neurales : elles s'auto-renouvellent, peuvent être dérivées de façon clonale à partir d'une seule cellule, possèdent un profil protéomique sur gel bidimensionnel similaire à celui de cellules souches neurales dérivées de cortex d'embryons de souris âgés de 12 jours (coefficient de corrélation = 0,74), et peuvent se différencier en

cellules des lignages neuronaux et astrocytaires. Les effets du TGF $\alpha$  dépendent de l'activation d'EGFR et de la mise en jeu concomitante des voies de signalisation gouvernées par RAS et PI3K/AKT. De façon remarquable, ces voies de transduction demeurent mobilisées tout au long du traitement bien que les astrocytes n'échappent pas à la répression classique de l'expression d'EGFR induite par son ligand.

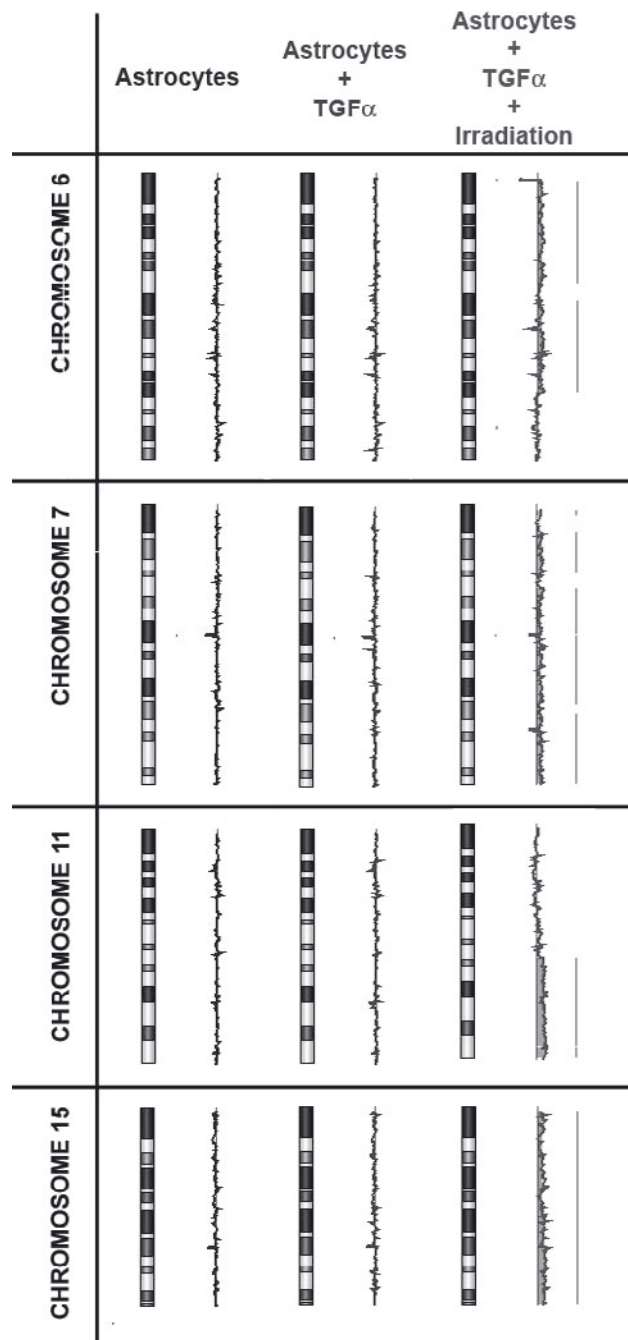
Ces résultats ont révélé une plasticité phénotypique remarquable d'une population d'astrocytes matures en réponse à un seul changement de leur environnement. Dans le contexte de la médecine régénérative, la capacité de cellules somatiques à régresser à un stade embryonnaire sans modification de leur patrimoine génétique mais en réponse à un simple signal extracellulaire présente un intérêt certain. Cet intérêt est renforcé par les travaux



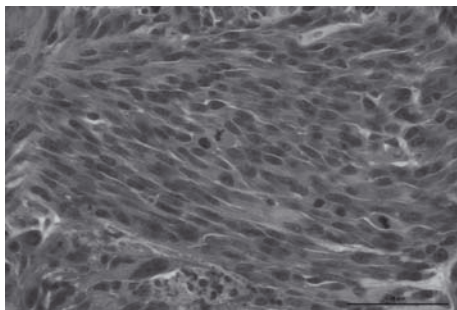
montrant que les astrocytes réactifs présents dans les lésions cérébrales surexpriment le TGF $\alpha$  (pour revue, voir Junier, 2000), et que certains astrocytes réactifs isolés de lésions cérébrales peuvent exprimer – au moins *in vitro* – des propriétés de cellules souches neurales (Buffo *et al.*, 2008).

Le TGF $\alpha$  est cependant connu avant tout pour ses propriétés oncogènes. L'exposition au TGF $\alpha$  de fibroblastes (Todaro *et al.*, 1980) ou de cellules épithéliales du rein (Watanabe *et al.*, 1987) et de la glande mammaire (Shankar *et al.*, 1989) aboutit à leur transformation cancéreuse. Des souris transgéniques surexprimant le TGF $\alpha$  développent tardivement dans leur vie des tumeurs malignes hépatiques et mammaires (Jhappan *et al.*, 1990; Matsui *et al.*, 1990; Sandgren *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1995). Mais la seule dérégulation de la signalisation EGFR, que ce soit *via* la surexpression d'un ligand du récepteur, la surexpression du récepteur ou même *via* l'expression d'une forme mutée constitutivement active du récepteur ne suffit pas à assurer la transformation des astrocytes, excepté lorsque ces cellules sont également porteuses de mutations dans des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur. Par exemple, les astrocytes dérivés de souris invalidées pour les gènes *TP53* ou *INK4a-ARF* (codant pour les protéines p16 et p19), qui sont immortels mais non tumorigènes, peuvent subir une transformation maligne quand ils sont traités avec l'EGF, l'analogue structural et fonctionnel du TGF $\alpha$  (Yahanda *et al.*, 1995; Bogler *et al.*, 1999; Bachoo *et al.*, 2002). Enfin, aucun signe de tumeur cérébrale maligne n'a été détecté chez des souris transgéniques surexprimant le TGF $\alpha$  (Rabchevsky *et al.*, 1998). De façon cohérente avec ces résultats, nous avons vérifié que l'exposition prolongée des astrocytes au TGF $\alpha$  n'induisait pas leur transformation cancéreuse. En effet, les profils génomiques des astrocytes traités ou non au TGF $\alpha$  étaient les mêmes (figure 3) et aucun signe clinique ou histologique de tumeurs n'a été observé chez des souris ayant reçu dans leur striatum un greffon d'astrocytes ayant régressé au stade de progéniteur ou de cellule souche neurale sous l'action du TGF $\alpha$ .

Ces résultats montrent donc que le couple TGF $\alpha$ -EGFR suffit à déclencher la dédifférenciation d'astrocytes normaux mais n'est pas capable d'induire leur transformation cancéreuse. Ces données, associées à l'observation fréquente d'une surexpression des ligands d'EGFR dans les gliomes de bas grade, nous a conduits à considérer l'hypothèse selon laquelle la capacité du TGF $\alpha$  à déstabiliser le phénotype des astrocytes participerait aux stades précoces de l'initiation du processus tumoral. L'exposition des astrocytes à un ligand d'EGFR permettrait d'assurer leur régression à un stade de progéniteur, plus sensible que la cellule différenciée à une agression oncogène.



**Fig. 3.** Exemple d'analyse comparative par CGH *array* du génome d'astrocytes maintenus en milieu défini (Astrocytes), après 7 jours de traitement au TGF $\alpha$  avant (Astrocytes + TGF $\alpha$ ) et après irradiation (Astrocytes + TGF $\alpha$  + Irradiation). Les astrocytes non irradiés présentaient les mêmes profils qu'ils aient ou non été exposés au TGF $\alpha$ . Les anomalies les plus marquantes observées dans les astrocytes traités au TGF $\alpha$  et irradiés correspondent à des gains au niveau des chromosomes 6, 7, 11 et 15.



**Fig. 4.** Illustration d'une tumeur sous-cutanée obtenue à partir de la greffe d'astrocytes traités au  $TGF\alpha$  et irradiés. La coloration hématoxyline-éosine met en évidence la morphologie en fuseau des cellules tumorales.

### Sensibilisation des astrocytes à la transformation tumorale par leur régression à un stade de progéniteur

Afin de déterminer si la régression des astrocytes à un stade de progéniteur neural les sensibilise à la transformation cancéreuse, nous avons utilisé un mutagène classique, l'irradiation gamma. Les résultats montrent que des gliomes peuvent se développer à partir d'astrocytes matures ayant régressé à un stade de progéniteur en réponse à un simple changement de leur environnement extracellulaire (Dufour *et al.*, 2009).

Nos résultats indiquent que les astrocytes survivent à une irradiation de 5 Grays qu'ils soient ou non préalablement traités au  $TGF\alpha$ , les cultures en milieu sans sérum d'astrocytes irradiés ou non présentant des survies identiques (4–6 semaines). Au contraire, l'irradiation d'astrocytes ayant régressé au stade de progéniteurs sous l'influence du  $TGF\alpha$  aboutit à leur immortalisation et à leur transformation cancéreuse. Les astrocytes traités au  $TGF\alpha$  et non irradiés survivent beaucoup plus longtemps que les astrocytes non traités à condition de les maintenir dans leur boîte d'origine (Sharif *et al.*, 2006). Ils ne supportent pas des repiquages successifs, montrant ainsi que le  $TGF\alpha$  n'assure pas leur immortalisation. Au contraire, les astrocytes traités au  $TGF\alpha$  et irradiés peuvent subir des repiquages successifs sur plusieurs mois, voire plusieurs années. Leur transformation cancéreuse a été établie par leur capacité à former des colonies en milieu semi-solide, l'anormalité de leur génome démontrée par puces CGH et surtout par leur capacité à induire chez des souris le développement de tumeurs extrêmement malignes et invasives après greffes sous-cutanées ou intracérébrales. Dans les deux types de greffe, les tumeurs avaient un aspect de glioblastome ou de gliosarcome (figure 4). La rapidité du développement tumoral *in vivo* (en deux à trois semaines) et la similarité des profils génomiques

des cellules avant et après leur greffe *in situ* indiquent que les propriétés cancéreuses des cellules sont intrinsèques, ne dépendant pas de l'acquisition d'altérations génomiques secondairement acquises *in vivo*.

L'exposition immédiate des astrocytes irradiés au  $TGF\alpha$  les tue au lieu de promouvoir leur transformation cancéreuse. Inversement, l'inhibition de l'activité d'EGFR au moment de l'irradiation dans les astrocytes dédifférenciés par le  $TGF\alpha$  n'empêche pas leur transformation. L'effet transformant du  $TGF\alpha$  n'est donc pas lié à un effet coopératif éventuel avec les aberrations génétiques induites par l'irradiation. De plus, l'absence d'anomalies génomiques des astrocytes traités au  $TGF\alpha$  avant toute irradiation montre que le  $TGF\alpha$  ne prédispose pas les cellules à la transformation cancéreuse *via* l'acquisition d'un stade aneuploïde. Le changement dans le stade de différenciation des astrocytes est donc un pré-requis (nécessaire et non suffisant) pour leur transformation cancéreuse.

L'ensemble de ces résultats montre que la régression des astrocytes à un stade de progéniteur les rend sensibles à un stress oncogénique (figure 5). Que cette sensibilisation soit de la même ampleur pour des progéniteurs « artificiels » et « normaux » reste à déterminer. Il est en effet envisageable qu'une modification du stade de différenciation de cellules matures s'accompagne d'états chromatiniens particuliers et/ou de voies de réparation de l'ADN et de voies apoptotiques inappropriées.

Les démonstrations expérimentales que des cellules gliales immatures provenant d'un processus de dédifférenciation (Dufour *et al.*, 2009) ou des cellules souches neurales et des progéniteurs (Dai & Holland, 2003; Sutter *et al.*, 2007) peuvent être la source de gliomes permettent d'envisager l'existence dans la plupart de ces néoplasmes d'une population de cellules tumorales possédant des propriétés de progéniteurs ou de cellules souches. Les recherches de biologie cellulaire et de génétique menées au cours des huit dernières années ont fourni de nombreuses données en faveur de l'existence d'une sous-population de cellules dans les tumeurs cérébrales qui se distingueraient des autres éléments de la tumeur par leurs propriétés souches et leur résistance particulière aux traitements courants (Bao *et al.*, 2006; Nakai *et al.*, 2009; Park & Rich, 2009). Ces cellules souches tumorales (CST) sont suspectées d'être les moteurs du développement tumoral et la source des résistances thérapeutiques observées. De telles cellules souches tumorales ont cependant été isolées avant tout à partir de tumeurs gliales de haut grade affectant des patients adultes, à savoir des glioblastomes (Ignatova *et al.*, 2002; Hemmati *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2003, 2004a; Galli *et al.*, 2004; Laks *et al.*, 2009) et des tumeurs glio-neurales malignes (Varlet *et al.*, 2004;

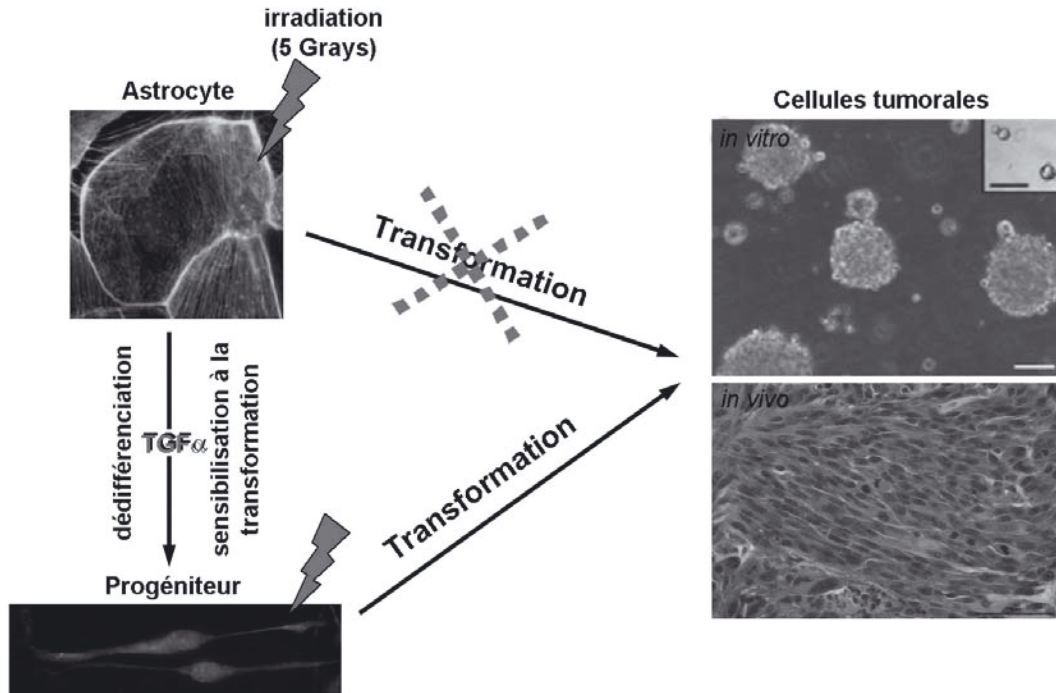


Fig. 5. La régression des astrocytes à un stade de progéniteur les sensibilise à un stress oncogénique.

Patru *et al.*, 2010). Les CST se développent sous la forme d'oncosphères (par analogie aux neurosphères pour les cellules souches neurales normales) en milieu défini contenant de l'EGF et du FGFb et s'auto-renouvellent. Deux types de CST ont été isolés : l'un qui comme les cellules souches neurales possède des propriétés d'auto-renouvellement étendues, l'autre qui, comme les progéniteurs neuraux ou les cellules d'amplification transitoire, a des capacités d'auto-renouvellement limitées. Par exemple, les CST isolées des médulloblastomes (Galli *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004a) diffèrent des CST isolées des glioblastomes par leur potentiel d'auto-renouvellement qui est plus proche de celui des progéniteurs que des cellules souches neurales (Vescovi *et al.*, 1999; Hemmati *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2003; Louis *et al.*, 2008). En accord avec ces données, l'étude de modèles murins de médulloblastomes a montré que les progéniteurs cérébelleux sont à l'origine de ces tumeurs embryonnaires de haut grade (Grimmer & Weiss, 2006). Les CST se caractérisent aussi par leur expression de nombreux marqueurs moléculaires de cellules souches neurales et de progéniteurs (Ignatova *et al.*, 2002; Galli *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004a; Yuan *et al.*, 2004), et leur capacité à former à la suite de xénogreffes des tumeurs d'aspect histologique similaire à celui de la tumeur d'origine (Galli *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2004; Patru *et al.*, 2010).

Les données concernant les tumeurs cérébrales de l'enfant sont beaucoup moins nombreuses que chez

l'adulte et les différences de propriétés pathophysiologiques entre ces deux groupes de patients limitent la possibilité d'extrapoler les données d'un groupe d'âge à l'autre (Bredel *et al.*, 1999; Kalifa & Grill, 2005; Nakamura *et al.*, 2007; Bax *et al.*, 2009). Chez l'enfant, des cellules tumorales présentant des propriétés de progéniteur ont été isolées à partir de médulloblastomes et d'épendymomes (Hemmati *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2005) et des CST ont été bien caractérisées dans quelques cas de gliomes de bas et haut grade (Hemmati *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2003).

Nous avons donc tenté de déterminer dans quelle mesure les CST sont un composant générique des tumeurs primaires du système nerveux central en réalisant une étude comparative sur un échantillon de 55 tumeurs cérébrales de l'enfant appartenant à diverses catégories histologiques de gliomes et présentant différents grades de malignité (Thirant *et al.*, sous presse). Les controverses actuelles entourant les critères définissant les CST (Beier *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2007; Platet *et al.*, 2007; Quintana *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Patru *et al.*, 2010), et le nombre limité de données sur les CST des tumeurs cérébrales pédiatriques, nous ont conduits à appliquer des protocoles d'isolement qui ne reposent pas sur la connaissance préalable de marqueurs de surface supposés spécifiques des CST (Hemmati *et al.*, 2003; Galli *et al.*, 2004). En effet, aucun consensus concernant les marqueurs des CST dérivées des gliomes de l'adulte n'a pu être

atteint, leur expression variant d'un échantillon tumoral à l'autre et/ou en fonction de signaux environnementaux (Beier *et al.*, 2007; Platet *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Patru *et al.*, 2010). Nous avons porté une attention particulière aux deux propriétés des CST retrouvées de façon constante tout au long de l'abondante littérature consacrée à ce sujet, à savoir la capacité des cellules à croître sous la forme d'oncosphères et leur capacité à se renouveler de façon limitée ou prolongée. Nous avons isolé des cellules tumorales qui croissent sous la forme d'oncosphères et s'auto-renouvellent dans la majorité des 55 échantillons, quels que soient leur type histologique et leur grade (57 % des tumeurs embryonnaires, 57 % des gliomes et des tumeurs neuro-gliales de bas grade, 70 % des épendymomes et 91 % des gliomes de haut grade). La majorité des oncosphères dérivées des tumeurs de haut grade présentait des capacités d'auto-renouvellement similaires à celles de cellules souches neurales dérivées de cerveaux de fœtus humains (> 7 auto-renouvellements), alors que les cellules isolées des gliomes et des tumeurs neuro-gliales de bas grade possédaient, comme les médulloblastomes, des capacités d'auto-renouvellement plus limitées. Le profil d'expression moléculaire des CST dérivées des gliomes de haut grade (établi par RT-PCR et/ou immunocytochimie) était caractérisé par la combinaison de marqueurs de cellules souches embryonnaires (OCT4, NANOG, SSEA4) et d'éléments connus pour contrôler les propriétés des cellules souches neurales (dont SOX2 et BMI1) et les transitions épithélio-mésenchymateuses (dont CHI3L1, SNAIL, SLUG et TWIST). Ces cellules résistent aux agents thérapeutiques utilisés pour traiter les gliomes (irradiation et chimiothérapie au témozolomide) et forment des tumeurs très agressives dans le cerveau de souris immunodéprimées. En dépit de la détection de cellules formant des oncosphères et s'auto-renouvelant dans la majorité des tumeurs de l'échantillon, la dérivation de CST conserve une valeur pronostique. L'analyse de survie de la cohorte a montré une association entre l'isolement de CST aux capacités d'auto-renouvellement à long terme et une hausse du taux de mortalité des patients ( $P = 0,013$ , test *log-rank*). La pertinence clinique de la dérivation de CST doit toutefois être pondérée par l'obtention préférentielle de CST s'auto-renouvelant à long terme à partir des tumeurs cérébrales les plus malignes (médulloblastomes, épendymomes et gliomes de haut grade).

Ces données indiquent donc que des cellules tumorales possédant les marqueurs et les propriétés d'auto-renouvellement de cellules souches neurales ou de progéniteurs peuvent être isolées et cultivées à partir de la plupart des tumeurs gliales de l'enfant quels que soient leur type histologique et leur grade. Elles sont cohérentes avec notre hypothèse initiale se-

lon laquelle les CST présentant des propriétés de cellules souches ou de progéniteurs sont un composant commun des tumeurs cérébrales. Notre succès dans la dérivation de telles cellules à partir des tumeurs cérébrales pédiatriques de haut grade est comparable ou supérieur au taux moyen de succès de 50 % obtenu à ce jour en appliquant aux gliomes de haut grade de l'adulte des techniques similaires aux nôtres (Singh *et al.*, 2003; Galli *et al.*, 2004; Gunther *et al.*, 2008; Pallini *et al.*, 2008; Laks *et al.*, 2009; Patru *et al.*, 2010).

Le résultat le plus étonnant de notre étude est la découverte, dans la plupart des tumeurs examinées, de cellules tumorales ayant des propriétés d'auto-renouvellement de progéniteurs ou de cellules souches neurales, bien que la fréquence de dérivation des CST ait été plus élevée dans les tumeurs pédiatriques de haut grade. Des cellules dotées des propriétés de cellules souches ou de progéniteurs pourraient donc être des éléments plus fréquents des tumeurs cérébrales chez l'enfant que chez l'adulte. Chez ces derniers, les CST ont en effet été identifiées avant tout dans les glioblastomes, la forme la plus maligne des gliomes (Ignatova *et al.*, 2002; Panosyan *et al.*, 2010; Patru *et al.*, 2010). Il n'est cependant pas possible d'exclure que l'environnement plus immature rencontré chez l'enfant favorise l'adaptation de ces cellules à un environnement *in vitro*. D'un autre côté, le fait que ces cellules ne soient pas détectables systématiquement dans toutes les tumeurs d'une catégorie donnée même chez l'enfant, associé à l'augmentation de la fréquence de leur détection avec le grade de la tumeur chez l'enfant comme chez l'adulte, suggère qu'elles ne soient pas présentes à tous les stades temporels du développement tumoral. La plasticité exceptionnelle des cellules gliales normales, illustrée par la capacité de progéniteurs gliaux (Kondo & Raff, 2000) et de cellules gliales matures (Real *et al.*, 2006; Sharif *et al.*, 2007) à régresser vers un stade précoce de leur développement en réponse à un signal environnemental, suggère que les cellules des tumeurs cérébrales pourraient elles aussi acquérir des propriétés de cellules souches sous l'influence de leur micro-environnement.

## Références

- Anchan R.M., Reh T.A., Angello J., Balliet A., Walker M., EGF and TGF-alpha stimulate retinal neuroepithelial cell proliferation *in vitro*. *Neuron*, 1991, 6, 923-936.
- Anton E.S., Marchionni M.A., Lee K.F., Rakic P., Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development*, 1997, 124, 3501-3510.
- Bachoo R.M., Maher E.A., Ligon K.L., Sharpless N.E., Chan S.S., You M.J., Tang Y., DeFrances J., Stover



- E., Weissleder R., Rowitch D.H., Louis D.N., DePinho R.A., Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell*, 2002, 1, 269–277.
- Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N., Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 2006, 444, 756–760.
- Bax D.A., Little S.E., Gaspar N., Perryman L., Marshall L., Viana-Pereira M., Jones T.A., Williams R.D., Grigoriadis A., Vassal G., Workman P., Sheer D., Reis R.M., Pearson A.D., Hargrave D., Jones C., Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development. *PlosOne*, 2009, 4, e5209.
- Beier D., Hau P., Proescholdt M., Lohmeier A., Wischhusen J., Oefner P.J., Aigner L., Brawanski A., Bogdahn U., Beier C.P., CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*, 2007, 67, 4010–4015.
- Bogler O., Nagane M., Gillis J., Huang H.J., Cavenee W.K., Malignant transformation of p53-deficient astrocytes is modulated by environmental cues *in vitro*. *Cell Growth Differ*, 1999, 10, 73–86.
- Bredel M., Pollack I.F., Hamilton R.L., James C.D., Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in high-grade non-brainstem gliomas of childhood. *Clin Cancer Res*, 1999, 5, 1786–1792.
- Buffo A., Rite I., Tripathi P., Lepier A., Colak D., Horn A.P., Mori T., Gotz M., Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105, 3581–3586.
- Burrows R.C., Wancio D., Levitt P., Lillien L., Response diversity and the timing of progenitor cell maturation are regulated by developmental changes in EGFR expression in the cortex. *Neuron*, 1997, 19, 251–267.
- Burrows R.C., Lillien L., Levitt P., Mechanisms of progenitor maturation are conserved in the striatum and cortex. *Dev Neurosci*, 2000, 22, 7–15.
- Chen R., Nishimura M.C., Bumbaca S.M., Kharbanda S., Forrest W.F., Kasman I.M., Greve J.M., Soriano R.H., Gilmour L.L., Rivers C.S., Modrusan Z., Nacu S., Guerrero S., Edgar K.A., Wallin J.J., Lamszus K., Westphal M., Heim S., James C.D., VandenBerg S.R., Costello J.F., Moorefield S., Cowdrey C.J., Prados M., Phillips H.S., A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell*, 2010, 17, 362–375.
- Collins V.P., Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75 Suppl, 2004, 2, ii2–11.
- Dai C., Holland E.C., Astrocyte differentiation states and glioma formation. *Cancer J*, 2003, 9, 72–81.
- Ding H., Shannon P., Lau N., Wu X., Roncari L., Baldwin R.L., Takebayashi H., Nagy A., Gutmann D.H., Guha A., Oligodendrogliomas result from the expression of an activated mutant epidermal growth factor receptor in a RAS transgenic mouse astrocytoma model. *Cancer Res*, 2003, 63, 1106–1113.
- Dufour C., Cadusseau J., Varlet P., Surena A.L., de Faria G.P., Dias-Morais A., Auger N., Leonard N., Daudigeos E., Dantas-Barbosa C., Grill J., Lazar V., Dessen P., Vassal G., Prévot V., Sharif A., Chneiweiss H., Junier M.P., Astrocytes reverted to a neural progenitor-like state with transforming growth factor alpha are sensitized to cancerous transformation. *Stem Cells*, 2009, 27, 2373–2382.
- Ferri R.T., Levitt P., Regulation of regional differences in the differentiation of cerebral cortical neurons by EGF family-matrix interactions. *Development*, 1995, 121, 1151–1160.
- Ferri R.T., Eagleson K.L., Levitt P., Environmental signals influence expression of a cortical areal phenotype *in vitro* independent of effects on progenitor cell proliferation. *Dev Biol*, 1996, 175, 184–190.
- Galli R., Binda E., Orfanelli U., Cipelletti B., Gritti A., De Vitis S., Fiocco R., Foroni C., Dimeco F., Vescovi A., Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*, 2004, 64, 7011–7021.
- Gregg C., Weiss S., Generation of functional radial glial cells by embryonic and adult forebrain neural stem cells. *J Neurosci*, 2003, 23, 11587–11601.
- Grimmer M.R., Weiss W.A., Childhood tumors of the nervous system as disorders of normal development. *Curr Opin Pediatr*, 2006, 18, 634–638.
- Gunther H.S., Schmidt N.O., Phillips H.S., Kemming D., Kharbanda S., Soriano R., Modrusan Z., Meissner H., Westphal M., Lamszus K., Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene*, 2008, 27, 2897–2909.
- Harris H., Tumour suppression: putting on the brakes. *Nature*, 2004, 427, 201.
- Hemmati H.D., Nakano I., Lazareff J.A., Masterman-Smith M., Geschwind D.H., Bronner-Fraser M., Kornblum H.I., Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100, 15178–15183.
- Ignatova T.N., Kukekov V.G., Laywell E.D., Suslov O.N., Vrionis F.D., Steindler D.A., Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers *in vitro*. *Glia*, 2002, 39, 193–206.
- Imura T., Kornblum H.I., Sofroniew M.V., The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J Neurosci*, 2003, 23, 2824–2832.

- Jhappan C., Stahle C., Harkins R.N., Fausto N., Smith G.H., Merlino G.T., TGF alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell*, 1990, 61, 1137–1146.
- Johe K.K., Hazel T.G., Muller T., Dugich-Djordjevic M.M., McKay R.D., Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev*, 1996, 10, 3129–3140.
- Jonakait G.M., Luskin M.B., Ni L., Transforming growth factor-alpha expands progenitor cells of the basal forebrain, but does not promote cholinergic differentiation. *J Neurobiol*, 1998, 37, 405–412.
- Junier M.P., What role(s) for TGFalpha in the central nervous system? *Prog Neurobiol*, 2000, 62, 443–473.
- Kalifa C., Grill J., The therapy of infantile malignant brain tumors: current status? *J Neurooncol*, 2005, 75, 279–285.
- Kelly P.N., Dakic A., Adams J.M., Nutt S.L., Strasser A., Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science*, 2007, 317, 337.
- Kondo T., Raff M., Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science*, 2000, 289, 1754–1757.
- Kornblum H.I., Zurcher S.D., Werb Z., Derynck R., Seroogy K.B., Multiple trophic actions of heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) in the central nervous system. *Eur J Neurosci*, 1999, 11, 3236–3246.
- Kornblum H.I., Hussain R., Wiesen J., Miettinen P., Zurcher S.D., Chow K., Derynck R., Werb Z., Abnormal astrocyte development and neuronal death in mice lacking the epidermal growth factor receptor. *J Neurosci Res*, 1998, 53, 697–717.
- Kriegstein A.R., Gotz M., Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia*, 2003, 43, 37–43.
- Laks D.R., Masterman-Smith M., Visnyei K., Angenieux B., Orozco N.M., Foran I., Yong W.H., Vinters H.V., Liau L.M., Lazareff J.A., Mischel P.S., Cloughesy T.F., Horvath S., Kornblum H.I., Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma. *Stem Cells*, 2009, 27, 980–987.
- Laywell E.D., Rakic P., Kukekov V.G., Holland E.C., Steindler D.A., Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97, 13883–13888.
- Lee D.C., Fenton S.E., Berkowitz E.A., Hissong M.A., Transforming growth factor alpha: expression, regulation, and biological activities. *Pharmacol Rev*, 1995, 47, 51–85.
- Lillien L., Changes in retinal cell fate induced by overexpression of EGF receptor. *Nature*, 1995, 377, 158–162.
- Lillien L., Cepko C., Control of proliferation in the retina: temporal changes in responsiveness to FGF and TGF alpha. *Development*, 1992, 115, 253–266.
- Lillien L., Wancio D., Changes in Epidermal Growth Factor Receptor Expression and Competence to Generate Glia Regulate Timing and Choice of Differentiation in the Retina. *Mol Cell Neurosci*, 1998, 10, 296–308.
- Liu B., Neufeld A.H., Activation of epidermal growth factor receptors directs astrocytes to organize in a network surrounding axons in the developing rat optic nerve. *Dev Biol*, 2004, 273, 297–307.
- Louis S.A., Rietze R.L., Deleyrolle L., Wagey R.E., Thomas T.E., Eaves A.C., Reynolds B.A., Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. *Stem Cells*, 2008, 26, 988–996.
- Matsui Y., Halter S.A., Holt J.T., Hogan B.L., Coffey R.J., Development of mammary hyperplasia and neoplasia in MMTV-TGF alpha transgenic mice. *Cell*, 1990, 61, 1147–1155.
- Nakai E., Park K., Yawata T., Chihara T., Kumazawa A., Nakabayashi H., Shimizu K., Enhanced MDR1 expression and chemoresistance of cancer stem cells derived from glioblastoma. *Cancer Invest*, 2009, 27, 901–908.
- Nakamura M., Shimada K., Ishida E., Higuchi T., Nakase H., Sakaki T., Konishi N., Molecular pathogenesis of pediatric astrocytic tumors. *Neuro Oncol*, 2007, 9, 113–123.
- Pallini R., Ricci-Vitiani L., Banna G.L., Signore M., Lombardi D., Todaro M., Stassi G., Martini M., Maira G., Larocca L.M., De Maria R., Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*, 2008, 14, 8205–8212.
- Panosyan E.H., Laks D.R., Masterman-Smith M., Mottahedeh J., Yong W.H., Cloughesy T.F., Lazareff J.A., Mischel P.S., Moore T.B., Kornblum H.I., Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with *in vitro* multi-passageable neurosphere formation. *Pediatr Blood Cancer*, 2010.
- Park D.M., Rich J.N., Biology of glioma cancer stem cells. *Mol Cells*, 2009, 28, 7–12.
- Patru C., Romao L., Varlet P., Coulombel L., Raponi E., Cadusseau J., Renault-Mihara F., Thirant C., Leonard N., Berhneim A., Mihalescu-Maingot M., Haiech J., Bieche I., Moura-Neto V., Daumas-Duport C., Junier M.P., Chneiweiss H., CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glioma-neuronal tumors. *BMC Cancer*, 2010, 10, 66.
- Platet N., Liu S.Y., Atifi M.E., Oliver L., Vallette F.M., Berger F., Wion D., Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. *Cancer Lett*, 2007, 258, 286–290.
- Quintana E., Shackleton M., Sabel M.S., Fullen D.R., Johnson T.M., Morrison S.J., Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, 2008, 456, 593–598.

- Rabchevsky A.G., Weinitz J.M., Coulpier M., Fages C., Tinel M., Junier M.P., A role for transforming growth factor alpha as an inducer of astrogliosis. *J Neurosci*, 1998, 18, 10541–10552.
- Real C., Glavieux-Pardanaud C., Le Douarin N.M., Dupin E., Clonally cultured differentiated pigment cells can dedifferentiate and generate multipotent progenitors with self-renewing potential. *Dev Biol*, 2006, 300, 656–669.
- Reynolds B.A., Weiss S., Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol*, 1996, 175, 1–13.
- Reynolds B.A., Tetzlaff W., Weiss S., A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, 1992, 12, 4565–4574.
- Sanai N., Alvarez-Buylla A., Berger M.S., Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med*, 2005, 353, 811–822.
- Sandgren E.P., Luetke N.C., Palmiter R.D., Brinster R.L., Lee D.C., Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell*, 1990, 61, 1121–1135.
- Santa-Olalla J., Covarrubias L., Epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor-alpha (TGF-alpha), and basic fibroblast growth factor (bFGF) differentially influence neural precursor cells of mouse embryonic mesencephalon. *J Neurosci Res*, 1995, 42, 172–183.
- Shankar V., Ciardiello F., Kim N., Derynck R., Liscia D.S., Merlo G., Langton B.C., Sheer D., Callahan R., Bassin R.H., *et al.*, Transformation of an established mouse mammary epithelial cell line following transfection with a human transforming growth factor alpha cDNA. *Mol Carcinog*, 1989, 2, 1–11.
- Sharif A., Prévot V., ErbB receptor signaling in astrocytes: a mediator of neuron-glia communication in the mature central nervous system. *Neurochem Int*, 2010, 57, 344–358.
- Sharif A., Prévot V., Renault-Mihara F., Allet C., Studler J.M., Canton B., Chneiweiss H., Junier M.P., Transforming growth factor alpha acts as a gliatrophin for mouse and human astrocytes. *Oncogene*, 2006, 25, 4076–4085.
- Sharif A., Legendre P., Prévot V., Allet C., Romao L., Studler J.M., Chneiweiss H., Junier M.P., Transforming growth factor alpha promotes sequential conversion of mature astrocytes into neural progenitors and stem cells. *Oncogene*, 2007, 26, 2695–2706.
- Shih A.H., Holland E.C., Developmental neurobiology and the origin of brain tumors. *J Neurooncol*, 2004, 70, 125–136.
- Sibilia M., Steinbach J.P., Stingl L., Aguzzi A., Wagner E.F., A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *Embo J*, 1998, 17, 719–731.
- Singh S.K., Clarke I.D., Hide T., Dirks P.B., Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, 2004a, 23, 7267–7273.
- Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M., Bonn V.E., Hawkins C., Squire J., Dirks P.B., Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 2003, 63, 5821–5828.
- Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., Squire J.A., Bayani J., Hide T., Henkelman R.M., Cusimano M.D., Dirks P.B., Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 2004b, 432, 396–401.
- Sun Y., Goderie S.K., Temple S., Asymmetric distribution of EGFR receptor during mitosis generates diverse CNS progenitor cells. *Neuron*, 2005, 45, 873–886.
- Sutter R., Yadirgi G., Marino S., Neural stem cells, tumour stem cells and brain tumours: dangerous relationships? *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1776, 125–137.
- Tang P., Steck P.A., Yung W.K., The autocrine loop of TGF-alpha/EGFR and brain tumors. *J Neurooncol*, 1997, 35, 303–314.
- Taylor M.D., Poppleton H., Fuller C., Su X., Liu Y., Jensen P., Magdaleno S., Dalton J., Calabrese C., Board J., Macdonald T., Rutka J., Guha A., Gajjar A., Curran T., Gilbertson R.J., Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell*, 2005, 8, 323–335.
- Temple S., The development of neural stem cells. *Nature*, 2001, 414, 112–117.
- Thirant C., Bessette B., Varlet P., Puget S., Cadusseau J., Dos Reis Tavares S., Studler J.M., Silvestre D.C., Susini A., Villa C., Miquel C., Bogeas A., Surena A.L., Dias-Morais A., Léonard N., Pflumio F., Bièche I., Boussin F.D., Sainte-Rose C., Grill J., Daumas-Duport C., Chneiweiss H., Junier M.P., Clinical relevance of tumor cells with stem-like properties in pediatric brain tumors. *PlosOne* sous presse.
- Todaro G.J., Fryling C., De Larco J.E., Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77, 5258–5262.
- Varlet P., Soni D., Miquel C., Roux F.X., Meder J.F., Chneiweiss H., Daumas-Duport C., New variants of malignant glioneuronal tumors: a clinicopathological study of 40 cases. *Neurosurgery*, 2004, 55, 1377–1391: discussion 1391–1372.
- Vescovi A.L., Gritti A., Galli R., Parati E.A., Isolation and intracerebral grafting of nontransformed multipotential embryonic human CNS stem cells. *J Neurotrauma*, 1999, 16, 689–693.
- Wang J., Sakariassen P.O., Tsinkalovsky O., Immervoll H., Boe S.O., Svendsen A., Prestegarden L., Rosland G.,

- Thorsen F., Stuhr L., Molven A., Bjerkvig R., Enger P.O., CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer*, 2008, 122, 761–768.
- Watanabe S., Lazar E., Sporn M.B., Transformation of normal rat kidney (NRK) cells by an infectious retrovirus carrying a synthetic rat type alpha transforming growth factor gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84, 1258–1262.
- Wechsler-Reya R., Scott M.P., The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24, 385–428.
- Weickert C.S., Blum M., Striatal TGF- $\alpha$ : postnatal developmental expression and evidence for a role in the proliferation of subependymal cells. *Brain Res Dev Brain Res*, 1995, 86, 203–216.
- Weiss S., Dunne C., Hewson J., Wohl C., Wheatley M., Peterson A.C., Reynolds B.A., Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci*, 1996, 16, 7599–7609.
- Weiss W.A., Israel M., Cobbs C., Holland E., James C.D., Louis D.N., Marks C., McClatchey A.I., Roberts T., Van Dyke T., Wetmore C., Chiu I.M., Giovannini M., Guha A., Higgins R.J., Marino S., Radovanovic I., Reilly K., Aldape K., Neuropathology of genetically engineered mice: consensus report and recommendations from an international forum. *Oncogene*, 2002, 21, 7453–7463.
- Yahanda A.M., Bruner J.M., Donehower L.A., Morrison R.S., Astrocytes derived from p53-deficient mice provide a multistep *in vitro* model for development of malignant gliomas. *Mol Cell Biol*, 1995, 15, 4249–4259.
- Yuan X., Curtin J., Xiong Y., Liu G., Waschmann-Hogiu S., Farkas D.L., Black K.L., Yu J.S., Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*, 2004, 23, 9392–9400.