

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

UN RÔLE SIGNALÉTIQUE RELIANT SNAIL À LA PROTÉINE RIBOSOMALE SA DU RÉCEPTEUR À LA  
LAMININE-1 37/67 KDA RÉGULE L'ACQUISITION D'UN PHÉNOTYPE SOUCHE CANCÉREUX DANS  
LES NEUROSPHÈRES DE CELLULES U87 DE GLIOBLASTOMES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ(E)

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

LORAINÉ GRESSEAU

JANVIER 2023

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu mon directeur de recherche, le professeur Borhane Annabi. Je le remercie pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir introduite à la recherche scientifique et de m'avoir prodigué des conseils tout au long de mes démarches.

Je remercie aussi les assistantes de recherche Virginie Desse, Loyal El-Cheik Hussein et Marie-Ève Roy qui m'ont permis d'avoir tous les outils nécessaires pour ma réussite.

À Sahily Rodriguez-Torres, Narjara Gonzalez Suarez, Souad Djediai et Fatima Belkourchia. Je vous remercie pour la patience que vous m'avez accordée durant ces dernières années. Je vous remercie aussi pour les conseils que vous m'avez donnés. Je remercie aussi Célia Kassouri, Meriem Benhamida et Sima Torabidastgerdooei pour l'aide que vous m'avez accordée lorsque j'en avais besoin.

Je remercie le Dr Bogdan Alexandru Danalache, Dr Khalil Abdelbaqui, Alain Zgheib, Véronique Lullier, Dre Cyndia Charfi et Dre Amira Ouanouki, les employés de Theratechnologies pour toute l'aide qu'ils m'ont donnée.

Je remercie le professeur Marc Lussier et ses étudiants pour m'avoir laissé utiliser le chemidoc afin d'obtenir mes résultats. Je remercie aussi la professeure Zoé Joly-Lopez pour tous les conseils qu'elle m'a donné sur le plan académique.

Je remercie aussi le professeur François Dragon qui a contribué à ma réussite à l'UQÀM ainsi que le professeur Laurent Chatel-Chaix de l'Institut national de la recherche scientifique qui a contribué au commencement de mon parcours en recherche scientifique.

Je tiens à remercier la bourse d'étude de Rosemary-Coveney qui m'a permis en premier lieu de faire ma maîtrise au sein de la Chaire de Prévention et Traitement du Cancer ainsi que la fondation de l'UQÀM pour avoir financé mes études.

## DÉDICACE

Je dédie ce mémoire à mon père Jim Hendrix Gresseau et ma mère Pascale André, qui sans leurs encouragements et leurs sacrifices, je ne serai jamais où je suis en ce moment. Ma réussite est leur réussite

À Kareen, Hendrale, Nathanaël, Anna-Judith et Olivier Gresseau. Je vous remercie de vos encouragements que vous m'avez donnés.

Je remercie aussi mes grand-parents Paula Baptiste et Marc-Jérôme Gresseau, qui ont tout laissé en Haïti afin que la famille puisse avoir une vie meilleure. Je ne serai pas au Québec sans eux.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	ii
DÉDICACE .....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	viii
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS .....	xii
RÉSUMÉ .....	xiii
CHAPITRE 1.....	14
INTRODUCTION .....	14
1.1 Définition du cancer .....	14
1.1.1 Altérations génétiques des cellules cancéreuses .....	14
1.1.2 Acquisition du phénotype des cellules cancéreuses.....	16
1.1.3 La métastase .....	16
1.2 Le cancer du cerveau .....	16
1.2.1 Catégorisation des tumeurs en fonction de leur origine.....	16
1.2.2 Classification des tumeurs en fonction de leurs mutations génétiques.....	19
1.2.2.1 Classification des gliomes .....	20
1.3 Les glioblastomes .....	21
1.3.1 Caractéristiques pathologiques des glioblastomes .....	22
1.4 Traitements actuels pour les glioblastomes .....	24
1.4.1 Chirurgie.....	24
1.4.2 Chimiothérapie .....	24
1.4.2.1 Témzolomide .....	24
1.4.2.2 Carmustine.....	24
1.4.2.3 Lomustine .....	25
1.4.2.4 Cyclophosphamide.....	25
1.4.3 Radiothérapie.....	25
1.4.4 Les défis à surmonter pour le traitement des glioblastomes .....	27
1.5 Les cellules souches .....	28
1.5.1 Les cellules souches cancéreuses .....	28
1.5.2 Les cellules souches de glioblastomes.....	29
1.5.2.1 Les caractéristiques des cellules souches de glioblastomes.....	31
1.5.2.2 Génotype des cellules souches de glioblastomes.....	31
1.5.2.3 Phénotype des cellules souches cancéreuses de glioblastome.....	33
1.5.2.4 Les mécanismes de chimiorésistance des cellules souches de glioblastomes .....	33
1.5.2.5 L'étude des cellules souches cancéreuses de glioblastome .....	34

1.6	La transition épithélio-mésenchymateuse (TÉM) .....	35
1.6.1	Marqueurs de la TÉM.....	36
1.7	Voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale des cellules souches de glioblastomes .....	37
1.7.1	AKT/PI3K .....	37
1.7.2	MSK1/2.....	38
1.7.3	CREB.....	38
1.7.4	GSK3 $\alpha\beta$ .....	38
1.7.5	RSK .....	39
1.7.6	Les voies de signalisation anti-apoptotiques.....	39
1.7.7	Poly (ADP-ribose) polymérase 1 .....	40
1.8	L'épigallocatechine-3-gallate .....	40
1.8.1	Propriétés de l'EGCG.....	41
1.8.2	Biodisponibilité de l'EGCG .....	42
1.8.3	Interaction entre l'EGCG et le récepteur à la laminine 67LR.....	43
1.9	Récepteur à la laminine 67LR.....	43
1.9.1	Structure .....	43
1.9.1.1	Fonction .....	44
1.9.2	Rôle du récepteur à la laminine 67LR dans les cellules cancéreuses. ....	44
1.9.2.1	Expression du récepteur à la laminine 67LR dans les gliomes .....	45
1.10	Projet de recherche.....	46
1.10.1	Hypothèses .....	46
1.10.2	Objectifs de la recherche .....	46
	CHAPITRE 2.....	47
	ARTICLE.....	47
2.1	Résumé.....	49
2.2	Abstract.....	49
2.3	Introduction .....	50
2.4	Materials and Method .....	52
2.4.1	Materials .....	52
2.4.2	Cell culture.....	52
2.4.3	Total RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR .....	53
2.4.4	Total RNA library preparation.....	53
2.4.5	RNA sequencing .....	54
2.4.6	Reads alignment and differential expression analysis.....	54
2.4.7	Gene set enrichment analysis.....	54
2.4.8	Western Blot .....	55
2.4.9	In silico analysis of transcripts levels in clinical glioblastoma and low-grade glioblastoma tissues	55
2.4.10	Spheroid size assessment .....	55
2.4.11	Statistical data analysis .....	55

2.5	Results .....	56
2.5.1	EGCG alters neurospheres size and reverses the acquisition of a cancer-stem cell phenotype.	56
2.5.2	Transcriptomic analysis reveals the reversion of epithelial to mesenchymal transition in profit to an apoptotic, senescent, and oxidative program upon EGCG treatment of glioblastoma spheroids.	56
2.5.3	EGCG alters neurospheres' epithelial-to-mesenchymal transition phenotype.....	57
2.5.4	Repression of the 37/67 kDa laminin-1 receptor ribosomal protein SA (RPSA) alters spheroids formation and prevents the acquisition of a cancer stem cell phenotype. ....	58
2.5.5	Repression of Snail alters spheroids formation, prevents the acquisition of a cancer stem cell phenotype, but does not affect the acquisition of the apoptotic signature. ....	58
2.6	Discussion .....	59
2.7	Conclusion .....	61
2.8	References.....	69
CHAPITRE 3 .....		74
DISCUSSION .....		74
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....		83
BIBLIOGRAPHIE.....		86

## LISTE DES FIGURES

FIGURE	PAGE
Figure 1.1 : Incidence des cancers au Canada de 2017 à 2019 en fonction du sexe .....	15
Figure 1.2 : Formation des tumeurs possédant une population hétérogène de cellules .....	17
Figure 1.3 : Classification des tumeurs cérébrales .....	18
Figure 1.4 : Origine des glioblastomes .....	22
Figure 1.5 : Résumé des caractéristiques des glioblastomes.....	23
Figure 1.6 : Résumé des mécanismes utilisés par les traitements chimiothérapeutiques .....	27
Figure 1.7 : Mécanismes pouvant améliorer à la formation des cellules souches cancéreuses de glioblastomes .....	30
Figure 1.8 : Résistance des cellules souches de glioblastomes aux traitements thérapeutiques.....	32
Figure 1.9 : Principe de la transition épithélio-mésenchymateuse.....	36
Figure 1.10 : Structure moléculaire de l'EGCG.....	42
Figure 1.11 : Structure moléculaire du précurseur au récepteur à la laminine 67LR .....	45
Figure 2.1 : EGCG alters neurosphere size and reverses the acquisition of cancer stem cell phenotype.....	62
Figure 2.2 : Transcriptomic analysis reveals the reversion of epithelial to mesenchymal transition in profit to an apoptosis program upon EGCG treatment of glioblastoma spheroids.....	63
Figure 2.3 : EGCG alters neurosphere's epithelial to mesenchymal transition phenotype.....	64
Figure 2.4 : Repressino of the 67 kDa Laminin receptor (RPSA) alters spheroid formationand prevents the acquisition of a cancer stem cell phenotype.....	65
Figure 2.5 : Repression of SNAIL alters formation, prevent the acquisition of a cancer stem cell phenotype, but does not affect the acquisition of the apoptotic signature.....	67
Figure 2.6 : Schematic representation summarizing the crosstalk linking Snail to RPSA, and the action of EGCG on the neurosphere molecular signature.....	68



## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

37LRP	Précurseur du récepteur à la laminine 37 kDa
67LR	Récepteur à la laminine 67 kDa
A2B5	Sérine/thréonine phosphatase 2A avec isoforme 5 de sous-unité bêta
ABC	<i>ATP-Binding cassette</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT	Homologue cellulaire de l'oncogène du virus thymome akt8
ARN	Acide ribonucléique
ATF1	<i>Cyclic AMP-dependant transcription factor ATF1</i>
ATRX	<i>Alpha-Thalassemia X-Linked mental retardation syndrome</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL2L1	<i>BCL-2-like protein 1</i>
BCL-XL	<i>C-cell lymphoma-extra large</i>
BH3	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BRAF	Homologue de l'oncogène viral du sarcome murin v-raf B1
CaMK	<i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependant protein kinase</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CD133	<i>Cluster differentiation 133</i>
CD15	<i>Cluster differentiation 15</i>
cDNA	Acide désoxyribonucléique complémentaire

CPA	Cyclophosphamide
CREB	<i>Cyclic-AMP response element binding protein</i>
CSC	Cellules souches cancéreuses
EGC	(-)-Épigallocatechine
EGCG	Épigallocatechine-3-gallate
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
FN1	Fibronectine 1
GA	Gallate
GBM	Glioblastome
GSK3 $\alpha/\beta$	Glycogène synthase kinase 3 $\alpha/\beta$
IDH	Isocitrate déshydrogénase
L1CAM	<i>Cell adhesion molecule L1</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mARN	Acide ribonucléique messenger
MCL1	<i>Myeloid cell leukemia-1</i>
MDR1	<i>Multidrug resistance mutation 1</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MRP1	<i>Multidrug resistance-associated protein 1</i>
MRP3	<i>Multidrug resistance-associated protein 3</i>
MRP4	<i>Multidrug resistance-associated protein 4</i>

MSK1/2	<i>Mitogen and stress-activated kinase 1/2</i>
MYC	Proto-oncogène MYC
Myc	<i>Myc proto-oncogene protein</i>
NAD+	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NANOG	<i>Homeobox protein Nanog</i>
NESTIN	<i>Neuroepithelial stem cell protein</i>
Oct3/4	Octamer-binding protein 3/4
p38	<i>P38 mitogen-activated kinase</i>
PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase 1
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide kinase 3</i>
PIP <sub>3</sub>	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKB	<i>Protein kinase B</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RPSA	Protéine ribosomique 40S SA
RSK	<i>90 kDa ribosomal s6 kinase</i>
RTK	Récepteur à tyrosine kinase
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>

SNAI	<i>SNAI transcription factor family</i>
SNC	Système nerveux central
SOX2	<i>Sex-determining region Y (SRY) – box 2</i>
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
TÉM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TMZ	Temozolomide
TP53	<i>Tmor protein 53</i>
WT	<i>Wild type</i>

## LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

$\mu\text{M}$  Micromolaire

Gy Gray

kDa Kilo Dalton

## RÉSUMÉ

Les gliomes sont des cancers qui se retrouvent dans le cerveau. Il y a plusieurs types de gliomes, et ceux-ci sont catégorisés en 4 grades. Les grades I et II représentent les gliomes à bas grades qui possèdent les meilleurs pronostics. Les grades III et IV représentent les gliomes à hauts grades qui possèdent les pires pronostics. Les gliomes de grade IV comprennent les glioblastomes (GBM), un type de cancer du cerveau qui est très agressif. L'agressivité de ce dernier est due en premier lieu à l'altération de l'expression de plusieurs protéines qui permettent la survie des cellules cancéreuses qui composent la tumeur. Les cellules d'une tumeur ne possèdent pas toutes les mêmes types d'altération, ce qui fait en sorte qu'il peut y avoir des sous-populations de cellules cancéreuses différentes. Une de ces sous-populations est les cellules souches cancéreuses (CSC). Celles-ci ont la capacité de résister aux différents traitements chimiothérapeutiques, et elles sont parfois responsables de la récurrence d'un GBM. Elles sont caractérisées entre-autres par une surexpression de certains gènes connus sous le nom de marqueurs à CSC. La transition épithélio-mésenchymateuse (TÉM) est une autre caractéristique des CSC. Les protéines qui sont surexprimées durant ce phénomène sont connues sous le nom de marqueurs de la TÉM. À cause de cela, il est important de trouver des traitements pour éradiquer les CSC de GBM. La recherche présentée ici se concentre sur les mécanismes d'acquisition d'un phénotype souche de cellules cancéreuses de GBM. Cela a été fait en utilisant les cellules de GBM afin d'obtenir des sphéroïdes, une structure en trois dimensions permettant de mimiquer le phénotype souche. L'agent pharmacologique qui a été utilisé dans cette étude est l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG). Puisque la recherche se concentre sur la chimioprévention, l'EGCG a été introduit pendant la formation des sphéroïdes. Les résultats démontrent que l'EGCG peut prévenir l'acquisition du phénotype souche de GBM, réduire l'expression des marqueurs à CSC et de la TÉM ainsi que les autres protéines impliquées dans la progression tumorale. Cette dernière n'a pas besoin de son récepteur, le récepteur à la laminine 67LR, afin de remplir cette fonction. Une baisse de l'expression du récepteur à la laminine 67LR a inhibé la capacité des cellules de GBM à former des sphéroïdes. Une baisse de son expression résulte en une baisse de l'expression des protéines impliquées dans la progression tumorale des CSC de GBM. Nous avons aussi découvert que la baisse de l'expression du récepteur à la laminine 67LR mène à la réduction de la protéine SNAIL, un marqueur de la TÉM. En outre, il a été intéressant de déterminer son rôle dans l'acquisition du phénotype souche. Les résultats démontrent que la répression de SNAIL a résulté en une baisse de la taille des sphéroïdes. Cependant, elle n'a pas d'effet aussi important que le récepteur à la laminine 67LR sur l'expression des protéines impliqués dans les voies de signalisation qui permettent la progression tumorale. En conclusion, il est possible d'affirmer que l'EGCG est important dans la prévention de l'apparition des cellules souches de glioblastome et il peut inhiber la progression tumorale et ce, sans l'aide du récepteur à la laminine 67LR. Cependant, le récepteur à la laminine 67LR semble jouer un rôle aussi important dans la progression tumorale des glioblastomes. Ce dernier peut en effet inhiber l'acquisition du phénotype souches des cellules de glioblastomes. Il semble aussi avoir un lien direct avec la TÉM à travers la régulation de l'expression de SNAIL.

Mots clés : Cellules souches cancéreuses, glioblastome, épigallocatechine-3-gallate, récepteur à la laminine 67LR, SNAIL, transition épithélio-mésenchymateuse

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1 Définition du cancer

Le cancer est une maladie qui affecte des milliers de canadiens. En 2022, le nombre de nouveaux cas est estimé à 233 900 et le nombre de décès est estimé à 85 100. Le vieillissement de la population contribue à l'augmentation du nombre de décès liés au cancer (Brenner et al., 2022). De plus, des habitudes de vie tels que l'inactivité physique, l'obésité, et le tabagisme contribuent à l'augmentation du nombre de cas (Arneth, 2019).

Le registre GLOBCAN de 2018 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) démontre que les types de cancers ayant des taux de mortalités les plus élevés sont le cancer des poumons, du foie, du pancréas, de l'œsophage, et la leucémie. En effet, les taux de mortalité de ces types de cancer sont de 84%, 93%, 94%, 89% et 71% respectivement. Ces derniers, à l'exception de la leucémie, font partie des types de cancer dont les taux de survie après 5 ans de traitement sont les plus faibles (Mattiuzzi & Lippi, 2019).

Une étude effectuée par White et al. a compilé les incidences de cancers aux États-Unis en 2009. Les résultats démontraient que le nombre de cas de cancers augmentaient jusqu'à l'âge de 70 ans, pour ensuite baisser. Une tendance similaire sur les risques d'avoir un diagnostic de cancer a été observée (White et al., 2014). Il est possible d'observer des résultats similaires sur le nombre de décès liés au cancer au Canada plusieurs années plus tard (Figure 1.1). De plus, la cause principale de décès chez les personnes de 90 ans et plus est le cancer, et il y a des chances que le taux augmente à cause du vieillissement de la population (<https://cancer.ca/en/cancer-information/resources/publications/2021-canadian-cancer-statistics>).

#### 1.1.1 Altérations génétiques des cellules cancéreuses

Le cancer regroupe un ensemble de maladies où les cellules se multiplient de façon incontrôlée (Visvader, 2011). L'ensemble des nouvelles cellules créées porte aussi le nom de néoplasme (Louis et al., 2002). La formation des néoplasmes survient lorsque les cellules subissent des altérations au niveau de leur ADN.

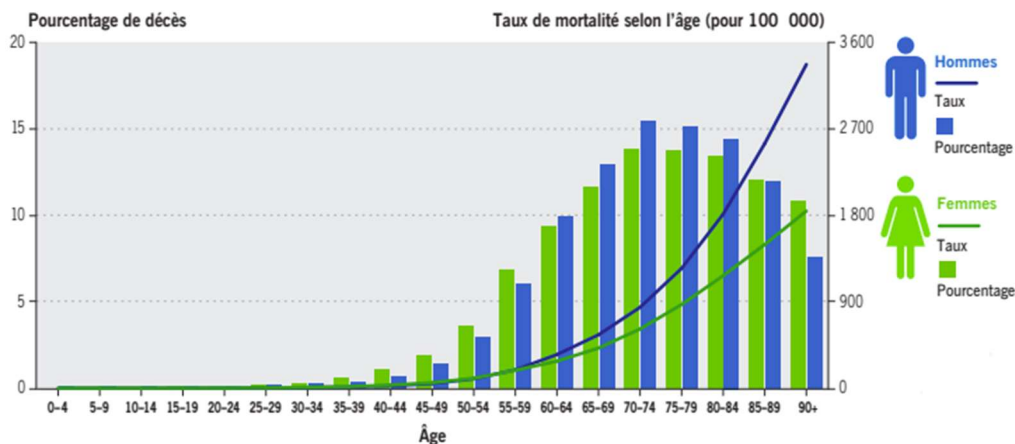


Figure 1.1 : Incidence des cancers au Canada de 2017 à 2019 en fonction du sexe. Adapté de <https://can-cer.ca/en/cancer-information/resources/publications/2021-canadian-cancer-statistics>. Consulté le 11 janvier 2023

Des altérations tels que la modification d'un acide aminé important, une insertion, une délétion ou une duplication de certains segments d'un gène ainsi qu'une modification dans l'arrangement des chromosomes peut contribuer à la formation d'un néoplasme (Cullen & Breen, 2016).

Un autre facteur à considérer est le changement au niveau de l'épigénétique. Une altération au de l'expression de certains gènes peut contribuer à la formation des néoplasmes. L'expression des gènes peut être modifiée via la méthylation de l'ADN, l'acétylation des histones et l'expression des microARN. Par exemple, la méthylation des gènes codants pour les suppresseurs de tumeurs, ce qui mène à l'arrêt de leur expression, se manifeste dans des cancers tel que le cancer du sein, du colon et des reins (Cullen & Breen, 2016).

Les gènes dont la mutation engendre les néoplasmes sont divisés en trois catégories : les suppresseurs de tumeurs, les gènes responsables de réparer l'ADN et les proto-oncogènes (Tandel et al., 2019). Les suppresseurs de tumeurs sont responsables de contrôler le cycle cellulaire, et en particulier l'apoptose (Evan & Vousden, 2001). Deux signalisations sont possibles afin d'amorcer l'apoptose. Soit que la cellule amorce elle-même le signal, ou que le signal vient d'une autre cellule. La mort cellulaire est ralentie s'il y a une altération dans une des voies, et elle peut être arrêtée s'il y a une altération dans les deux voies (Evan & Vousden, 2001; Burch, 2012). Une altération dans les gènes responsable de réparer l'ADN peut engendrer le cancer. S'il y a des mutations dans l'ADN qui ne sont pas corrigés, ceci peut engendrer la formation des



néoplasmes (Cullen & Breen, 2016). Le rôle des proto-oncogènes est d'engendrer la mitose et d'inhiber la mort cellulaire (Rak et al., 1995; Yarden et al., 1987). Des protéines telles la protéine RAS sont responsables de réguler la division cellulaire (Greenberg et al., 1985), et une altération dans des gènes comme celui qui code pour la protéine RAS entraîne la multiplication incontrôlée des cellules (Tandel et al., 2019).

### 1.1.2 Acquisition du phénotype des cellules cancéreuses

Les néoplasmes vont par la suite acquérir un phénotype différent des cellules non-cancéreuses (Rulyak et al., 2003). Cependant, les cellules qui sont dans le néoplasme n'auront pas toutes le même phénotype. En effet, l'instabilité génétique va permettre l'hétérogénéité des cellules qui constituent la tumeur. Ces modifications vont faire en sorte que les nouvelles cellules qui constitueront la tumeur seront de plus en plus agressives, ce qui va promouvoir la progression tumorale ainsi que la métastase (Figure 1.2). De plus, la tumeur peut devenir de plus en plus résistante aux traitements thérapeutiques (Burrell et al., 2013).

### 1.1.3 La métastase

La métastase est un phénomène où des cellules parmi une tumeur la quittent afin de coloniser les tissus environnants ou distants. Les cellules vont se déplacer en utilisant les vaisseaux sanguins et le système lymphatique (Bacac & Stamenkovic, 2008; Duffy et al., 2008). Ainsi, les cellules cancéreuses vont se détacher de la tumeur primaire afin de s'installer dans un autre tissu ou organe. Celles-ci peuvent par la suite se multiplier afin de créer une tumeur secondaire (Denardo et al., 2008).

## 1.2 Le cancer du cerveau

Les risques de développer un cancer du cerveau a augmenté durant les 20 dernières années. Les cas de cancer chez les hommes sont entre 0,01 et 12,7 par 100 000 personnes, tandis que les cas chez les femmes sont entre 0,01 et 10,7 par 100 000 personnes. L'incidence des cas de cancer est la plus élevée dans le nord de l'Europe, et l'incidence la plus basse est en Afrique (Mail et al., 2016). Le taux de mortalité globale des cancers localisés dans le système nerveux est de 3.4 par 100 000 personnes (Khodamoradi et al., 2017).

### 1.2.1 Catégorisation des tumeurs en fonction de leur origine

Les tumeurs peuvent être des tumeurs primaires ou les tumeurs métastatiques. Les tumeurs primaires

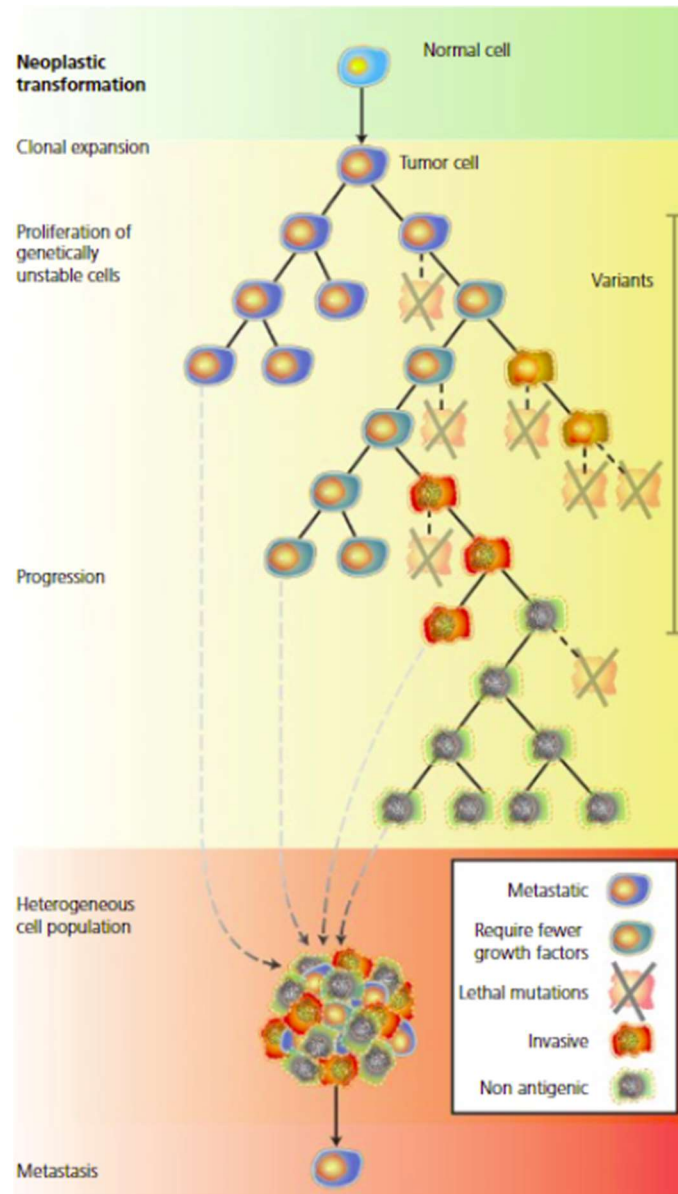


Figure 1.2 : Formation des tumeurs possédant une population hétérogène de cellules. La cellule tumorale est formée à partir d'une cellule saine grâce à une mutation. La prolifération incontrôlée résultera à la formation de nouvelles cellules qui sont génétiquement instables, ce qui mène à la formation de nouvelles cellules cancéreuses phénotypiquement différentes. Toutes ces cellules constitueront la tumeur maligne. Certaines d'entre elles vont ensuite métastaser. (Cullen, J. M., & Breen, M., 2016)

représentent les tumeurs qui se sont formées dans le SNC (Fox et al., 2011; Lapointe et al., 2018). Les tumeurs métastatiques représentent des tumeurs qui ne se sont pas formées dans le SNC à l'origine. Ce sont des tumeurs qui viennent de plusieurs types de cancer tels que le cancer des poumons, du sein, de la peau, des reins et du tube digestif (Posner, 1996; Sawaya et al., 2012; Weinberg et al., 2001).

Les tumeurs cérébrales sont classifiées en fonction du type de cellules d'où elles proviennent. La majorité des tumeurs du SNC sont des gliomes (Lapointe et al., 2018). Ces dernières représentent 81% des tumeurs malignes (Ostrom et al., 2014), et elles représentent la majorité des tumeurs primaires (Ostrom et al., 2013). Les gliomes sont formés lorsque les cellules gliales du SNC ont une multiplication incontrôlée. Les cellules gliales sont des cellules autres que les neurones dans le SNC (Jessen, 2004). Cela comprend les astrocytes, les oligodendrocytes et les épendymes. Ce sont elles qui formeront des astrocytomes, des oligodendrocytomes et des épendymomes respectivement. Il existe aussi des oligoastrocytomes (mélange de gliomes) et des gliomes qui ne sont pas spécifiés (Ostrom et al., 2016; Shergalis et al., 2018).

Cependant, il n'y a pas de définition standard pour les gliomes (Ostrom et al., 2016). C'est pour cela que des tumeurs comme les médulloblastomes, des types de tumeur qui sont constitués de cellules neuronales, de gliomes et de cellules musculaires (Valtz et al., 1991), des gangliomes anaplastiques, des types de tumeur qui possèdent des cellules neuronales et des cellules gliales (Lucas et al., 2015), et les plexus choroïdes du papillome, des types de tumeur dont les cellules épithéliales sont des cellules gliales (Wolburg & Paulus, 2010), peuvent entrer dans la catégorie de gliomes (Figure 1.3) (Shergalis et al., 2018).

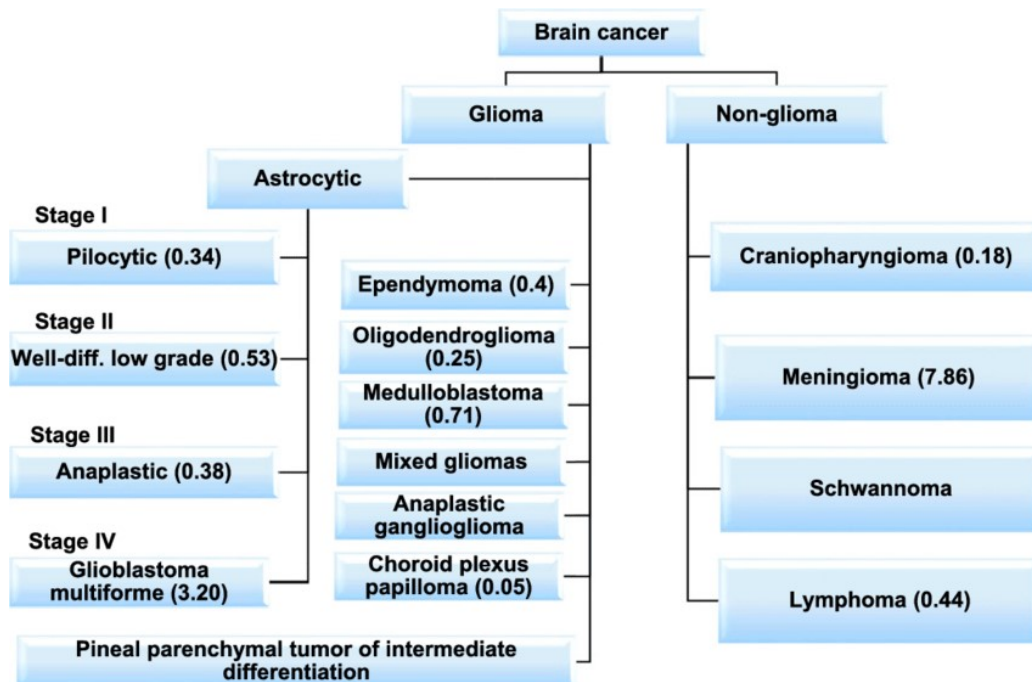


Figure 1.3 : Classification des tumeurs cérébrales. Il y a des gliomes, des tumeurs où les cellules qui les constituent viennent des cellules gliales du SNC, et il y a les tumeurs d'où les cellules ne viennent pas des cellules gliales du SNC. Les chiffres en parenthèses représentent l'incidence sur 100 000 personnes. (Shergalis, A. et al., 2018)

### 1.2.2 Classification des tumeurs en fonction de leurs mutations génétiques

Les tumeurs retrouvées dans le cerveau peuvent être classifiées en fonction du type de mutation génétique qu'elles possèdent (Lapointe et al., 2018). La première mutation possible est celle dans le gène IDH (isocitrate déshydrogénase). Celle-ci code pour des enzymes IDH, qui possèdent des rôles dans plusieurs processus métaboliques, tels que le cycle de Krebs, le métabolisme de la glutamine, la lipogenèse et la régulation réducto-oxydative (Koh et al., 2004; Badur et al., 2018; Lee et al., 2004). Une mutation dans ce gène résulte en des altérations dans le métabolisme cellulaire, ce qui initie la cancérogenèse (Han et al., 2020).

Une mutation dans le gène BRAF (homologue de l'oncogène viral du sarcome murin v-raf B1) est aussi possible. Celui-ci est un gène codant pour la protéine kinase sérine/thréonine BRAF faisant partie de la famille RAF (Maeaka & Janku, 2018). Il est un effecteur de la voie de signalisation de ERK (kinase régulée par le signal extracellulaire Ras-Raf) et la voie de protéine kinase activés au mitogène MAPK/ERK, des voies de signalisations impliquées dans la division et la différenciation cellulaire (Matallanas et al., 2011).

Il est aussi possible de classifier les tumeurs à travers la présence d'une mutation dans le gène TP53 (Lapointe et al., 2018). Ce gène code pour la protéine p53 qui est un suppresseur de tumeurs. Il est responsable de maintenir l'intégrité de l'ADN d'où son nom gardien du génome. La cellule répond à ce dommage en arrêtant son cycle cellulaire ou en initiant l'apoptose et la senescence (Fulci et al., 1998). Une mutation dans ce gène résulte en une instabilité dans le génome d'une cellule (Muller & Voudsen, 2013), et peut engendrer la progression tumorale des cancers (Leroy al., 2013).

La mutation dans le gène ATRX peut aussi contribuer à la survie des tumeur cérébrales (Park et al., 2017). Ce gène code pour une protéine qui joue un rôle dans la recombinaison, la réparation et la régulation de la transcription de l'ADN (Clynes et al., 2013). Elle est aussi responsable de remodeler la chromatine (Haase et al., 2018). Une baisse de l'expression ou une mutation de ce gène sont observées dans plusieurs types de cancers de cerveau.

Il y a aussi ce qu'on appelle la codélétion 1p/19q qui survient lorsqu'il y a une délétion du bras court du chromosome 1 (1p) et une délétion du long bras du chromosome 19 (19q) (Bradner et al., 2022). Ce phénomène pourrait être un résultat d'une translocation non-balancée entre les bras des chromosomes 1 et 19 (Jenkins et al., 2006; Griffin et al., 2006). Les effets biologiques de la codélétion ne sont pas encore

clairs, mais elle permet la cancérogenèse et elle permet la classification des tumeurs du cerveau (Mizoguchi et al., 2012).

Il y a en dernier lieu une mutation dans le gène de la reverse transcriptase du télomère humain (TERT). Celle-ci code pour la sous-unité catalytique des télomérases qui peut élonger les télomères, et ainsi maintenir l'intégrité des génome (Podlevsky & Chen, 2012). La hausse de l'activité des télomérases est une des caractéristiques principales des cancers. D'ailleurs il y a une augmentation de l'expression de TERT dans 90% des cas de cancer (Low & Tergaonkar, 2013; Shay & Bacchetti, 1997; Shay et al., 2001).

#### 1.2.2.1 Classification des gliomes

Les gliomes peuvent être caractérisés en fonction du taux de croissance des cellules cancéreuses. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) les a classés en 4 grades différents (I, II, III et IV) Les grades I et II regroupent les tumeurs de bas grade et les grades III et IV regroupent les tumeurs de haut grade (Weller et al., 2015). La nouvelle classification de 2021 permet la ségrégation des tumeurs en fonction de leurs caractéristiques histologiques et moléculaires (Louis et al., 2021). Cette classification est une mise à jour de la classification établie en 2016 (Louis et al., 2016).

Les gliomes de grade I sont des tumeurs circonscrites. Des tumeurs circonscrites sont des tumeurs dont la démarcation entre la masse et les tissus environnants est claire (Qin et al., 2014). Ces dernières sont majoritairement des tumeurs bénignes et il est possible de les exciser. Celles-ci ne possèdent pas la mutation IDH. Les patients ayant ce type de tumeurs ont les meilleurs pronostics (Louis et al., 2016).

Ensuite, il y a les tumeurs diffuses. Il n'y a pas de démarcation claire entre les tumeurs et les cellules saines alors la chirurgie n'est pas suffisante pour retirer ces types de tumeurs. Cette catégorie regroupe les tumeurs de grades II, III et IV. Les tumeurs seront alors classées en fonction de leurs propriétés histologiques. Les tumeurs de grade II ont habituellement une atypie nucléaire, et les tumeurs de grade III ont habituellement une augmentation de la division cellulaire (Louis et al., 2016). Comparé aux tumeurs de grade I, ces dernières possèdent la mutation dans le gène IDH et peuvent avoir des mutations dans les gènes TP53 et ATRX (Eckel-Passow et al., 2015; Batista et al., 2016). Les pronostics des patients atteints de ces types de cancer peuvent varier entre 2 à 12 ans (Lapointe et al., 2018).

Il y a par la suite les tumeurs de grade IV. Celles-ci ont soit une augmentation de la prolifération microvasculaire, soit une nécrose ou les deux. Le pronostic est habituellement de 5 ans (Eckel-Passow et al., 2015; Batista et al., 2016). Les tumeurs de grade IV regroupent aussi les glioblastomes (GBM). La majorité d'entre elles ne possèdent pas la mutation du gène IDH. Celles qui possèdent la mutation viendraient des tumeurs ayant des grades plus faibles qui possédaient déjà la mutation avant qu'elles se transforment en GBM. Ces tumeurs seraient des tumeurs secondaires (Ohgaki et al., 2004; Ohgaki & Kleihues, 2007), et elles possèdent un meilleur pronostic que les GBM qui ont la forme wild type (WT) du gène IDH. De plus une mutation dans le gène IDH et une codélétion 1p/19q permet aussi un meilleur pronostic. Une mutation dans le gène TERT affaibli le pronostic (Eckel-Passow et al., 2015).

### 1.3 Les glioblastomes

Le GBM est le type de gliome le plus agressif. Celui-ci fait partie du grade IV parmi les types de gliomes, et le taux de survie après 5 ans est de 5% (Tamimi & Juweid, 2017). Les GBM se retrouvent habituellement dans les lobes frontaux, temporaux, pariétaux and occipitaux du cerveau (Chakrabarti et al., 2005).

L'âge moyen des personnes atteintes de cette maladie est de 64 ans. L'incidence augmente chez les personnes âgées de 65 à 84 ans, mais elle diminue chez les personnes de 85 ans et plus (Ostrom et al., 2013). L'âge moyen et médian pour le diagnostic des GBM primaires sont de 55 ans et 64 ans, et l'âge médian des glioblastome secondaires (ou métastatiques) est de 40 ans (Ostrom et al., 2013; Chakrabarti et al., 2005; Wilson et al., 2014). En général, l'incidence de GBM aux États-Unis est plus élevée chez les hommes (Thakkar et al., 2014).

Les GBM sont constitués de trois types de cellules : les cellules souches neuronales, les astrocytes dérivés des cellules souches neuronales ainsi que les cellules précurseurs des oligodendrocytes. L'expression des marqueurs présents à la surface des cellules ainsi que la morphologie cellulaire des GBM sont similaires aux cellules normales du SNC, et leurs profils génétiques sont similaires (Yao et al., 2018). De plus, une étude sur les GBM chez des souris a démontré que plusieurs types de cellules du SNC tels que les cellules souches neuronales (Zhu et al., 2005), les astrocytes dérivées des cellules souches neuronales (Chow et al., 2011) ainsi que les cellules précurseurs d'oligodendrocytes sont capables de se développer en GBM (Figure 1.4) (Lui et al., 2011). À cause de cela, les GBM sont aussi connus sous le nom de GBM multifformes (Soeda et al., 2015).

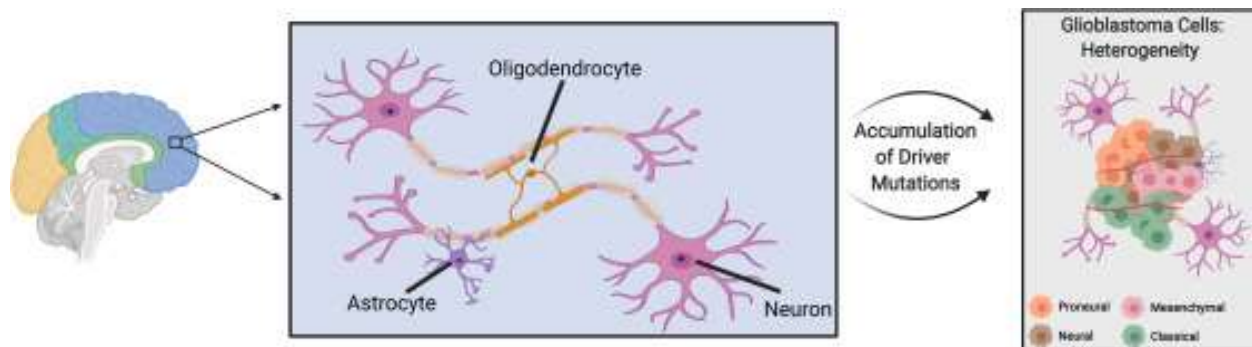


Figure 1.4 : Origine des glioblastomes. Les glioblastomes peuvent venir des astrocytes, des oligodendrocytes et/ou des cellules neuronales qui vont subir des mutations qui mène à la cancérogenèse. (Wu, W. et al., 2021)

### 1.3.1 Caractéristiques pathologiques des glioblastomes

Les GBM possèdent plusieurs caractéristiques qui permettent la progression tumorale (Figure 1.5). Une de ces caractéristiques est la prolifération cellulaire incontrôlée qui est due aux mutations génétiques que les cellules peuvent avoir. Les mutations permettent aussi de maintenir la survie cellulaire (Greaves & Maley, 2012; Merlo et al., 2006).

Une autre caractéristique des GBM est leur atypie cellulaire. En effet, leur noyau a une forme ovale ou allongée, et les chromatines sont hyperchromatiques (plus foncées que d'habitude) et sont agglomérées ensemble. Le ratio noyau/cytoplasme dans les cellules est plus élevé que d'habitude, et il y a aussi un pléomorphisme nucléaire (irrégularités dans la forme et la taille des noyaux) (Schult et al., 2005).

La vascularisation autour des GBM est aussi très élevée (G Linkous & M Yazlovitskaya, 2011). Les nouveaux vaisseaux formés sont morphologiquement similaires à des glomérules rénaux. Les cellules endothéliales qui constituent les vaisseaux sanguins sont différents des cellules épithéliales des vaisseaux sanguins normaux. En effet, celles-ci se superposent l'une sur l'autre, ont une hyperplasie, et sont hétérogènes au niveau de leurs formes et leurs tailles. La surface des vaisseaux sanguins possède des péricytes, ce qui empêche le contact avec les astrocytes. Sans le contact avec les astrocytes, les péricytes ne peuvent pas créer la barrière encéphalo-rachidienne (Rojiani & Dorovini-Zis, 1996; Ballabh et al., 2004; Cleaver & Melton, 2003). De plus, les GBM possèdent des thrombus vasculaires (coagulation du sang) ce qui endommage les cellules épithéliales. Le dommage aux vaisseaux sanguins permet l'extravasation des globules rouges (Saima & Anwar, 2006).

Les GBM possèdent aussi des régions nécrotiques. Il y a deux types de régions nécrotiques. Le premier type consiste en la présence d'une région qui se retrouve au centre de la tumeur, ce qui résulte à un faible apport sanguin. Ce phénomène est observé dans les tumeurs primaires. Le deuxième type est lorsqu'il y a plusieurs petits centres nécrotiques dans la tumeur. Cela peut arriver dans les tumeurs primaires et secondaires. Ces centres nécrotiques sont entourés par de pseudo-palissades (Kleihues, P. et al., 2000). Ces derniers sont des régions où il y a une haute cellularité (Brat, D. J. et al., 2004).

Les pseudo-palissades peuvent être de 30 à 1500  $\mu\text{m}$  de largeur et de 50 à 3500  $\mu\text{m}$  de longueur. Les pseudo-palissades de moins de 100  $\mu\text{m}$  ne sont pas en proximité des centres nécrotiques. Cependant, plus les pseudo-palissades sont volumineuses, plus il y a des chances qu'un centre nécrotique y soit présent. C'est le cas pour celles dont la tailles sont plus de 500  $\mu\text{m}$ . Leurs centres nécrotiques possèdent des lumières vasculaires qui sont soit viables, en train de dégénérer ou ont subi une thrombose (Brat et al., 2004).

En sachant les aspects qui permettent la progression tumorale des GBM, il est important de traiter les personnes atteintes de ce type de cancer. Pour le moment, les traitements utilisés ne sont pas suffisants pour éradiquer complètement celles-ci.

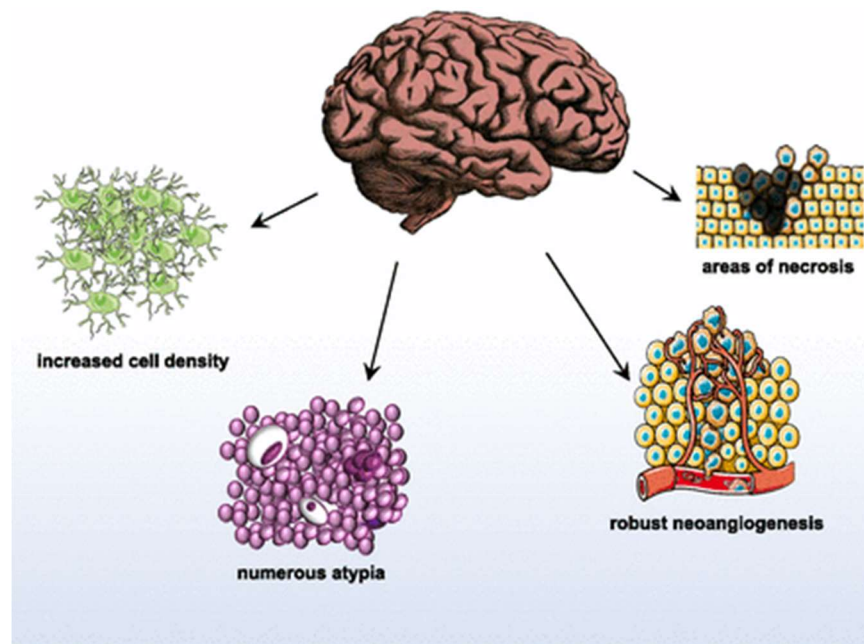


Figure 1.5: Résumé des caractéristiques des glioblastomes. (Shergalis, A. et al., 2018)



## 1.4 Traitements actuels pour les glioblastomes

L'objectif des traitements utilisés pour traiter les GBM a pour but d'éradiquer le plus possible la tumeur. Ceci peut se faire en excisant la tumeur. Cela peut se faire aussi en utilisant la chimiothérapie qui consiste à utiliser des molécules afin d'attaquer l'ADN des cellules cancéreuses et ainsi engendrer la mort cellulaire de celles-ci. Sinon, il est possible d'utiliser la radiothérapie où le but est aussi de tuer les cellules cancéreuses.

### 1.4.1 Chirurgie

Une chirurgie peut être envisageable dépendant de la localisation de la tumeur. Dans certains cas, faire une chirurgie permet de confirmer un diagnostic de la tumeur, d'améliorer le pronostic, et d'identifier les différentes mutations qui y sont présentes (Lacroix et al., 2001). Cependant, ce type de traitement n'est pas suffisant pour traiter une personne malade car les GBM ont la capacité de s'infiltrer dans des endroits qui ne sont pas accessibles. D'ailleurs, la médiane de survie est de 3 à 6 mois (Davis et al., 1998). À cause de cela, il est envisageable de combiner la chirurgie avec d'autres méthodes telle que la radiothérapie et la chimiothérapie.

### 1.4.2 Chimiothérapie

#### 1.4.2.1 Témzolomide

Le premier agent chimiothérapeutique est le témzolomide (TMZ). Cette molécule a été acceptée comme traitement par le *Food and Drug Administration* (FDA) en 2005. Son rôle est d'alkyler ou de méthyle l'ADN, plus spécifiquement les résidus de guanines aux positions O-6 et N-7 (Stupp et al., 2014). Habituellement, le traitement au TMZ est combiné avec la radiothérapie. Cette combinaison augmente le temps de survie moyen jusqu'à 14,6 mois comparé à 12,1 mois avec la radiothérapie uniquement (Stupp et al., 2005).

Il est recommandé par le ESMO (European Society of Medical Oncology) que le TMZ soit administré à tous les jours avec une radiothérapie qui est donnée 5 jours par semaines aux 4 semaines avec 6 cycles de radiation (Stupp et al., 2014).

#### 1.4.2.2 Carmustine

La Carmustine est un agent alkylant approuvé par la FDA en 2002. Le rôle de la Carmustine est de former des liens entre deux nucléotides dans le côté intérieur de l'ADN afin d'éviter la réplication de celui-ci (Xing,

et al., 2015). Son utilisation a permis d'augmenter la médiane du taux de survie (11,6 à 13,8 mois). Cependant, l'utilisation de ce type de traitement peut engendrer une fuite du liquide céphalo-rachidien à cause de la pression qui est exercée sur l'œdème du cerveau (Westphal et al., 2006).

#### 1.4.2.3 Lomustine

La lomustine est un composé alkylant nitrosouré dont le rôle est de faire des liens alkyl entre deux nucléotides dans un même brin d'ADN. Ce traitement est idéal parce qu'il peut pénétrer facilement la barrière hémato-encéphalique grâce à sa forte solubilité lipidique (Cheng et al., 1972; Baer et al., 1993). De plus, une étude qui est dans sa troisième phase d'essai clinique a prouvé que la combinaison de la lomustine avec le TMZ permet d'augmenter le temps de survie des patients. Le temps de survie en général est de 31,4 mois lorsque le TMZ seul a été utilisé. Cependant, le temps augmente à 48,1 mois lorsque la lomustine est ajoutée par la suite (Herrlinger et al., 2019).

#### 1.4.2.4 Cyclophosphamide

Le rôle du cyclophosphamide (CPA) est de créer des liens alkyls en utilisant son métabolite phosphoramidate moutarde. Celui-ci peut créer des liens croisés, ce qui empêche l'ADN de fonctionner comme il faut. Par conséquent, les cellules cancéreuses ne peuvent plus croître et se reproduire (Chamberlain & Tsao-Wei, 2004; Chamberlain & Tsao-Wei, 2006).

Une étude en phase II sur le CPA a démontré que le temps de survie sans progression (progression free survival) peut augmenter. Le temps de survie sans progression est défini comme le temps entre le début d'une tâche à faire (dans le cas du cancer, le début de l'administration du traitement en question) et le décès du patient (Gutman et al., 2013). Dans le cas de l'étude, le CPA a permis un temps de survie sans progression de 20% lorsqu'il y a un GBM qui ne répond plus au TMZ, et un de 30% avec les astrocytomes anaplastiques (Chamberlain & Tsao-Wei, 2004). La figure 1.6 résume les mécanismes utilisés par les traitements chimiothérapeutiques.

#### 1.4.3 Radiothérapie

La radiothérapie est une technique couramment utilisée pour traiter le cancer. 50% des patients atteints de cancer recevront une radiothérapie. Le but de la radiothérapie est de tuer les cellules cancéreuses. Pour ce faire, la radiation émise vers les cellules sera une radiation ionisante. Les particules vont entrer dans les cellules pour ensuite soit la tuer, ou endommager son ADN (Baskar al., 2012). La radiation peut cibler

malheureusement autant les cellules cancéreuses que les cellules saines, mais il est plus facile pour les cellules saines de se rétablir lorsque leur ADN est endommagé. Ce n'est cependant pas le cas pour les cellules cancéreuses, alors elles ne pourront pas se diviser et elles seront tuées. Malgré cela, le but de la radiothérapie sera toujours d'éviter le plus que possible les cellules saines (Begg et al., 2011).

Si la radiothérapie est combinée avec la chirurgie, son but sera de réduire la taille de la tumeur lorsqu'elle sera utilisée avant. Si une chirurgie est effectuée avant, la radiothérapie sera utilisée pour éliminer les dernières cellules cancéreuses (Baskar et al., 2012). L'unité utilisée par le système international pour mesurer la radiation émise est le Gray (Gy), qui signifie joule/kilogrammes (Einstein, A. J. et al., 2007).

Pour les patients de 70 ans et moins, la radiothérapie est combinée avec la TMZ. La radiothérapie devrait être démarrée le plus tôt possible afin d'avoir des meilleurs résultats. Habituellement, la radiation partielle est recommandée pour traiter le GBM. Celle-ci est effectuée après la chirurgie et le type de radiation utilisée est la radiation à rayonnement externe. La dose utilisée est de 60 Gy, et ce à des fractions de 2 Gy qui est administré sur 6 semaines (Sulman et al., 2017).

La radiothérapie hypofractionnée est recommandée pour les patients de plus de 70 ans. Cette technique de radiothérapie a permis un temps de survie jusqu'à 20 mois (Jastaniyah et al., 2013). Elle permet de limiter la repopulation des tumeurs, d'augmenter la mort cellulaire et de réduire le temps de traitement en général (Budach et al., 1997; Hingorani et al., 2012).

Une des façons d'utiliser cette technique selon une étude serait d'administrer 60 Gy en 20 fractions. Selon l'étude, cette technique aurait permis que le taux de survie après un an soit de 40% avec un temps de survie sans progression de 5,2 mois. De plus, de la toxicité accrue limitée dans l'œdème du cerveau a été présente chez 2 patients seulement (Sultanem et al., 2001). Cependant, il n'y a pas de méthode fixe de radiothérapie hypofractionnée pour les patients de plus de 70 ans. Il y a encore beaucoup de recherche qui sont en cours.

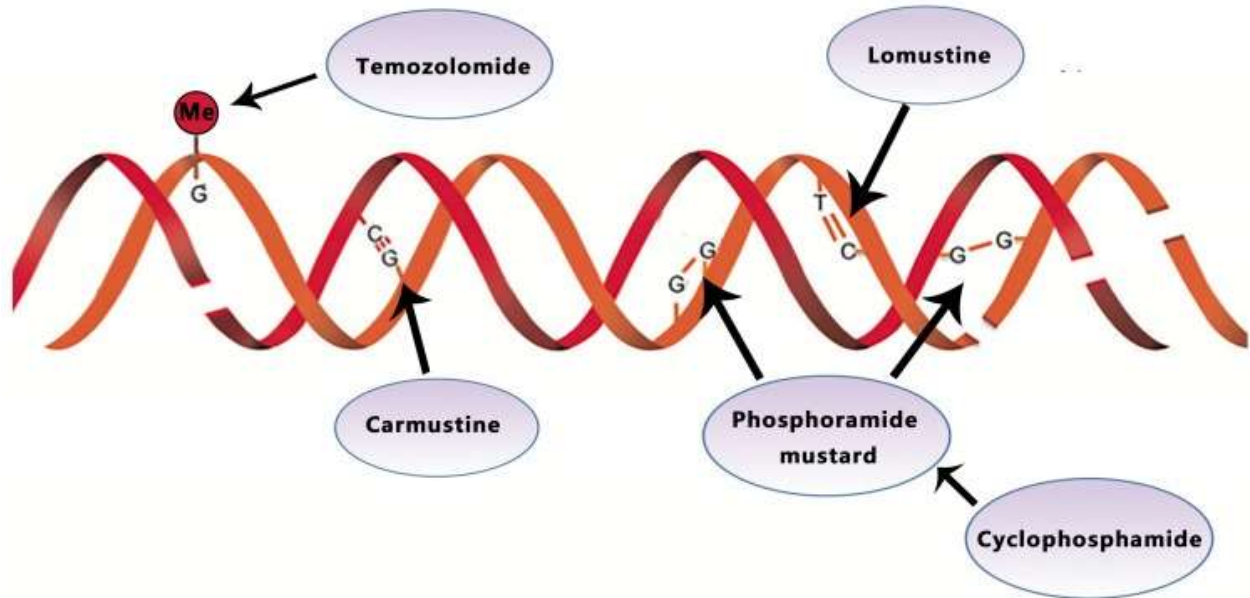


Figure 1.6: Résumé des mécanismes utilisés par les traitements chimiothérapeutiques. (Zhang, H. et al., 2019)

#### 1.4.4 Les défis à surmonter pour le traitement des glioblastomes

Malgré tous les traitements possibles, il y a plusieurs facteurs qui rendent le traitement des GBM plus difficile. Un de ces facteurs est la barrière hémato-encéphalique. Celle-ci est composée de cellules endothéliales où il y a très peu de fenestrations et de vésicules endocytaires. Cependant, il y a beaucoup de jonctions serrées entre les cellules endothéliales (Rubin & Staddon, 1999; Wolburg & Lippoldt, 2002). La barrière hémato-encéphalique est aussi renforcée avec des astrocytes et des péricytes. Le tout forme un réseau de capillaires qui empêche l'entrée des molécules présentes en circulation dans le cerveau (Van Tellingen et al., 2015; Hendricks et al., 2015). Puisque la barrière a une faible perméabilité (Lipinski et al., 2012), les molécules pouvant atteindre le cerveau sont des molécules qui ont une meilleure solubilité lipidique et qui sont plus petites (Wong et al., 2013). Par exemple, la TMZ a une pénétration relative de 20% lorsqu'elle est administrée oralement à cause de sa petite taille et ses propriétés lipophiliques (Agarwala & Kirkwood, 2000; Ostermann et al., 2004). De plus, les cellules endothéliales qui constituent la barrière hémato-encéphalique possèdent des protéines qui inhibent l'entrée des drogues vers les tumeurs (Van Tellingen et al., 2015; Hendricks et al., 2015; Miller et al., 2008).

Un autre aspect qu'il faut considérer lors du traitement des GBM est l'hétérogénéité des cellules qui constituent une tumeur. En effet, un ensemble de cellules d'une tumeur peuvent avoir des mutations différentes que d'autres cellules constituant la même tumeur (Sunderl et al., 2011). De plus, une étude effectuée par Sottoriva et al. a démontré que parmi 38 fragments venant de 9 patients ayant un GBM, certaines altérations au niveau de l'ADN étaient seulement présentes dans certaines cellules composants les tumeurs (Sottoriva et al., 2013). Alors, il est important de trouver un traitement capable d'agir sur plusieurs altérations génétiques à la fois.

Un troisième aspect important à considérer du traitement de GBM est la présence de cellules souches cancéreuses (CSC). Celles-ci sont différentes des autres cellules cancéreuses pouvant constituer un GBM et elles peuvent contribuer à la survie de la tumeur (Kreso & Dick, 2014).

## 1.5 Les cellules souches

Les cellules souches sont des cellules qui ne sont pas encore différenciées. Ces dernières vont éventuellement devenir des cellules différenciées dans les tissus des organes. Leurs caractéristiques principales sont : la capacité de s'auto-renouveler (très forte prolifération), de se cloner (le clonage commence à partir d'une seule cellule), et dans l'habileté de se différencier en plusieurs types de cellules. Elles sont présentes dans les stades fœtal, embryonnaire, et adulte chez l'humain. Dans les stades post-natal et adulte, les cellules souches sont présentes dans des organes différenciés et elles y jouent un rôle dans la réparation des tissus à la suite d'une blessure. (Coonley et al., 2005; Vats et al., 2005).

### 1.5.1 Les cellules souches cancéreuses

Les CSC ont été identifiées dans plusieurs types de cancer tel que la leucémie (Lapidot et al., 1994), le cancer du sein (Al-Hajj et al., 2003) et le cancer du cerveau (Singh et al., 2003). Les CSC seraient responsables de la résistance de certains types de cancer à la chimiothérapie et de la radiothérapie (Kreso, & Dick, 2014), de la métastase, et elles sont capables d'éviter la mort cellulaire (Kreso, et al., 2013). Tout comme les cellules souches, les CSC peuvent aussi s'auto-renouveler (Clarke et al., 2006).

Les CSC résideraient dans un micro-environnement qui serait essentiel à leur fonctionnement. Ces micro-environnements sont connus sous le nom de niche (Ju et al., 2022). Les cellules souches matures résident dans celles-ci en attendant qu'elles deviennent des cellules différenciées. On peut retrouver des niches

pour cellules souches dans plusieurs tissus épithéliaux, tels que l'intestin, ainsi que dans les systèmes neuronaux, épidermiques et hématopoïétiques (Voog & Jones, 2010). Il y a aussi des niches pour les CSC. On peut y trouver entre autres des cellules cancéreuses, des cellules stromales et endothéliales, de la matrice extracellulaire (MEC), des vaisseaux sanguins (Chen et al., 2013; Mohyeldin et al., 2010) et des exosomes (Battle & Clevers, 2017; Yi et al., 2013). Deux modèles ont été proposés afin d'expliquer la formation des CSC, et de l'hétérogénéité que les cellules peuvent avoir (Figure 1.7).

Il y aurait en premier lieu le modèle hiérarchique. Dans ce modèle, tout commencerait avec une cellule souche qui n'a plus de régulation, ce qui donne naissance à une CSC. La cellule en question fera partie d'une population distincte des cellules cancéreuses conventionnelles. Les cellules comme celles-ci ne survivent pas pour longtemps mais elles peuvent s'auto-renouveler de façon incontrôlée (Kreso & Dick, 2014). Par conséquent, le seul moyen d'éradiquer complètement le cancer est d'éliminer les CSC qui seraient responsables de créer des tumeurs malignes.

Le deuxième modèle est le modèle stochastique. Le principe de ce modèle est que n'importe quelle cellule présente dans une tumeur peut faciliter l'initiation et la progression tumorale. Selon ce modèle, le micro-environnement tumoral est seulement un facteur qui contribue à l'initiation d'une tumeur (F Quail et al., 2012). Ce phénomène serait dû à une ou plusieurs mutations génétiques dans une cellule qui contribuerait à une prolifération incontrôlée, ce qui résulterait en l'apparition d'une tumeur maligne (Greaves & Maley, 2012; Burrell, et al., 2013).

De plus, le modèle hiérarchique et le modèle stochastique seraient reliés ensemble à cause de la plasticité phénotypique des CSC. Ce phénomène arrive lorsque les cellules cancéreuses peuvent se transformer en CSC, et vice-versa. Cela peut permettre la survie à long terme des cellules cancéreuses (F Quail et al., 2012; Chaffer & Weinberg, 2015).

### 1.5.2 Les cellules souches de glioblastomes

Les cellules souches de GBM sont des cellules souches cancéreuses (CSC) qui se retrouvent dans les gliomes malins. Celles-ci peuvent se différencier en astrocytes, oligodendrocytes et en neurones (Huang et al., 2010). Selon la littérature, il n'y aurait pas d'origine fixe des cellules souches de GBM. En effet, des cellules cancéreuses peuvent se transformer en cellules souches de glioblastomes à travers des altérations

généétiques (Huang et al., 2010). De plus, il y a la possibilité que les cellules de GBM se transforment en cellules souches grâce à la plasticité cellulaire des cellules cancéreuses (Gao et al., 2014). Des changements

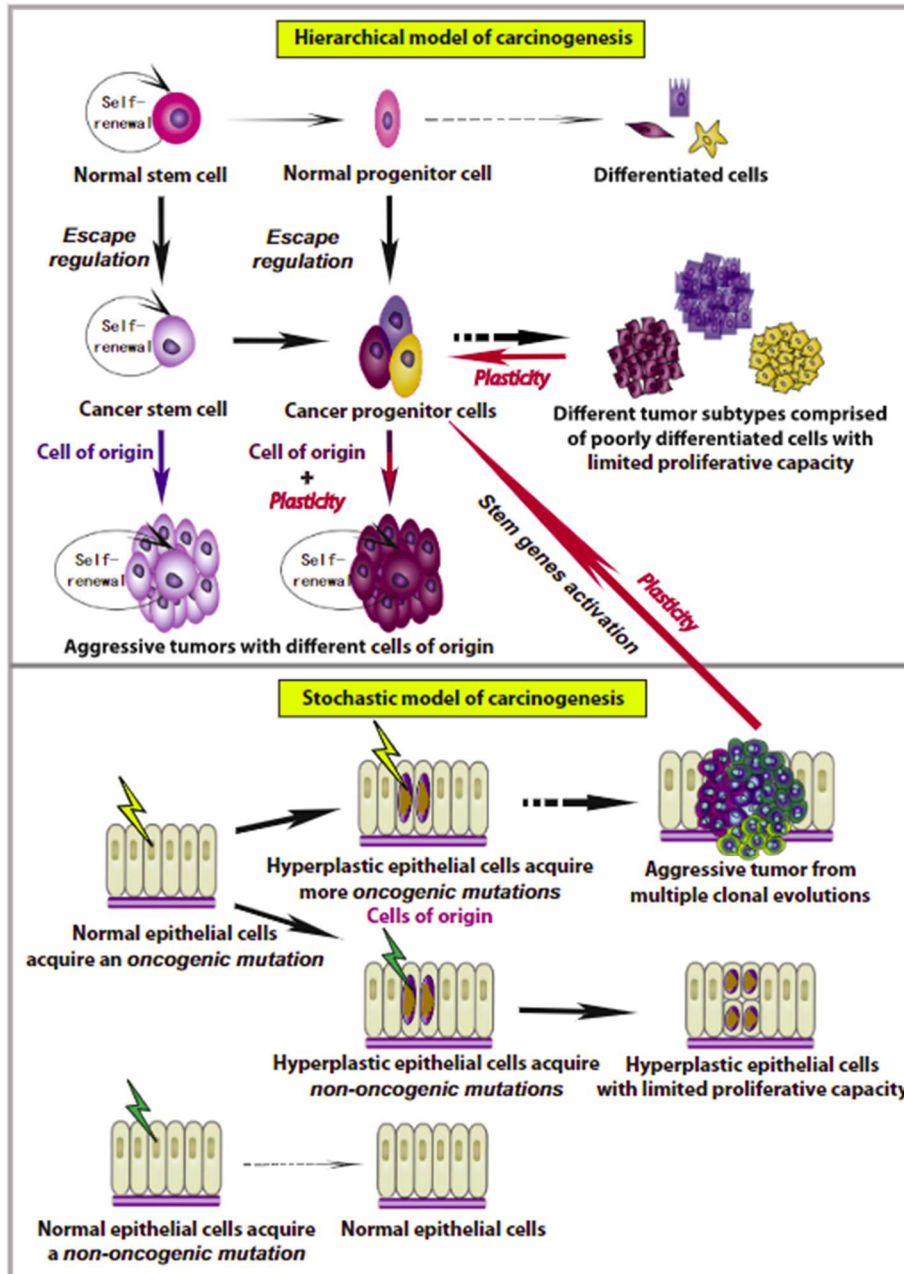


Figure 1.7: Mécanismes pouvant amener à la formation des cellules souches cancéreuses de glioblastomes. (Plaks, V., Kong, N., & Werb, Z., 2015)

dans le micro-environnement où les cellules sont localisées tels que la déprivation en nutriments et

l'hypoxie peuvent engendrer des changements menant à l'apparition des CSC de GBM (Heddleston et al., 2009; Heddleston et al., 2010).

#### 1.5.2.1 Les caractéristiques des cellules souches de glioblastomes

Les caractéristiques de ces cellules sont : l'auto-renouvellement (Huang et al., 2010), la pluripotence, la formation de neurosphères (Cruceru et al., 2013), la prolifération, la modulation de la réponse immunitaire (Huang, Z. et al., 2010), la différenciation cellulaire et le haut taux de mortalité (Gilbert & Ross, 2009; Schiffer et al., 2014). L'invasion est une autre caractéristique des CSC de GBM. En effet, une recherche a démontré *in vitro* et *in vivo* que ces dernières ont une capacité d'envahir davantage les tissus normaux que les tumeurs qui n'ont pas de cellules souches cancéreuses (Cheng et al., 2011).

L'hypoxie est aussi un aspect important pour les cellules souches de GBM. Un faible taux d'oxygène est associé à la maintenance des cellules non-différenciées. Alors, une hypoxie permet d'augmenter la proportion de cellules souches de GBM ainsi que l'expression de marqueurs à CSC. Elle permet aussi la formation d'un phénotype de CSC qui, par conséquent, engendre l'angiogenèse. De plus, la présence de régions hypoxiques et nécrotiques signifie que les tumeurs sont plus agressives (Huang et al., 2010; Mason, & Ratcliffe, 2014). D'ailleurs, il y a des chances que les CSC résident dans des niches périvasculaire où le taux d'oxygène est faible (Heddleston et al., 2009).

#### 1.5.2.2 Génotype des cellules souches de glioblastomes

Les cellules souches de GBM ont des gènes qui sont souvent surexprimés. Ils vont servir de marqueurs afin de les identifier parmi toutes les autres cellules cancéreuses. Les marqueurs sont par conséquent exprimés dans les cellules qui sont résistantes aux traitements thérapeutiques (Figure 1.8). Un des gènes qui peut être utilisé comme marqueur à CSC est le gène qui code pour la prominin1 (CD133). La CD133 est une glycoprotéine qui se situe au niveau de la membrane des cellules, et est utilisée comme marqueur de la surface cellulaire (Singh et al., 2003). Son rôle dans les cellules normales et dans les cellules cancéreuses n'est pas très bien défini (Brescia et al., 2013).

Cependant, l'expression de la protéine CD133 peut beaucoup varier dans les gliomes. De plus, il est toujours possible d'avoir des gliomes dépourvus de la protéine CD133 qui peuvent s'autorenouveler comme des CSC (Beier et al., 2007). À cause de cela, il est conseillé de regarder l'expression de plusieurs



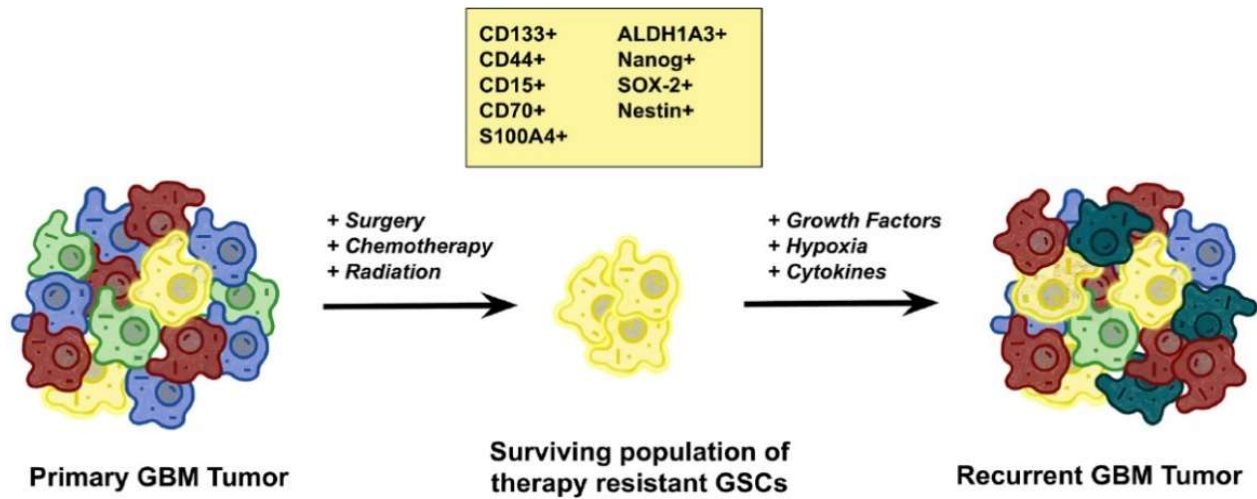


Figure 1.8: Résistance des cellules souches de glioblastomes aux traitements thérapeutiques. Les tumeurs sont traitées par chimiothérapie, radiothérapie et/ou par chirurgie. Les CSC de glioblastomes survivent la thérapie, ce qui facilite la récurrence des glioblastomes. (Singh, N. et al., 2021)

marqueurs à la fois. D'autres gènes qui peuvent être utilisés comme marqueurs sont les facteurs de transcription SOX2 et NANOG. SOX2 (Sex-determining region Y (SRY) – box 2) joue un rôle dans la maintenance des cellules souches dans les tissus, et elle est aussi très sollicitée dans la phase embryonnaire (Kamachi & Kondoh, 2013). Elle joue aussi un rôle dans la maintenance des CSC dans plusieurs tissus, incluant le cerveau. Il y a un lien entre l'expression de cette dernière et la maintenance des CSC des GBM (Gangemi et al., 2009; Garros-Regulez et al., 2016).

NANOG (Homeobox protein Nanog) est un facteur de transcription qui joue un rôle dans la pluripotence des cellules souches embryonnaires (Ye et al., 2021). De plus, il rend les CSC plus malignes. Il y a en effet un lien entre la surexpression de NANOG et la présence des traits propres aux CSC dans des cellules cancéreuses (Seo et al., 2017; Yadav & Shankar, 2019; Guo et al., 2019). Une étude récente a démontré que la surexpression de NANOG permettrait la progression tumorale des CSC de glioblastomes (Ye et al., 2021). Il y a plusieurs autres gènes dont l'expression est élevée dans les cellules souches de GBM en général tels que CD15, A2B5, L1CAM, et Oct3/4 (Huang et al., 2010; Gilbert & Ross, 2009).

### 1.5.2.3 Phénotype des cellules souches cancéreuses de glioblastome

La présence de différents facteurs environnementaux, de la plasticité cellulaire, ainsi que les différentes altérations génétiques vont faire en sorte que plusieurs phénotypes de CSC de GBM sont possibles. À cause de cela, il est difficile de définir le phénotype typique des CSC de GBM (Gimple et al., 2019).

### 1.5.2.4 Les mécanismes de chimiorésistance des cellules souches de glioblastomes

La résistance aux traitement anticancéreux des cellules souches des GBM contribue à la récurrence du cancer du cerveau après un traitement. Cela est dû à l'hétérogénéité des cellules au sein d'une tumeur ainsi que la plasticité de celles-ci. Les CSC de GBM sont capables de se rétablir après une haute dose de radiothérapie. Une analyse histologique de cellules avant et après une radiation a prouvé que la quantité de cellules qui exprimaient la protéine CD133 après le traitement augmente de façon significativement. Cela voudrait donc dire que la CD133 serait utile pour la résistance à la radiothérapie (Tamura et al., 2010).

Il y a aussi un lien entre l'expression de CD133 dans les cellules souches de GBM et la résistance au TMZ. Comme il a été mentionné auparavant, le but du TMZ est de former des liaison alkyls dans les brins d'ADN afin que la réplication génétique soit inhibée, ce qui amène à l'apoptose (Lee, 2019). Cependant, la présence de CD133 dans les cellules mène aussi à l'expression de MGMT, une protéine qui joue un rôle dans la réparation de l'ADN (Liu et al., 2006; Nakada et al., 2012). De plus, les cellules dont leur expression de MGMT est élevée se retrouvent au centre des tumeurs, alors elles sont moins accessibles aux traitement chmithérapeutiques (Pistollato et al., 2010).

Les cellules souches de GBM peuvent aussi résister à la TMZ à travers la surexpression des protéine anti-apoptotiques. Des gènes tels que BCL-2 (B-cell lymphoma 2), BCL2L1 (BCL2 like 1) et MCL1, sont surexprimées dans les cellules souches de GBM résistantes au TMZ (Hsieh et al., 2011). Aussi, les cellules souches de GBM peuvent être résistantes à plusieurs autres types de médicaments. Ce phénomène est possible grâce aux transporteurs ABC (ATP-binding cassette). Cela inclut les protéines MRP1 (ABCC1), MRP3 (ABCC3) et MRP4 (ABCC4), des protéines qui ont une forte expression dans les gliomes (Uribe et al., 2017). Ces protéines vont pomper les médicaments à l'extérieur des cellules (Zhang et al., 2017). De plus, les protéines MRP1, MRP3 et MDR1 (ABCB1) sont fortement exprimées dans les CSC de GBM (Uribe et al., 2017).

La protéine CD133 joue aussi un rôle dans la multirésistance. En effet, les CSC exprimant cette dernière ont une plus forte expression des protéines MRP1 et MDR1 que dans les autres cellules cancéreuses différenciées (Bi et al., 2007). De plus, la plasticité des cellules souches des GBM fait en sorte que l'expression de MRP1 dans les cellules exprimant CD133 s'élève lorsque des cellules similaires aux CSC de GBM sont traités avec le TMZ, l'étoposide et avec d'autres traitements chimiothérapeutiques (Zhang et al., 2015; Liu et al., 2015).

#### 1.5.2.5 L'étude des cellules souches cancéreuses de glioblastome

La compréhension des différentes caractéristiques des CSC de GBM nous permet de trouver des techniques afin de les étudier dans un modèle *in vitro*. La première technique serait de former des neurosphères en culture en utilisant des lignées cellulaires de GBM. Cette technique est la plus populaire. Les neurosphères ne seraient pas adhérentes, ce qui fait en sorte que la culture est en trois dimensions. Elle permettrait d'étudier l'aspect d'auto-renouvellement que les CSC de GBM possèdent (Lee et al., 2006; Wan et al., 2010).

Il existe une autre technique qui permet d'avoir une culture des cellules en trois dimensions. Elle se concentre sur la formation des sphéroïdes. Cette technique consiste à prendre plusieurs cellules individuelles. Celles-ci vont s'agglomérer, et un sphéroïde va être créée, contrairement à un neurosphère où on utilise une seule cellule qui va par la suite proliférer afin d'avoir la structure en trois dimensions (Ruiz-Garcia et al., 2020).

Étudier le cancer en trois dimensions permet la préservation de plusieurs caractéristiques biologiques des tumeurs originales dans des conditions *in vitro* (Wang et al., 2013). Il y a aussi un lien entre l'expression de la protéine CD133 avec la formation de neurosphères ainsi que les caractéristiques qu'on voit typiquement dans les CSC de GBM (Beier et al., 2007). Il est aussi possible d'identifier les CSC de GBM en vérifiant l'expressions de plusieurs autres marqueurs à CSC tels que SOX2, MYC, NESTIN, CD44, LICAM et A2B5 (Brescia et al., 2012).

Le désavantage des neurosphères est qu'elles ne peuvent pas représenter la hiérarchie cellulaire (cellules souches à CSC) (Pastrana et al., 2011), et elle ne peut pas représenter le microenvironnement qui joue un rôle dans la formation des tumeurs de CSC de GBM (Lee et al., 2006; Lathia et al., 2011).

Une deuxième manière d'étudier les CSC de glioblastomes est d'utiliser la cytométrie en flux. Cette technique permet d'analyser les cellules individuellement (Ishiguro et al., 2017). L'analyse se fait en vérifiant l'expression des marqueurs à CSC, notamment ceux qui se retrouvent à la membrane des cellules. Cela inclut la CD133 (Bar et al., 2010), l'intégrine  $\alpha 6$  (Lathia et al., 2010) et la CD15 (Galdieri et al., 2021).

## 1.6 La transition épithélio-mésenchymateuse (TÉM)

La transition épithélio-mésenchymateuse (TÉM) est un phénomène important qui est habituellement utilisé pour la guérison des blessures, le développement embryonnaire et le remodelage des tissus (Kalluri & Weinberg, 2009; Zeisberg & Neilson, 2009). La TÉM est un processus par lequel des cellules épithéliales qui se retrouvent normalement dans la membrane basale deviennent polarisées. Elles vont subir plusieurs changements biochimiques qui va leur permettre d'avoir le phénotype mésenchymateux (Figure 1.9). Les cellules auront par conséquent la capacité de migrer et d'envahir des tissus plus facilement, elles seront plus résistantes à l'apoptose, et il y aura une augmentation de l'expression de protéines de la matrice extracellulaire (MEC).

La TÉM est un phénomène qui est très commun dans les cellules cancéreuses. Elle peut rendre les cellules cancéreuses plus malignes, induire le phénotype souche (Mani et al., 2008), et elle contribuerait à la récurrence des tumeurs après un traitement de radiothérapie (Mahabir et al., 2014). Elle est notamment présente chez les tumeurs primaires lorsqu'elles vont se métastaser dans un autre tissu (Kalluri & Weinberg, 2009; Zeisberg & Neilson, 2009). Afin de créer par la suite les tumeurs secondaires, celles-ci vont reprendre le phénotype épithélial.

La TÉM est un phénomène que l'on peut observer dans les gliomes, incluant les GBM (Kahlert et al., 2013). L'acquisition du phénotype mésenchymateux fait en sorte que les tumeurs sont plus agressives et plus invasives, ce qui mène à un pauvre pronostic. Les types de GBM ayant les pronostics les plus pauvres sont les GBM ayant un phénotype mésenchymateux. Ce type de phénotype peut être obtenu à cause de la récurrence des tumeurs, c'est-à-dire que lorsque des glioblastomes non-mésenchymateuses se transforment en glioblastomes mésenchymateuses à la suite d'un traitement anti-cancéreux (Phillips et al., 2006; Verhaak et al., 2010).

Les cellules mésenchymateuses qui pourraient contribuer au développement des GBM peuvent exprimer les marqueurs de cellules souches qu'on voit dans les cellules souches neuronales, ce qui peut les rendre résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Bao et al., 2006; Bhat et al., 2013; Zhang et al., 2013).

### 1.6.1 Marqueurs de la TÉM

Il est possible de déterminer si des cellules sont en train d'acquérir le phénotype mésenchymateux à travers l'expression de certains gènes qui seront utilisés en tant que marqueurs de la TÉM. Un de ces marqueurs est le gène *SNAI1* qui code pour la protéine SNAIL. Cette protéine fait partie de la famille d'activateurs transcriptionnels SNAIL. Elle inhibe l'expression de E-cadhérine, une protéine qui est responsable de l'adhérence cellulaire, ainsi que plusieurs autres marqueurs épithéliaux (Kalluri & Weinberg, 2009; Zeisberg, & Neilson, 2009; Bouler et al., 2006). Elle permet aussi l'augmentation de l'expression de plusieurs marqueurs mésenchymateux (Cheng et al., 2012).

Un des marqueurs dont l'expression est régulée par SNAIL est le gène *FN1* qui code pour la protéine fibronectine (Cheng et al., 2012). La fibronectine est une glycoprotéine qui se retrouve à la surface des cellules (Hynes 1973). Elle régule plusieurs fonctions biologiques, dont l'adhésion cellulaire (Lin et al., 2019), la migration (Sheppard et al., 1995), et l'invasion (Lin, et al., 2019).

En général, la fibronectine engendre la métastase, ce qui contribue à la malicité des tumeurs. Dans le cas du cancer du cerveau, la fibronectine se situe habituellement dans les vaisseaux sanguins associés aux tumeurs (Kochi et al., 1983), et à l'intérieur et autour des cellules de gliomes *in situ* (Morris & Esiri, 1991).

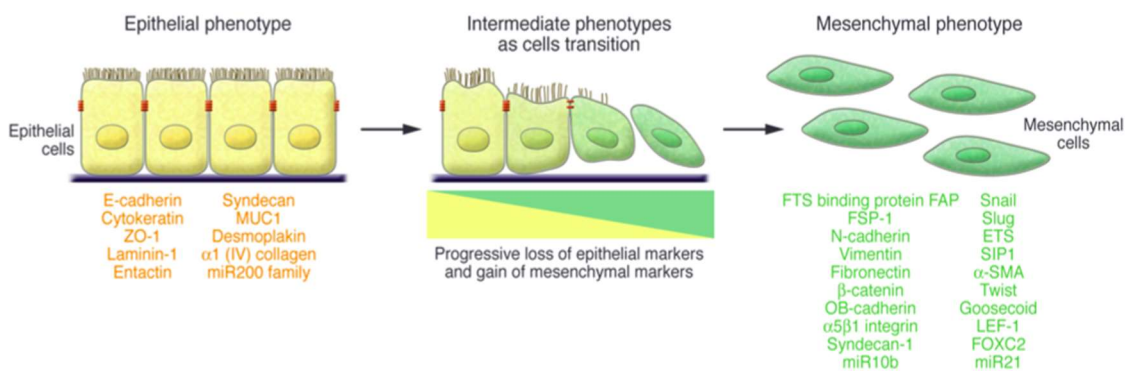


Figure 1.9: Principe de la transition épithélio-mésenchymateuse. Certains marqueurs sont plus exprimés dans les cellules épithéliales que les cellules mésenchymateuses. Leurs expressions seront réduites lorsque les cellules deviendront polarisées afin d'amorcer la TÉM. Le phénotype mésenchymateux mène à une forte expression de nouvelles protéines. (Kalluri, R., & Weinberg, R. A., 2009)

Une étude sur des cellules de gliomes *in vitro* a démontré que celles-ci peuvent migrer en réponse de la présence de la fibronectine. Cette même étude a démontré que les cellules de gliomes dans un modèle *in vivo* se concentrent vers la fibronectine (Ohnishi et al., 1991).

## 1.7 Voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale des cellules souches de glioblastomes

Les marqueurs de CSC et de la TÉM ne sont pas les seules protéines dont l'expression est élevée dans les GBM. Il y a en effet plusieurs autres protéines qui subissent une surexpression. Ces protéines sont impliquées dans des voies de signalisation qui permettent la progression tumorale. Il y a en premier lieu les voies de phosphorylation. C'est un phénomène où une protéine en particulier se fera ajouter un groupe phosphate, ce qui va soit activer ou désactiver celle-ci. La phosphorylation va par la suite engendrer une voie de signalisation qui provoquera un changement dans la cellule. Il y a aussi les voies anti-apoptotiques, ces dernières sont utilisées afin d'éviter la mort cellulaire. Il y a aussi des voies de signalisation qui sont impliquées dans la réparation de l'ADN lorsque celui-ci est endommagé.

### 1.7.1 AKT/PI3K

AKT (homologue cellulaire de l'oncogène du virus thymome akt8) est une protéine kinase de sérine/thréonine de la famille de kinase AGC. Elle joue un rôle dans la croissance cellulaire, la différenciation et la survie. L'AKT a plusieurs gènes cible qui jouent un rôle dans la mort cellulaire, la morphologie, la suppression de tumeurs ainsi que le métabolisme des cellules. La phosphorylation de l'AKT est possible grâce à la protéine PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) (Bozulic & Hemmings, 2009). Celle-ci va en premier lieu créer la molécule PIP<sub>3</sub>. La protéine PDK1 ainsi que l'AKT vont toutes les deux se lier à la PIP<sub>3</sub>. La PDK1 va par la suite phosphoryler l'AKT à la thréonine 308 (Bozulic & Hemmings, 2009; DiNitto & Lambright, 2006).

L'activation de la protéine AKT fait partie des mécanismes de la tumorigenèse (Testa & Bellacosa, 2001). Cela peut être fait à travers la protéine PI3K. En effet, une mutation dans cette protéine peut engendrer une surproduction de PIP<sub>3</sub>, ce qui peut augmenter le taux d'activation d'AKT (Hart & Vogt, 2011). De plus, une mutation dans le domaine PH, un domaine présent dans la protéine AKT qui est sollicité lors de sa liaison avec PIP<sub>3</sub>, peut aussi la suractiver (Carpten et al., 2007).

### 1.7.2 MSK1/2

MSK1 et 2 (mitogen and stress activated kinase) sont des protéines kinases. Elles possèdent 2 domaines kinase : un domaine N-terminal qui fait partie de la famille de kinase AGC et un domaine C-terminal qui fait partie de la famille de kinase de calmoduline (Caenepeel et al., 2004). La phosphorylation se fait par les protéines ERK1/2 et p38 (Deak et al., 1998; McCoy et al., 2005). Les protéines MSK1 et 2 sont localisées dans le noyau. Leur substrat sont les histones H3 et les facteurs de transcription CREB et ATF1. Elles peuvent phosphoryler la protéine CREB (Arthur, 2008), mais les mécanismes moléculaires qui régulent la phosphorylation ne sont pas encore clairs (Reyskens & Arthur, 2016).

### 1.7.3 CREB

La protéine CREB (cyclic-AMP response element binding protein) (Xiao, X. et al., 2010) est un facteur de transcription qui régule la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire (Shaywitz & Greenberg, 1999; Mayr & Montminy, 2001; Sakamoto & Frank, 2009). Afin d'être active, elle doit être phosphorylée à la sérine 133 (Shaywitz & Greenberg, 1999). La phosphorylation permettra une liaison avec la protéine CBP (CREB binding protein) afin de démarrer la transcription des gènes cibles (Mayr et al., 2001).

Plusieurs protéines peuvent phosphoryler la protéine CREB. Il y a entre autres la protéine PKA (protéine kinase A dépendant à l'AMPc), la PKC (protéine kinase C), les CaMK (calmoduline kinase) et la RSK (protéine kinase S6 ribosomique p90) (Shaywitz & Greenberg, 1999; Mayr & Montminy, 2001; Sakamoto & Frank, 2009; Brindle et al., 1993; Enslin et al., 1995; Gubina et al., 2001). Il y aurait des liens entre la formation des tumeurs ainsi que la progression tumorale avec la phosphorylation de CREB (Sakamoto & Frank, 2009).

### 1.7.4 GSK3 $\alpha\beta$

GSK3 (glycogen synthase kinase 3) est une protéine kinase sérine/thréonine qui possède plusieurs substrats. Celle-ci contient deux isoformes : l'isoforme alpha et l'isoforme beta (Sutherland, 2011). Mais elle possède une plus forte affinité pour les substrats qui sont déjà phosphorylés. (Frame et al., 2001).

La phosphorylation de la GSK3 au niveau du N-terminal mène à son inhibition. L'inhibition de la GSK3 $\alpha$  se fait en phosphorylant la sérine 21 et celle de la GSK3 $\beta$  se fait en phosphorylant la sérine 9 (Sutherland et al., 1993; Sutherland & Cohen, 1994). La phosphorylation au niveau du N-terminal empêche la GSK3 de reconnaître ses substrats qui sont déjà phosphorylés (Frame et al., 2001).

La phosphorylation de la GSK3 menant à son inhibition est faite par les protéines PKB ou la protéines p90RSK (Cross et al., 1995; Eldar-Finkelman et al., 1995). Elle peut aussi être inhibée à travers la voie de PI3K/AKT (McCubrey et al., 2012). Puisque l'activité de la protéine AKT est accentuée dans plusieurs types de cancer, la phosphorylation de GSK3 sera par conséquent accentuée aussi. En effet il y a un lien entre la présence de GSK3 et la progression tumorale dans plusieurs types de cancer, incluant le cerveau (Duda, et al., 2020).

#### 1.7.5 RSK

La famille de protéines RSK (ribosomal s6 kinase 90 kDa) représente un ensemble de protéines kinases de sérine/thréonine qui sont activées par la voie ERK/MAPK. Les protéines RSK jouent des rôles dans la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire et la différenciation cellulaire (Anjum & Blenis, 2008; Romeo et al., 2012).

RSK possède 4 isoformes (RSK 1 à 4) (Sulzmaier & Ramos, 2013). Les études démontrent que les isoformes RSK1, RSK2 contribueraient à la progression tumorale, plus particulièrement la migration des tumeurs (Fujita et al., 2003; Kang et al., 2010; Smolen, et al., 2010). L'isoforme RSK3 contribuerait aussi à la progression tumorale, mais au niveau de la prolifération et la survie cellulaire (Yoon et al., 2021; Serra et al., 2013). L'isoforme RSK4 agirait comme un suppresseur de tumeurs. En effet, la RSK peut arrêter le cycle cellulaire des cellules cancéreuses (López-Vicente et al., 2011)

#### 1.7.6 Les voies de signalisation anti-apoptotiques

L'apoptose fait partie des mécanismes que les cellules cancéreuses veulent éviter afin qu'elles puissent proliférer. Pour ce faire, des protéines anti-apoptotiques comme BCL-XL et BCL-2 sont surexprimées (Sasi et al., 2009; Zhou et al., 2011). Celles-ci font partie de la famille de protéines BCL-2. Cette famille regroupe aussi les protéines pro-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques qui contiennent uniquement des domaines BH3 (BCL-2 homology region 3) (Samali et al., 2009). De plus, elles jouent aussi un rôle dans la résistance des traitements, et une surexpression de ces protéines est synonyme d'un pauvre pronostic (Feibig et al., 2006).

Les protéines pro-apoptotiques sont responsables de perméabiliser les membranes des mitochondries (Adams & Cory, 2007). La perméabilisation va permettre le relâchement de la molécule cytochrome C, ce qui va engendrer l'apoptose. Cela est possible grâce aux protéines sensibilisantes de la famille BH3. En



effet, celles-ci vont se lier aux protéines anti-apoptotiques afin de les inhiber (Letai et al., 2002; Kuwana et al., 2005; Certo et al., 2006). De plus, les protéines activatrices de la famille BH3 vont se lier aux protéines pro-apoptotiques. Celles-ci vont s'oligomériser, et il y aura un relâchement de cytochrome C (Youle & Strasser, 2008; Moore, et al., 2007). L'apoptose est inhibé lorsque les protéines pro-apoptotiques interagissent avec les protéines activatrices de la famille BH3 afin qu'elles ne puissent pas activer les protéines pro-apoptotiques (Moore, et al., 2007).

#### 1.7.7 Poly (ADP-ribose) polymérase 1

La Poly (ADP-ribose) polymérase 1 (PARP) est une protéine nucléaire qui a plusieurs fonctions telles que la réparation de l'ADN endommagé, et l'initiation de la réparation par l'excision de base (Dantzer et al., 2000). Lorsque l'ADN est endommagé, PARP va s'associer à l'endroit endommagé, et une longue chaîne de polymères de poly(ADP ribose) sera ajoutée. Le NAD<sup>+</sup> est utilisé en tant que substrat, ce qui va causer une déplétion intracellulaire de NAD<sup>+</sup>. La protéine PARP aura par la suite une charge négative, ce qui va faire en sorte qu'elle va se dissocier du brin d'ADN afin que la réparation soit ensuite amorcée. PARP possède une forme clivée que l'on voit habituellement durant l'apoptose (Herceg & Wang, 2001).

Une surexpression de la protéine PARP a été constatée dans plusieurs type de cancers, et est un signe d'un pauvre pronostic (Liu et al., 2016; Rojo, et al., 2012). Cependant, plusieurs recherches sur les inhibiteurs de PARP sont en cours afin de déterminer quel produit pourra inhiber la réparation de l'ADN dans les cellules cancéreuses, et ainsi améliorer les résultats de traitement avec la chimiothérapie et la radiothérapie (Ricks et al., 2015). De plus, une étude récente a démontré la présence de PARP dans plusieurs échantillons de glioblastomes (Duriez & Shah, 1997).

#### 1.8 L'épigallocatechine-3-gallate

L'EGCG est une molécule qui vient principalement du thé vert. Cependant, il peut y en avoir dans les fruits (Chen et al., 2004) Cette molécule fait partie de la catégorie des catéchines (Balentine et al., 1997). Celui-ci fait partie des composés polyphénoliques avec un squelette de diphényl de propane (Figure 1.10) (Higdon & Frei, 2003; Anandh Babu & Liu, 2008; Moulishankar et al., 2020). L'EGCG représente 48 à 55% des catéchines présentes dans le thé vert (Shahidi, 2000).

### 1.8.1 Propriétés de l'EGCG

L'EGCG peut avoir plusieurs avantages au niveau de la santé. Cette dernière et les autres catéchines du thé vert ont des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antihypertensives, anti-diabétiques, anti-mutagéniques, antibactériennes et antivirales (Dufresne & Farnworth, 2001; Higdon & Frei, 2003; Khan & Maukhtar, 2007; McKay, & Blumbreg, 2002).

L'EGCG est aussi notamment connu pour avoir des effets positifs sur les maladies cardio-vasculaires. En effet, une étude sur 40 000 japonais a démontré que les personnes buvant plus de 2 tasses de thé vert par jour avaient moins de risque de mourir par des maladies cardiovasculaires que ceux qui buvaient moins d'une demi-tasse par jour. Les risques de décès étaient de 22% et 33% respectivement (Kuriyama et al. 2006).

L'EGCG joue aussi un rôle dans la prévention du cancer. En effet, une étude a été effectuée sur 60 hommes ayant des néoplasie intraépithéliale prostatique de haut grade (HG-PIN). Le HG-PIN est une lésion pré-maligne d'un cancer de prostate dont 30% des hommes affectés développeront éventuellement un cancer de la prostate à l'intérieur d'un an. Dans cette étude, la moitié des sujets (30 personnes) devaient consommer trois doses de 200 mg de catéchines de thé vert qui contenait principalement de l'EGCG à 51,88% (ainsi que d'autres types de catéchines). L'autre moitié (30 personnes) ont reçu un placebo. Parmi les 30 personnes qui ont reçu le placebo, 9 d'entre eux ont développé un cancer de la prostate à l'intérieur d'un an. Parmi ceux qui ont eu le traitement de catéchines, seulement une personne a développé un cancer de la prostate. Tout cela a été fait sans la présence de symptômes secondaires (Bettuzzi et al., 2006).

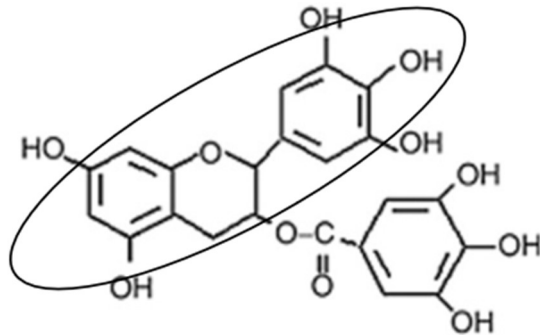
Une autre étude sur des cellules cancéreuses gastriques a déterminé que l'utilisation de l'EGCG à 80 µg/ml inhibe la croissance cellulaire des cellules cancéreuses gastriques SGC7901 lorsque celles-ci sont dans un environnement hypoxique. De plus, l'EGCG a pu aussi induire l'apoptose dans un environnement hypoxique et ce, de façon dose-dépendante (Fu et al., 2019).

Une troisième étude a été faite sur l'effet de l'EGCG sur les cellules cancéreuses de gliome U251. Les résultats ont démontré que l'EGCG induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses de façon dose-dépendante. Une augmentation de l'EGCG a aussi résulté à une baisse de la viabilité des cellules, à une baisse de l'invasion cellulaire, ainsi que la baisse de l'expression des protéines dans la voie des MAPK, une voie qui est sollicitée lors de la croissance des tumeurs (Li et al., 2014).

Les effets anti-cancéreux de l'EGCG sont médiés à travers plusieurs mécanismes cellulaires tels que l'altération du cycle cellulaire (Gupta et al., 2004), la suppression de la voie de signalisation des MAPK (mitogen-activated protein kinase) ainsi que les récepteurs de protéines tyrosine kinase (RTK) (Shimizu et al., 2011; Singh et al., 2011), l'inhibition de l'expansion clonale des CSC initiatrices de tumeurs (Lin et al. 2012) et la production des changement épigénétiques dans l'expression des gènes (Lee et al., 2005). Cependant, les mécanismes moléculaires que l'EGCG utilise pour remplir ces fonctions ne sont pas encore claires (Negri et al., 2018).

De plus, une étude de Xie, C. R. et al. a démontré que l'EGCG est capable de réduire l'expression de la protéine MGMT, une protéine qui rend les glioblastomes résistantes à la TMZ. L'étude a aussi démontré que le traitement des GBM à l'EGCG était moins cytotoxique que le celui au TMZ (Xie et al., 2018).

Figure 1.10 : Structure moléculaire de l'EGCG (Steinmann, J. et al., 2013). Le squelette de diphenyle de propane est encerclé en noir



### 1.8.2 Biodisponibilité de l'EGCG

Malheureusement, la biodisponibilité cérébrale de l'EGCG est très faible. En effet, le temps de demi-vie de cette dernière chez les humains est de 3,5 à 4 heures (Lee et al., 2002; Mereles & Hunsteein, 2011). La faible biodisponibilité peut être due à une faible absorption de celle-ci dans les intestins (Smith et al., 2010). En effet, l'EGCG administré de façon oralement est souvent absorbée dans le sang à travers l'intestin. Il a

été reporté chez les humains que la plus grande concentration plasmatique d'EGCG était de 0,15  $\mu\text{M}$  après avoir pris deux tasses de thé vert (Zhang et al., 2013).

Dans le cas du cancer du cerveau, la faible biodisponibilité cérébrale peut être due à la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. En effet, la taille de l'EGCG pourrait être un obstacle afin qu'elle puisse passer à travers la barrière hémato-encéphalique. Une étude de Pervin et al. a démontré que les métabolites de l'EGCG, l'EGC ((-)-épigallocatechine) et le GA (gallate) pouvaient mieux passer à travers la barrière hémato-encéphalique que l'EGCG (Pervin et al., 2017). De plus, une autre étude de Lin et al. a découvert que la biodisponibilité plasmatique après une ingestion orale de l'EGCG dans des rats en liberté de mouvement était de 4,95%. Ils ont découvert par la suite que la concentration moyenne d'EGCG dans différentes régions de cerveau de rat était de 5ng/ml 15 minutes après une administration intraveineuse de 50 mg/kg (Lin et al., 2011).

La polarité d'une molécule est aussi un facteur à considérer si celle-ci doit passer à travers la barrière hémato-encéphalique. Les molécules les moins polaires ont plus de facilité à passer à travers la barrière. En effet, puisque l'EGCG a plus de groupements polaires que ses métabolites, sa perméabilité sera affaiblie (Pervin et al., 2017).

### 1.8.3 Interaction entre l'EGCG et le récepteur à la laminine 67LR

L'EGCG peut agir en tant que ligand à un récepteur à la laminine 67LR. Celui-ci est une protéine transmembranaire dont l'expression augmente dans les cellules cancéreuses (Negri et al., 2018). Une étude de Tachibana et al. a démontré que parmi les autres molécules retrouvées dans le thé vert tels que la catéchine, l'épicatéchine, l'épigallocatechine, la caféine et quercétine, c'est l'EGCG qui possède la plus grande affinité avec le récepteur à la laminine 67LR. De plus, l'interaction entre l'EGCG et le récepteur à la laminine 67LR a inhibé la croissance tumorale d'une lignée de cellules cancéreuse A549 (Tachibana et al., 2004).

## 1.9 Récepteur à la laminine 67LR

### 1.9.1 Structure

Le récepteur à la laminine 67LR est une protéine membranaire. Cependant, le cDNA venant d'un modèle murin et d'un modèle humain codant pour cette protéine possédait seulement 295 nucléotides, ce qui est l'équivalent d'une protéine de 32 kDa. Une analyse sur un gel de SDS-polyacrylamide a déterminé que la

protéine aurait un poids moléculaire d'environ 37 kDa (Montuori & Sobel, 1996). Par conséquent, il serait possible que cette protéine, qui porte le nom de 37LRP serait un précurseur du récepteur à la laminine 67LR (Rao et al., 1989).

Le mécanisme de transition de la protéine 37LRP au récepteur à la laminine 67LR n'est pas entièrement compris. Il se pourrait qu'il y ait une dimérisation de 2 protéines 37LRP et que le récepteur à la laminine soit acylé par des acides gras tels que le palmitate, l'oléate et le stéarate. Puisque les acides aminés dans le 37LRP et le récepteur à la laminine 67LR sont identiques, il y aurait donc une homodimérisation en utilisant des liens hydrophobes très forts qui sont médiés par les acides gras (Landowski et al., 1995). Les protéines 37LRP et récepteur à la laminine 67LR se retrouvent dans les radeaux lipidiques des membranes cellulaires. Elle possèdent un domaine transmembranaire avec le N-terminal qui se retrouve dans le côté cytosolique. Le côté C-terminal se retrouve dans la MEC où l'interaction avec les ligands se fera (Figure 1.11) (Jovanovic et al., 2015).

#### 1.9.1.1 Fonction

Comme il a été mentionné plus tôt, le côté C-terminal du récepteur à la laminine 67LR peut servir de récepteur à plusieurs types de ligands tels les laminines, qui sont les ligands principaux. La laminine-1 est le ligand principal parmi toutes les laminines. Celle-ci est une glycoprotéine qui se retrouve dans la MEC. Elle est aussi un hétérotrimère qui possède une sous unité  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Patarroyo et al., 2002).

Le récepteur à la laminine 67LR possède d'autres fonctions physiologiques dans la cellule (Kinoshita et al., 1998). Il joue un rôle dans la maintenance des structure nucléaires en interagissant avec les histones. De plus, le récepteur à la laminine 67LR est un homologue de p40, la protéine qui est associée au ribosome 40S qui est essentielle pour traiter l'ARN qui est requis pour l'assemblage de l'ARN ribosomique de 18S ainsi que la maturation du ribosome 40s (Ford et al., 1999).

#### 1.9.2 Rôle du récepteur à la laminine 67LR dans les cellules cancéreuses.

Le récepteur à la laminine 67LR contribue à la progression tumorale des cellules cancéreuses. En effet, une surexpression de cette protéine augmente son interaction avec la laminine. Cette interaction va mener à une dégradation de la lame basale. Cela se ferait en dégradant des protéines présentes dans la MEC tels

que le collagène IV. Les cellules pourront par la suite commencer leur invasion en utilisant les vaisseaux sanguins (Turpeenniemi-Hujanen, et al., 1986; Ardini et al., 2002).

Le récepteur à la laminine 67LR est surexprimé dans plusieurs types de cellules cancéreuses, incluant cancer du sein, du colon, du col de l'utérus, des poumons, des ovaires, de l'estomac, de la thyroïde, de la prostate, de l'utérus, et la leucémie (Nadji et al., 1999; Sanjuàn et al., 1996; Al-Saleh et al., 1997; Fontanini et al., 1997; Van der Brule et al., 1994; Montuori et al., 1999; Waltregny et al., 1997; Van de Brûle et al., 1996; De Manzoni et al., 1998).

### 1.9.2.1 Expression du récepteur à la laminine 67LR dans les gliomes

Comme les autres types de cancer, les gliomes auraient aussi une surexpression du récepteur à la laminine 67LR. En effet, une étude de Wu, H. et al a déterminé que l'expression de la protéine 37LRP est plus élevée dans une lignée cellulaire de gliome comparé à des cellules normales venant du cerveau. De plus, une réduction de son expression en utilisant un shRNA (short-hairpin RNA) a réduit la prolifération cellulaire (Wu et al., 2016). Une seconde étude de Chen et al. a déterminé que l'expression du récepteur à la laminine 67LR est plus élevée dans les astrocytes à haut grade. Une baisse de l'expression de celui-ci dans les cellules cancéreuses de glioblastomes peut réduire le taux de migration (Chen et al., 2009).

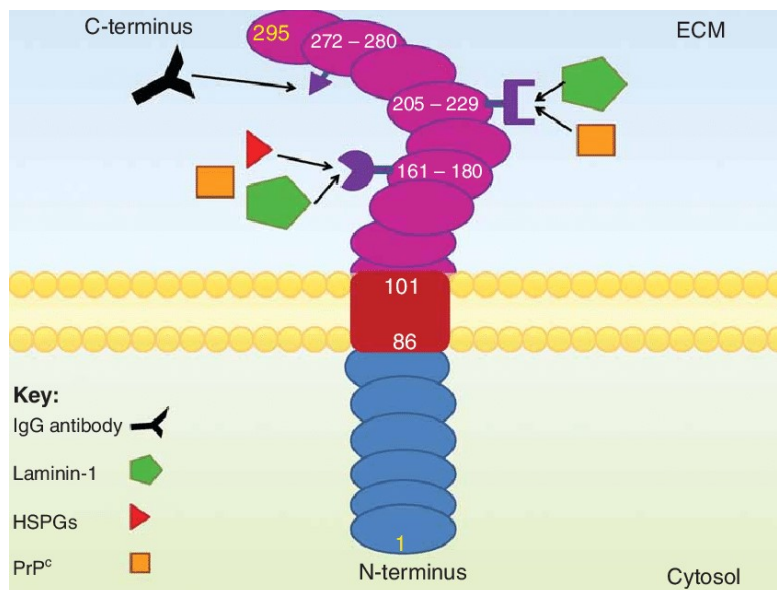


Figure 1.11: Structure moléculaire du précurseur au récepteur à la laminine 67LR. (Jovanivic, K. et al., 2015)

## 1.10 Projet de recherche

### 1.10.1 Hypothèses

Nous croyons que l'utilisation de l'EGCG modulera l'acquisition du phénotype souche des cellules de GBM. L'EGCG va aussi inhiber la surexpression des marqueurs à CSC, de la TÉM et de toutes les protéines qui seraient impliquées dans la progression tumorale. Afin de remplir cette fonction, nous croyons que l'EGCG aura besoin du récepteur à la laminine 67LR puisque celui-ci est un récepteur pour l'EGCG. De plus, nous pensons que le SNAIL a un rôle à jouer dans l'acquisition d'un phénotype souche de glioblastome et dans la progression tumorale puisque celle-ci joue un rôle dans la TÉM, un phénomène qui peut être observable dans les gliomes. Comme il a été mentionné plus tôt, le caractère mésenchymateux que les cellules obtiennent engendre l'expression de marqueurs à cellules souches. Alors, il se pourrait que les marqueurs à cellules souches en question sont aussi exprimés dans les CSC de GBM, et que le tout soit engendré par la hausse de l'expression des marqueurs de la TÉM tels que SNAIL.

### 1.10.2 Objectifs de la recherche

Le projet de recherche possède plusieurs objectifs. Le premier objectif est de déterminer si l'EGCG peut prévenir l'acquisition d'un phénotype souche de glioblastomes dans un modèle *in vitro* en cultivant des cellules de GBM U87 en sphéroïdes. L'acquisition du phénotype souche comprend aussi l'expression des marqueurs à CSC, de la TÉM ainsi que toutes les voies de signalisation qui pourraient contribuer à la progression tumorale des CSC de GBM. Le deuxième objectif est de déterminer si l'EGCG a besoin du récepteur à la laminine 67LR afin de prévenir l'acquisition du phénotype souche. Pour ce faire, il faudra observer ce qui se passe lorsque son expression est réduite dans les cellules cancéreuses. Le dernier objectif est de déterminer si SNAIL est important dans l'acquisition du phénotype souche cancéreux.

## CHAPITRE 2

### ARTICLE

EGCG prevents the acquisition of a cancer stem cell phenotype in U87 glioblastoma neurospheres: A role for a signaling crosstalk linking Snail to the 37/67 kDa laminin-1 receptor ribosomal protein SA

Loraine Gresseau and Borhane Annabi\*

Contribution des auteurs

Loraine Gresseau : Expérimentation, analyse des données, montage des figures, rédaction du manuscrit

Borhane Annabi : Conceptualisation des expériences, soutien financier, analyse des données, rédaction du manuscrit



EGCG prevents the acquisition of a cancer stem cell phenotype in U87 glioblastoma neurospheres: A role for a signaling crosstalk linking Snail to the 37/67 kDa laminin-1 receptor ribosomal protein SA

Loraine Gresseau and Borhane Annabi\*

*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, and CERMO-FC, Université du Québec à Montréal, Montreal, QC, Canada*

*Running title* : EGCG targets the cancer stem cell phenotype

*Key words* : EGCG, Cancer stem cells, Spheroids, Snail, RPSA

*\* To whom correspondence and reprint requests should be directed*

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec

CANADA

H3C 3P8

Phone : (514) 987-3000 ext 7610

E-mail : [annabi.borhane@uqam.ca](mailto:annabi.borhane@uqam.ca)

Abbreviations : CSC, Cancer stem cells; EGCG, Epigallocatechin-3-gallate; FN, Fibronectin; 37/67 kDa laminin-1 receptor ribosomal protein SA, RPSA

## 2.1 Résumé

**Résumé :** Les neurosphères sont des prédicteurs significatifs des résultats cliniques chez les patients atteints de glioblastome (GBM), et sont couramment utilisés pour l'étude des cellules souches cancéreuses (CSC) du cerveau. **Objectif :** Nous souhaitons déterminer l'impact qu'un traitement à base d'épigallocatechine-3-gallate a sur le processus qui mène à l'acquisition d'un phénotype de CSC dans la formation des sphéroïdes. **Méthode :** Des neurosphères ont été générées à partir des cellules cancéreuses adhérentes humaines U87 de GBM. Les neurosphères ont été obtenues sous des conditions qui engendrent les caractéristiques des CSC. Des lysats d'ARN et de protéines totales ont été isolés afin de vérifier l'expression des gènes par RT-qPCR et l'expression des protéines par immunobuvardage. **Résultats :** Comparé aux cellules adhérentes parentales, l'expression des marqueurs à CSC Nanog, Sox2 et CD133 ainsi que les marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (TÉM) Fibronectine, Snail et la protéine ribosomique SA (protéine codée par le gène RPSA) du récepteur à la laminine 37/67 kDa dans les neurosphères a augmenté. Le traitement à l'EGCG inhibe l'expression de ces gènes et réduit la taille des neurosphères de façon dose-dépendante. Une signature apoptotique a été aussi retrouvée avec des transductions de signaux accrus impliquant les protéines GSK, RSK et CREB. L'EGCG peut réduire la taille des sphéroïdes, et empêche l'acquisition du phénotype de CSC ainsi que celui de la TÉM. Cela a été reproduit par la baisse de l'expression du gène RPSA, et partiellement pour celle de Snail. **Conclusion :** Cette étude met en évidence un lien de signalisation entre les gènes RPSA et Snail, et supporte l'impact de chimioprévention que l'EGCG peut exercer sur l'acquisition d'un phénotype de CSC à travers sa capacité de cibler les événements de transduction intracellulaire.

## 2.2 Abstract

**Background:** Three dimensional neurospheres are a significant predictor of clinical outcome in glioblastoma patients, and are commonly used to uncover brain cancer stem cell (CSC) biology and the acute *in vitro* pharmacological impact of chemotherapeutic drugs. **Objective:** Here, we wished to rather assess the chemopreventive ability of diet-derived epigallocatechin gallate (EGCG) to impact the process that leads to the acquisition of CSC stemness traits upon spheroids formation. **Methods:** Three-dimensional tumorspheres were generated from adherent human U87 glioblastoma cancer cell cultures under conditions that recapitulate stemness features. Total RNA and protein lysates were isolated for gene assessment by RT-qPCR and protein expression by immunoblot. **Results:** Compared with their parental adherent cells, tumorspheres expressed increased levels of the CSC markers Nanog, Sox2, CD133, as well as of the epithelial-to-mesenchymal transition markers Fibronectin, Snail, and 37/67 kDa laminin-1 receptor ribosomal protein SA (RPSA). EGCG treatment reduced dose-dependently tumorspheres size and inhibited the transcriptional regulation of those genes. An apoptotic signature was also found in spheroids with increased signal transducing events involving GSK, RSK, and CREB. EGCG was found to decrease spheroids size, and reverse the acquisition of CSC/EMT phenotype. This was mimicked by RPSA gene silencing, but partially by Snail silencing. **Conclusion:** This work highlights a signaling axis linking RPSA/Snail, and supports the chemopreventive impact that diet-derived EGCG may exert on the acquisition of CSC traits through its capacity to target intracellular transducing events.

### 2.3 Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most malignant primary brain tumor in adults with WHO grade IV. GBM is highly vascularized with highly invasive and malignant cells leading to increased mortality in patients with an average survival of 15 months (Arvold and Reardon, 2014; Land et al., 2020; Xie et al., 2014). The high vascularization capacity of GBM provides nutrients and oxygen to tumor inner cells exposed to hypoxia and nutrient deficiency, leading to rapid tumor growth and metastasis. Although this high vascularization suggests anti-angiogenic treatment strategies may be efficient, the presence of blood-brain barrier is a major obstacle for delivering anti-angiogenic chemotherapeutic drugs to the brain tissue (Arvanitis et al., 2020). In addition, resistance to standard cancer therapies including chemotherapy and radiotherapy, is thought to be responsible for brain cancer recurrence and metastasis (Alves et al., 2021). This is in part attributable to cancer-initiating/cancer stem-like cells (CSC), defined as a small highly malignant subpopulation of cancer cells that are endowed with higher tumor-initiating ability. Strategies to prevent the acquisition of cancer stemness or to target brain CSC to overcome therapy resistance, have recently led to innovative therapeutic approaches to prevent tumor relapse (Sun et al., 2019). Epigenetic diet approaches against CSC are, among the recent research avenues, emerging as a very new strategy with a good future expectation to treat cancer patients (Pistollato et al., 2014; Ahuja et al., 2016; Ghasemi et al., 2021).

Oncogenic transformation of normal stem cells can give rise to CSC, but CSC can also originate from de-differentiation of bulk tumor cells. Thus, factors promoting the increase of normal stem cell pools or stimulating the acquisition of stemness features by tumor cells can have serious consequences on cancer origin and progression. The role of lifestyle factors, such as high caloric diet, alcohol drinking and smoking, contribute to the widening of stem cell pools and the induction of CSC features in tumors are also hypothesized (Chiodi and Mondello, 2020). Several bioactive dietary components are of particular interest in the field of epigenetics. Many of these compounds display anticancer properties and may play a role in cancer prevention. Numerous studies suggest that several nutritional compounds have epigenetic targets in cancer cells. Importantly, emerging evidence strongly suggests that consumption of dietary agents can alter normal epigenetic states as well as reverse abnormal gene activation or silencing. Epigenetic modifications induced by bioactive dietary compounds are thought to be beneficial (Hardy and Tollefsbol, 2011).

Primary malignant tumors originate from small numbers of cells which become highly proliferative through mutations occurring in oncogenes, tumor suppressors or DNA repair genes (Lee et al., 2010). Although the genetic mutations eventually lead to formation of large and complex vascular tumors, they all go through

an avascular (devoid of blood vessels) hypoxic mode at their early stage of growth (Muz et al., 2015). Having insight into this stage of growth is valuable in understanding the behavior of tumors at subsequent phases.

Tumor spheroids are predominantly used as *in vitro* models of avascular tumor growth (Taghibakhshi et al., 2019). They are spherical aggregations of cancer cells which are supplemented with a controlled amount of nutrient. Spheroid size, cell numbers, and fractions of hypoxic, quiescent, and proliferative cells are then relatively easy to track, which enables to quantitatively investigate these parameters on CSC phenotype acquisition (Amereh et al., 2021).

Phenolic compounds are a vast group of substances with anticarcinogenic functions, anti-inflammatory, and antioxidative activities (Rudrapal et al., 2022). It appears that these characteristics aim at neutralizing CSC development, their microenvironment, and metabolism in part through epigenetic mechanisms. Naturally occurring compounds, mainly phytochemicals have gained immense attention in recent times because of their wide safety profile, ability to target heterogeneous populations of cancer cells as well as CSC, and their key signaling pathways. Thus, targeting CSC and relevant signaling pathways by phytochemicals has recently been considered as a novel approach for brain cancer therapy (Chan et al., 2018).

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a biological active polyphenol found in green tea leaves, can suppress brain cancer cell proliferation, and induce apoptosis (Le et al., 2018), but its specific effects on stemness traits in brain malignancies remain unclear. It is therefore important to explore the chemopreventive properties of EGCG targeting CSC proliferation and survival (Negri et al., 2018; Jiang et al., 2020). The role of polyphenols in overcoming cancer drug resistance has also been inferred (Maleki Dana et al., 2022). EGCG has been shown as a potent inhibitor of U87 glioblastoma cell growth and these effects are in most cases mediated by apoptosis (Liu et al., 2020).

Here, we generated an *in vitro* grade-IV brain cancer spheroid model from a primary culture of U87 glioblastoma cells. Transcriptomic analysis confirmed the increased expression of classical CSC-associated genes promoting CSC-like characteristics in brain cancer cells. Among those genes are CSC biomarkers, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and integrin signaling, that contribute to maintain an undifferentiated and pluripotent state, while others are involved in cell motility self-renewal and chemoresistance. We further highlighted a new role of a signaling axis involving a 37/67 kDa Laminin receptor

ribosomal protein SA (RPSA)/Snail in neurospheres formation that regulates a combined apoptotic/EMT/CSC phenotype involved in chemoresistance and invasion and that can be targeted by EGCG.

## 2.4 Materials and Method

### 2.4.1 Materials

Sodium dodecyl sulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich Corp (St Louis, MO). Cell culture media was obtained from Life Technologies Corp (Carlsbad, CA). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). The HyGLO™ Chemiluminescent HRP (horseradish peroxidase) Antibody Detection Reagents were from Denville Scientific Inc. (Metuchen, NJ). Micro bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagents were from Pierce (Micro BCA™ Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The GSK, RSK, CREB inhibitors were from MilliporeSigma (Sigma Aldrich). The monoclonal antibodies against pAKT (Ser473) (D9W9U, #12694), and the polyclonal antibodies against PARP (#9542), BCL-2 (50E3, #2870), BCL-XL (54H6, #2764P), PI3K were all from Cell Signaling Technology. The polyclonal antibodies against Glycogen synthase kinase-3 alpha and beta (GSK3- $\alpha/\beta$ ) (D75D3, #5676), phosphorylated (P)-GSK3- $\alpha/\beta$  (Ser21/9, #9331), C-AMP Response Element-binding protein (CREB) (D76D11, #4820), phosphorylated (P)-CREB (Ser133), and the monoclonal antibody against the 90 kDa ribosomal S6 kinases (RSK1/RSK2/RSK3) (32D7, #9355), phosphorylated p90RSK (ser380) (D3H11, #11989) were all purchased from Cell Signaling Technology Inc (Danvers, MA, USA). Monoclonal Antibody against Human mitogen- and stress-activated protein kinase 1 (MSK1, S376, #AF2518), phosphorylated (P)-MSK1 (#MAB1094) and MSK2 (S360, #MAB2310) were purchased from R&D Systems Inc (Minneapolis, MN, USA). HRP-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin (Ig) G secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). EGCG was from MP Biomedicals (Santa Ana, CA). All other reagents were from Sigma-Aldrich Corp.

### 2.4.2 Cell culture

Human U87 glioblastoma cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). Serum starvation was performed by culturing the cells in Eagle's minimal essential medium (EMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) and 100 units/mL penicillin/streptomycin, and from which the 10% inactivated fetal bovine serum (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) was not added. Cells were cultured at 37°C under a humidified 95%-5% (v/v) mixture of air and CO<sub>2</sub>. U87 neurosphere formation was performed as follows: 80-90% adherent U87 monolayer cells were trypsinized and plated in low adhesion

24-well plates (Corning Costar, Corning, NY, USA) at a density of  $2 \times 10^5$  cells/ml in complete media for 24-72 hours. Then, supernatant was removed, and serum-free EMEM was supplemented with 10 ng/ml human basic fibroblast growth factor (Gibco, Thermo Fisher, 13256029), 20 ng/ml human epidermal growth factor (Gibco, Thermo Fisher, PHG0315), 5  $\mu$ g/ml insulin (Sigma Aldrich, I3536) and bovine serum albumin (BSA) (Sigma Aldrich, A9418-5G) at 4% (v/v) was carefully added to the dishes. Spheroids were defined as rounded aggregates of cells with a smooth surface and poor cell-to-cell definition. Cells were cultured at 37°C under a humidified 95%-5% (v/v) mixture of air and CO<sub>2</sub>.

#### 2.4.3 Total RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from cell monolayers or from tumorspheres using 1 mL of TriZol reagent for a maximum of  $3 \times 10^6$  cells as recommended by the manufacturer (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 1-2  $\mu$ g of total RNA were reverse-transcribed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) or in the case of the gene array: R2 First Strand kit (QIAGEN, Valencia, CA). The cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Icyler iQ5 (Bio-Rad) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The following primer sets were from QIAGEN: GAPDH (Hs\_GAPDH\_1\_SG, QT00079247), Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) (Hs\_PPIA\_4\_SG, QT01866137),  $\beta$ -Actin (Hs\_Actb\_2\_SG, QT01680476), Snail (Hs\_SNAI1\_1\_SG, QT00010010), Fibronectin (Hs\_FN1\_1\_SGQT00038024), CD133 (Hs\_PROM1\_1\_SG, QT00075586), NANOG (Hs\_NANOG\_2\_SG, QT01844808), SOX2 (Hs\_SOX2\_1\_SG, QT00237601), and RPSA (Hs\_RPSA\_1\_SG, QT00044310). The relative quantities of target gene mRNA were normalized against internal housekeeping genes PPIA and GAPDH. The RNA was measured by following a  $\Delta C_T$  method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference ( $\Delta C_T$ ) between the mean values in the triplicate samples of target gene and the housekeeping genes was calculated with the CFX manager Software version 2.1 (Bio-Rad) and the relative quantified value (RQV) was expressed as  $2^{-\Delta C_T}$ .

#### 2.4.4 Total RNA library preparation

Total RNA (500 ng) was extracted from U87 treated cells and used for library preparation. The quality of the RNA was assessed with the Bioanalyzer RNA 6000 Nano assay on the 2100 Bioanalyzer system (Agilent technologies, Mississauga, ON), and all samples had a RNA integrity number (RIN) above eight. Library

preparation was carried out with the KAPA mRNA-Seq HyperPrep kit (KAPA, Cat no. KK8581). Ligation was made with Illumina dual-index UMI, and 10 PCR cycles were required to amplify cDNA libraries. Libraries were quantified by QuBit and BioAnalyzer DNA1000. All libraries were diluted to 10 nM and normalized by qPCR using the KAPA library quantification kit (KAPA; Cat no. KK4973). Libraries were pooled to equimolar concentrations. Three biological replicates were generated.

#### 2.4.5 RNA sequencing

High RNA quality was verified as above, and samples sequenced using the Illumina NextSeq500 sequencer at the Genomics Core Facility of the Institute of for Research in Immunology and Cancer (IRIC, Montreal, QC).

#### 2.4.6 Reads alignment and differential expression analysis

Reads were aligned and sorted by coordinates to the human genome build 38 (GRCh38.p13) with version 37 of Gencode gene annotations, using the STAR aligner (STAR\_2.7.1a) (Chen et al., 2018; Dobin et al., 2013). Quantification of genes was performed during alignment by STAR. Differentially expressed genes among groups were identified using the R packages DESeq2 (v 1.30.1) (Love et al., 2014). After analysis, only genes with adjusted  $p$ -values (adjp)  $< 0.05$ , and  $\log_2$  fold change  $\geq 1.0$  were considered as significant. Hierarchical clustering of differentially expressed genes was used to represent the results (R package ggplot2).

#### 2.4.7 Gene set enrichment analysis

The gene set enrichment analysis was performed with the GSEA software version 4.2.3 (Subramanian et al., 2005) with the complete set of normalized input values, using the Hallmark, canonical pathway gene sets (chemical and genetic perturbations, BioCarta, Reactome, and Kegg), and Gene ontology gene sets (Biological process). Software used for analysis of data during this project included GraphPad Prism and R (version  $>3.4$ ). For all statistical analysis, differences were considered statistically significant if the adjp calculated by Student's  $t$  test with Bonferroni correction were  $<0.05$ . RNA-Sequencing of the U87 cell lines.

#### 2.4.8 Western Blot

Cells were lysed in a RIPA buffer containing 1 mM each of NaF and Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and the Millipore Protease inhibitor Cocktail Set I diluted at 1/100. The proteins (10-20 µg) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Next, proteins were electro-transferred to polyvinylidene difluoride membranes, and blocked for 1 hour at room temperature with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST; Bioshop, TWN510-500). Membranes were washed in TBST and incubated over night with the appropriate primary antibodies (1/1000 dilution) in TBST containing 3% BSA and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich) at 4°C and in a shaker. After three washes with TBST, the membranes were incubated 1 hour with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG at 1/2500 dilutions in TBST containing 5% nonfat dry milk. Immunoreactive material was visualized by ECL. The Clarity Western ECL Substrate kit by Bio-Rad was used to reveal the results. The membrane was inserted into the ChemiDoc XRS+ by Bio-Rad under the Chemi application. The exposure time varied from a protein to another.

#### 2.4.9 In silico analysis of transcripts levels in clinical glioblastoma and low-grade glioblastoma tissues

A Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) web server was used to analyze the RNA sequencing expression data of 9,736 tumors and 8,587 normal samples from the TCGA and the GTEx projects (Tang et al., 2017). GEPIA provides customizable functions such as tumor/normal differential expression analysis, profiling according to cancer types or pathological stages, patient survival analysis, similar gene detection, correlation analysis and dimensionality reduction analysis (<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>).

#### 2.4.10 Spheroid size assessment

Pictures of the spheroids were taken every 24 hours until the 72-hour mark. It was possible to measure the perimeter of each spheroid through the Fiji (ImageJ) software since the conversion from pixel to the metric system was known.

#### 2.4.11 Statistical data analysis

Data and error bars were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) of three or more independent experiments unless otherwise stated. Hypothesis testing was conducted using the Kruskal-Wallis test followed by a Dunn Tukey's post-test (data with more than 3 groups) or a Mann-Whitney test (two



group comparisons). Probability values of less than 0.05 (\*) or 0.01 (\*\*) were considered significant and denoted in the figures. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 7 software (San Diego, CA).

## 2.5 Results

### 2.5.1 EGCG alters neurospheres size and reverses the acquisition of a cancer-stem cell phenotype.

U87 glioblastoma neurospheres culture conditions were first validated as described in the Methods section. Neurospheres appeared to reach maturation at 72 hours (Fig.2.1A, upper panels), whereas the addition of EGCG prevented neurospheres growth and therefore, their complete formation (Fig.2.1A, lower panels). The effect of EGCG on spheroids size was found to be dose-dependent and maximally inhibited between 10-30  $\mu$ M (Fig.2.1B). In order to monitor any changes with regards to the acquisition of stemness traits, total RNA was extracted from adherent or neurospheres generated upon 72 hours in the presence of increasing EGCG concentrations. RT-qPCR analysis revealed that the expression of CSC markers CD133, SOX2, and NANOG were all induced in neurospheres, while EGCG dose-dependently reduced their expression (Fig.2.1C). Next, the cell death resistance phenotype and signaling pathways were investigated at the protein level in cell lysates upon spheroids formation. The expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL was induced in neurospheres in accordance to previous reports (Yang et al., 2009; Xiang et al., 2011). Interestingly, this was also accompanied by increased expression of the prosurvival phosphorylated AKT (Fig.2.1D). Finally, *in silico* analysis of CD133, SOX2, and NANOG transcript levels was performed on clinical samples from GBM and low-grade glioblastoma (LGG) as described in the Methods section. Except for NANOG whose expression was relatively lower, both CD133 and SOX2 expression were significantly higher in GBM samples (Fig.2.1E, red boxes) than in LGG (Fig.2.1E, grey boxes). Altogether, the acquisition/expression of stem cell molecular signature is well recapitulated upon spheroid formation and suggests that such phenotype be more present in higher grades of GBM.

### 2.5.2 Transcriptomic analysis reveals the reversion of epithelial to mesenchymal transition in profit to an apoptotic, senescent, and oxidative program upon EGCG treatment of glioblastoma spheroids.

To gain insight into the differential transcription regulation that occurs upon EGCG treatment of U87 glioblastoma cells, total RNA was isolated from EGCG-treated and control cells, and RNA-Sequencing was performed as described in the Methods section. Unsupervised hierarchical clustering revealed that U87 cells treated with EGCG displayed a gene expression signature distinct from that of control U87 cells (Fig.2.2A).

To gain further understanding of these differences, we performed gene set enrichment analysis (GSEA). Among the processes found to be significantly induced in EGCG-treated cells, these included oxidative phosphorylation, senescence, and apoptosis (Fig.2.2B, red dots). This was associated with a significant increase in the transcript levels of the pro-apoptotic regulator BID and several proteasome catalytic subunit family members (PSMA3, PSMA4, PSMB3, and PSMB9). The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2D (CDKN2D) which codes for p19INK4D, an essential regulator of apoptosis, DNA damage repair, and senescence were also significantly enhanced (Han et al., 2020). Notably, EGCG increased the transcriptional level of gelsolin (GSN), previously reported to impede the malignant phenotype of glioblastoma by reducing cell proliferation and invasive properties (Zhang et al., 2020) (Fig.2.2C).

Negative enrichment in TGF- $\beta$ , SMAD2/3, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) gene signatures were observed upon EGCG treatment (Fig.2.2B, blue dot). This corroborated with the repression of the SMAD family members (SMAD3, SMAD6, and SMAD7) and TGFBI transcripts. Accordingly, the expression of several markers of EMT, such as fibronectin (FN1), collagens (COL12A1 and COL6A3), and lysyl oxidase (Lox), was significantly reduced in the EGCG-treated U87 cells (Fig.2.2C). Importantly, we report for the first time to our knowledge that EGCG led to the transcriptional downregulation of integrin type 1 family members ITGB1, ITGA4, and ITGAV. These integrins have been related with a mesenchymal subset of glioblastoma associated with poor clinical outcome (Wang et al., 2017) and bevacizumab resistance (Carbonell et al., 2013). Negative enrichment for glioblastoma signaling pathways was also observed upon EGCG treatment. The transcriptional levels of the RTKs MET and EGFR, as well as BRAF and MAPK1 was reduced. The expression of cyclin dependant-kinases 6 (CDK6), SRC, and AKT3 was also highly decreased in response to EGCG. Several studies reported that the CDK4/6 axis and RTK signaling are concomitantly deregulated in glioblastoma, creating an opportunity to develop more effective therapies by targeting both pathways (Brennan et al., 2013; Wen et al., 2015; Olmez et al., 2018). Moreover, activation of the Met/TrkA-B pathway is involved in therapeutic resistance of glioblastoma to CDK4/6 inhibitors, suggesting that dual inhibition of c-Met/Trk and CDK4/6 should be considered in resistant disease (Olmez et al., 2018). In conclusion, EGCG reduces the TGF- $\beta$ /SMAD2/3 signaling pathways impeding EMT and supporting the induction of an apoptotic program in glioblastoma cells.

### 2.5.3 EGCG alters neurospheres' epithelial-to-mesenchymal transition phenotype.

The impact of EGCG was also assessed on the expression of EMT markers Snail, Fibronectin (FN), and RPSA (67 kDa Laminin Receptor Protein SA). U87 glioblastoma neurospheres were generated in the absence or

presence of increasing EGCG concentrations. Total RNA was extracted from adherent or neurospheres, and EMT markers expression was assessed at both the gene and protein levels by RT-qPCR (Fig.2.3A) and Western blotting (Fig.2.3B) respectively. Similar impact of EGCG was observed at both the transcriptional and translational levels as collectively Snail, FN, and RPSA were induced upon neurospheres formation, while their expression was dose-dependently prevented by increasing EGCG concentrations. Here again, *in silico* analysis of SNAIL, FN, and RPSA transcript levels was performed on clinical samples from GBM and LGG. Except for SNAIL which expression levels were not higher in either GBM or LGG in comparison to normal tissue, both FN and RPSA expression were found significantly higher in GBM as well as in LGG samples (Fig.2.3C).

#### 2.5.4 Repression of the 37/67 kDa laminin-1 receptor ribosomal protein SA (RPSA) alters spheroids formation and prevents the acquisition of a cancer stem cell phenotype.

Given the notably increased RPSA transcript and protein levels in neurospheres as well as in GBM and LGG clinical samples (Fig.2.3), the functional impact of RPSA was next assessed. U87 glioblastoma monolayers were transiently transfected with a scrambled sequence (siScrambled) or with a siRNA directed against RPSA (siRPSA), then neurospheres generated in the absence or presence of 30  $\mu$ M EGCG (Fig.2.4A). Spheroid size was found decreased to relatively the same extent between siRPSA and EGCG-treated cells (Fig.4B). Cell lysates were harvested from adherent, or spheroids obtained upon transient siScrambled or siRPSA transfection. Western blot analysis of EMT markers and RPSA confirmed the silencing efficiency, but also that Snail expression induction was decreased consequent to reduced RPSA expression (Fig.2.4C). Induced apoptosis and transducing phosphorylated intermediates expression was also found altered, except for CREB (Fig.2.4D). Total RNA was extracted from adherent cells and neurospheres, and RT-qPCR analysis revealed that the expression of the CSC markers *PROM1*, *SOX2*, and *NANOG*, and EMT marker *SNAIL1* was repressed (Fig.2.4E).

#### 2.5.5 Repression of Snail alters spheroids formation, prevents the acquisition of a cancer stem cell phenotype, but does not affect the acquisition of the apoptotic signature.

Given the apparent signaling axis linking RPSA to Snail, the functional impact of Snail was next assessed. U87 glioblastoma monolayers were transiently transfected with a scrambled sequence (siScrambled) or with a siRNA directed against *Snail* (siSnail), then neurospheres generated in the absence or presence of 30  $\mu$ M EGCG (Fig.2.5A). Spheroid size was quantified and found decreased to relatively the same extent

between siSnail and EGCG-treated cells (Fig.2.5B). Cell lysates were harvested from adherent, or spheroids obtained upon transient siScrambled or siSnail transfection. Western blot analysis of Snail confirmed the silencing efficiency, but the induced RPSA expression found unaltered suggesting RPSA acts upstream of Snail (Fig.2.5C). In coherence, induced apoptosis and transducing phosphorylated intermediates expression was globally found unaltered, whereas only RSK phosphorylation was reduced (Fig.2.5D). Total RNA was extracted from adherent or neurospheres, and RT-qPCR analysis revealed that the gene expression of CSC markers *PROM1*, *SOX2*, and *NANOG*, was repressed similarly to siRPSA conditions (Fig.2.5E).

## 2.6 Discussion

Glioblastomas frequently relapse following radiation or chemotherapy, suggesting that a fraction of therapy resistant brain cancer cells remains responsible for the tumor regrowth (Smiley et al., 2022). The recent identification of a brain CSC subpopulation with potent tumorigenic activity supports such therapy resistance phenotype, which molecular signature can be partially recapitulated *in vitro* in CD133-enriched neurospheres derived from glioblastoma primary cultures (Pavon et al., 2014). In fact, multivariate analysis of cell spheroids, tumor grade and patient age, demonstrated that neurosphere formation was a robust, independent predictor of glioma tumor progression (Laks et al., 2009). While such CSC model suites the pharmacological studies on the impact of numerous chemotherapeutic drugs on the phenotypic and molecular signature of spheroid cultures, less is understood when addressing the early events that dictate neurosphere generation.

Here, we demonstrate that U87 glioblastoma neurospheres culture conditions can recapitulate the CSC phenotype through, in part, increases in CD133, Sox2, and Nanog expression. In addition, we also observed increases in EMT markers including Snail, FN, and RPSA, as well as the adaptative cell survival molecular signature including increases in anti-apoptotic BCL-2 and BCL-XL, and of the prosurvival AKT phosphorylation status. This appears coherent when one considers that the formation of such avascular organoids is accompanied with an increased hypoxic microenvironment (Bhattacharya et al., 2020). More importantly, EGCG intervention on these early events, which signal and lead to such CSC phenotype, appear to be efficiently targeted when exploiting those chemopreventive properties.

Natural plants compounds have been reported as modulators of transition processes such as EMT (Avila-Carrasco et al., 2019), or such as those documented in adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells where EGCG prevented the onset of an inflammatory and cancer-associated adipocyte-like phenotype in

response to the triple-negative breast cancer secretome (Gonzalez Suarez et al., 2022). In terms of EGCG chemopreventive effects, here we demonstrate that the acquisition of CSC traits can be reversed consequent to the inhibition of a signaling axis linking RPSA to Snail-dependent and -independent events which, in addition, leads to reduced spheroids size and stemness phenotype. As such, expression of both EMT biomarkers RPSA and Snail was found induced in 3D neurospheres when compared to 2D U87 glioblastoma cells monolayers as summarized herein (Fig.2.6). Snail involvement in EMT has been well documented and cancer therapeutic opportunities envisioned (Huang et al., 2022). EGCG intervention against Snail-mediated EMT events were also recently addressed in U87 glioblastoma cells (Djedjai et al., 2021) as well as in ES2 ovarian cancer cells (Sicard et al., 2021).

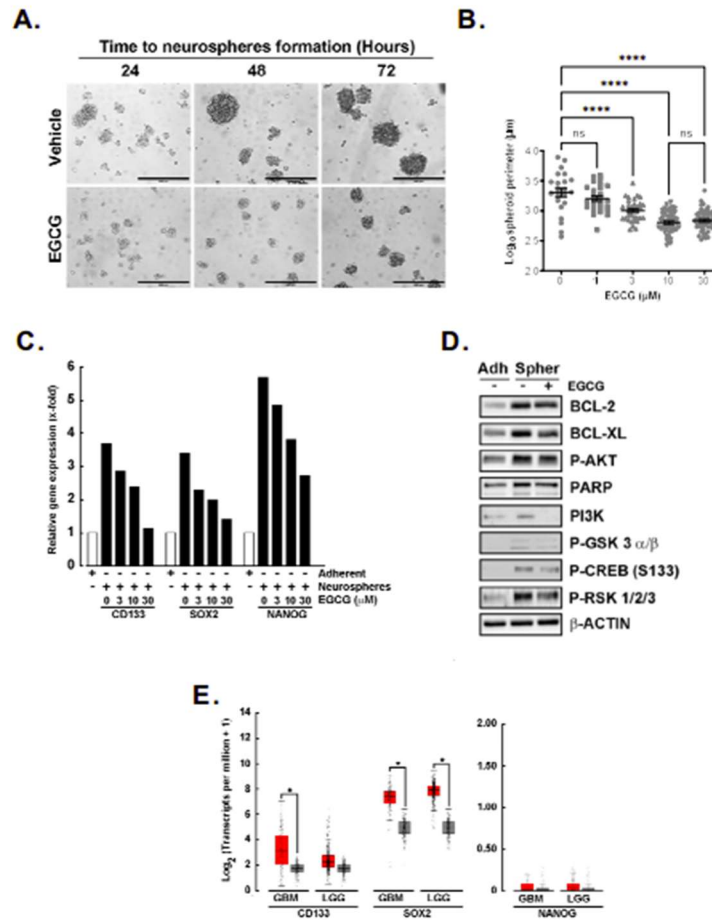
EMT is a trans-differentiation program and a key process in tumor progression which links positively the increased expansion of CSC and cells with stem-like properties (Mortezaee et al., 2022). Recent studies have provided new insights into the molecular mechanisms underlying sustained EMT in CSC (Saitoh, 2022). Interestingly, Snail contributes to several signaling pathways in the regulation of EMT among which those involving STAT3 (Sadrkhanloo et al., 2022) and the Hippo pathway (Akrida et al., 2022). The regulation of EMT by Snail is also centered by several other signaling pathways, including primary mediators TGF $\beta$ , Notch, Wnt, TNF $\alpha$ , Hedgehog, and RTKs (Buyuk et al., 2021). Here, we establish for the first time to our knowledge a signaling axis requiring the functions of RPSA. Pertinent to our study, Notch3 was found to transactivate GSK3 $\beta$  and to inhibit EMT in a breast cancer cell model (Chen et al., 2022). GSK3 $\beta$  regulates EMT and CSC properties in triple-negative breast cancer (Vijay et al., 2019). Although speculative, one can not preclude that, in our current model, a crosstalk involving MSK/CREB/GSK3 $\alpha/\beta$  may rather regulate Snail upstream. As such, Snail is phosphorylated at Ser104/Ser107 and Ser96/Ser100 by casein kinase 1 and GSK3 $\beta$ , respectively (Xu et al., 2010; Zhou et al., 2004). Here, we also found that RSK phosphorylation appears to be a consequence of an upstream RPSA/Snail-dependent signaling which inhibition was shown to occur upon either RPSA or Snail silencing, but also upon EGCG treatment. In accordance, preventing tumor recurrence through RSK inhibition resulted in the elimination of the CSC population in a TNBC cell model (Davies et al., 2015).

Finally, we highlight the increased levels in RPSA, also termed as the 67-kDa laminin receptor (67LR) and correlated its expression to the acquired CSC phenotype un neurospheres. Interestingly, specific targeting of multiple myeloma cells has been linked to a high expression of the 67LR (Britschgi et al., 2010; Shammam et al., 2006), which has been shown to be a cell surface receptor for EGCG binding (Fujimura et al., 2022).

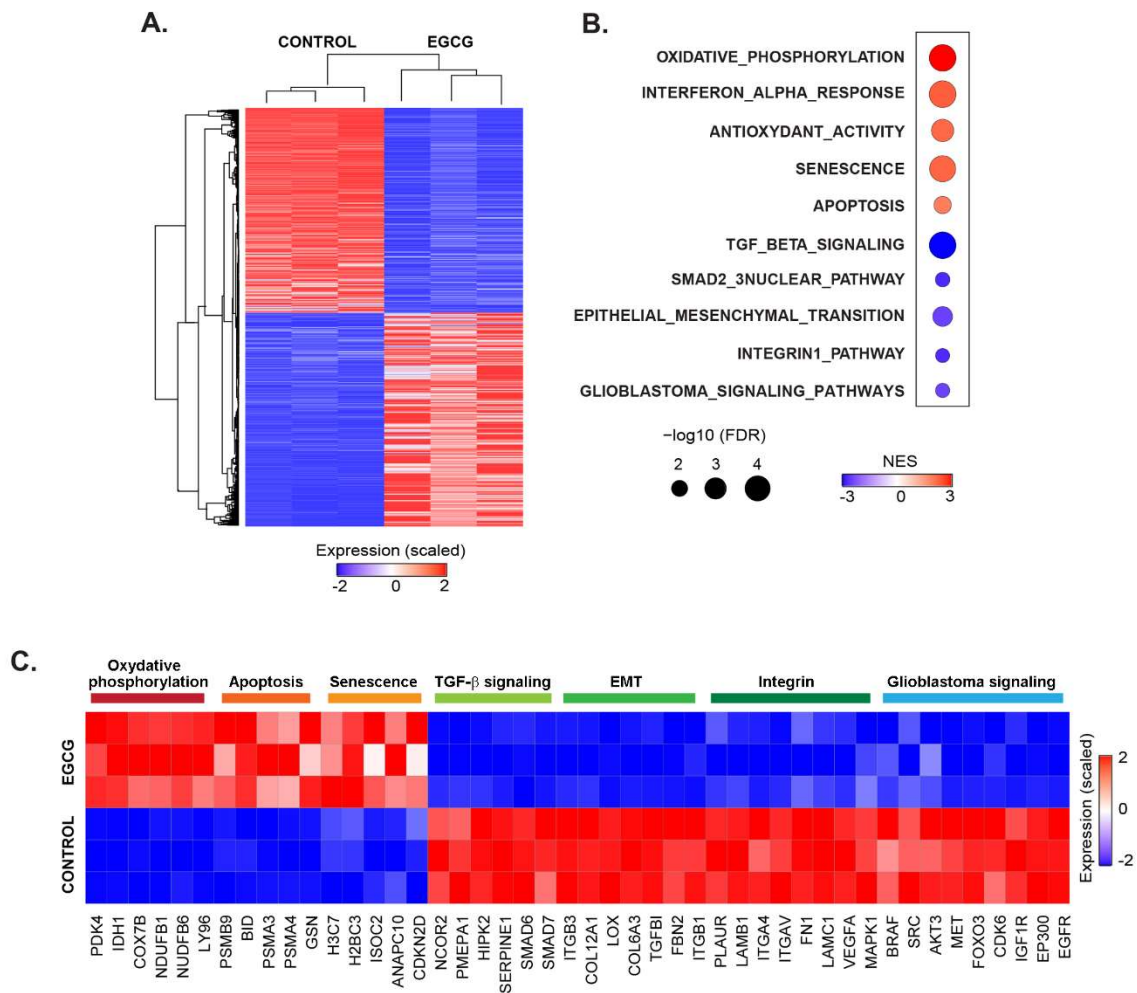
The 67LR is also known to be overexpressed on the cell surface of various tumour cells, and expression level strongly correlated with the risk of tumour invasion and metastasis (Menard et al., 1998), and potentially regulating EMT (Morais Freitas et al., 2007).

## 2.7 Conclusion

In conclusion, while neurospheres assays are commonly used to uncover more relevant brain tumor biology than traditional culture conditions, one needs to acknowledge that such assays at this stage may still preclude direct clinical application. Here, we unravel a new RPSA/Snail original signaling axis regulating the global adaptative apoptotic, EMT, and CSC phenotypes triggered upon 3D spheroids culture, and which can be prevented through diet-derived intervention such as through EGCG.

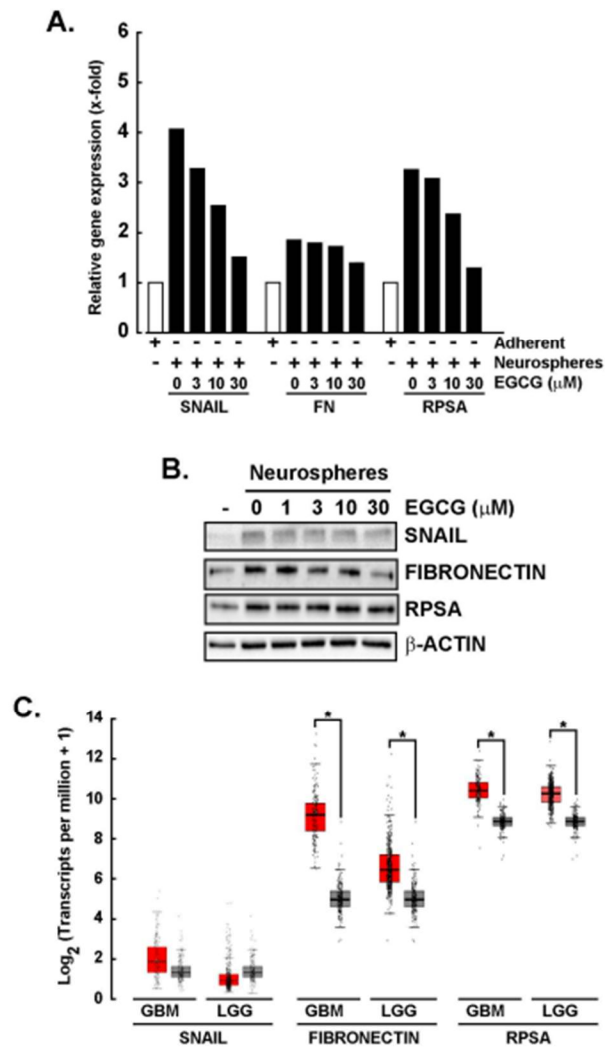


**Figure 2.1:** EGCG alters neurospheres size and reverses the acquisition of a cancer-stem cell phenotype. **A)** U87 glioblastoma monolayers were cultured with the Tumorsphere Medium Xf with SupplementMix for the indicated times in the absence or presence of increasing EGCG concentrations and spheroids. The scale bar indicates the length of 500 µm Representative phase contrast pictures were taken, and **B)** 72 hours spheroid size quantified as described in the Methods section. **C)** Total RNA was extracted from adherent or neurospheres generated upon 72 hours in the presence of increasing EGCG concentrations. RT-qPCR analysis was used to assess the expression of CSC markers CD133, SOX2, and NANOG. **D)** Cell lysates were harvested from adherent or spheroids obtained at 72 hours in the absence or presence of 30 µM EGCG. Western blot analysis of protein expression was performed as described in the Methods section of the described markers. **E)** *In silico* analysis of CSC markers transcript levels in clinical samples from GBM (red boxes) and LGG (grey boxes)

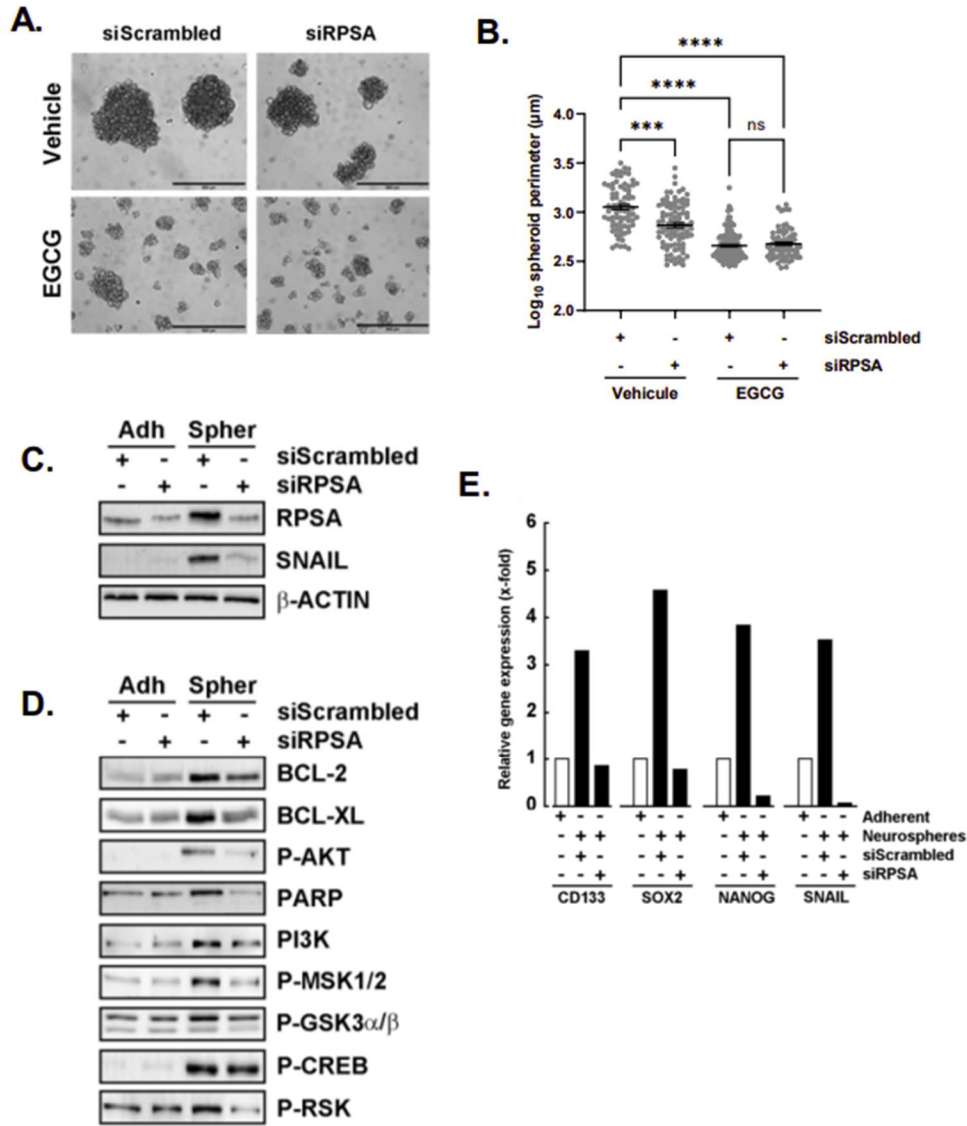


**Figure 2.2:** Transcriptomic analysis reveals the reversion of epithelial to mesenchymal transition in profit to an apoptotic program upon EGCG treatment of glioblastoma spheroids. **A)** Total RNA was extracted from control- and EGCG- treated U87 spheroids from three independent experiments and subjected to RNA-Sequencing. Unsupervised hierarchical clustering of all the genes differentially expressed in pairwise comparison was tested with adjusted  $p$  value  $\leq 0.05$  and  $\log_2$  fold change  $\geq 1.0$ . A  $\log_2$  type scale was used for analysis **B)** Dot plot showing changes in the normalized enrichment score (NES) for the most enriched pathways in EGCG-treated U87 spheroids compared to untreated control cells. FDR  $p$  value  $\leq 0.05$ . The top up- and down-regulated gene signatures of Hallmark, Canonical pathways, and Gene Ontology. . A  $\log_2$  type scale was used for analysis **C)** Heatmap representation of the relative expression of known phenotypic markers for each indicated cellular process. . A  $\log_2$  type scale was used for analysis



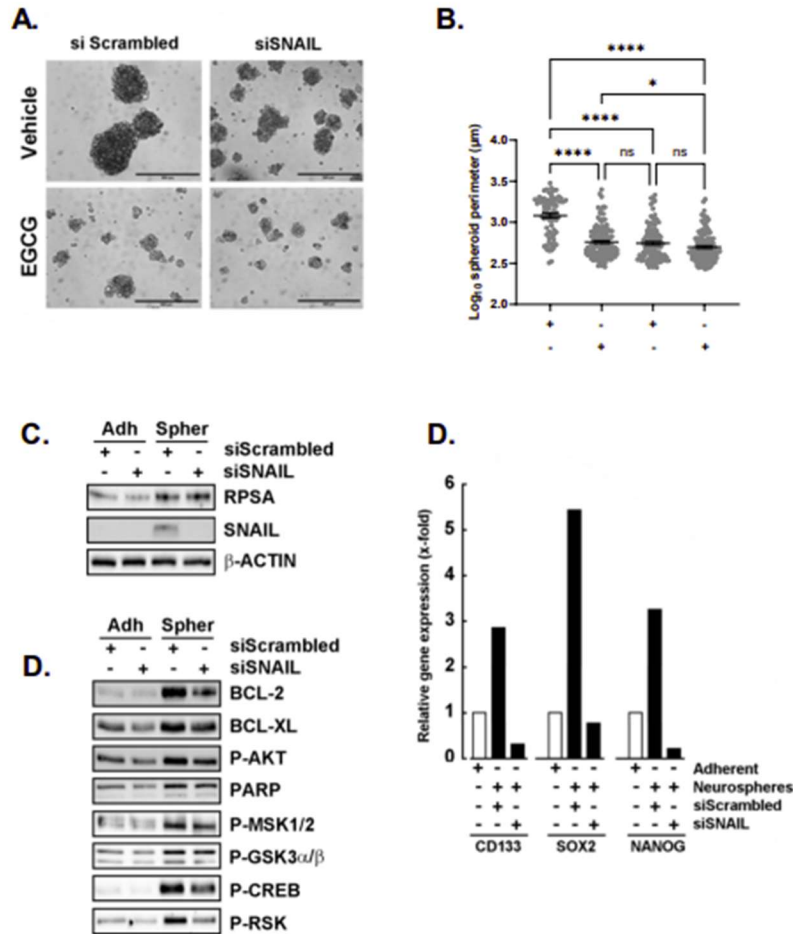


**Figure 2.3:** EGCG alters neurospheres' epithelial-to-mesenchymal transition phenotype. **A)** U87 glioblastoma monolayers were cultured with the Tumorsphere Medium Xf with SupplementMix to generate spheroids for 72 hours in the absence or presence of increasing EGCG concentrations. Total RNA was extracted from adherent or neurospheres, and RT-qPCR analysis was used to assess the expression of EMT markers SNAIL, Fibronectin (FN), and RPSA (67 kDa Laminin Receptor). **B)** Cell lysates were harvested from adherent or spheroids obtained at 72 hours in the absence or presence of increasing EGCG concentrations. Western blot analysis of protein expression was performed as described in the Methods section of the described markers. **C)** *In silico* analysis of EMT markers transcript levels in clinical samples from GBM (red boxes) and LGG (grey boxes)

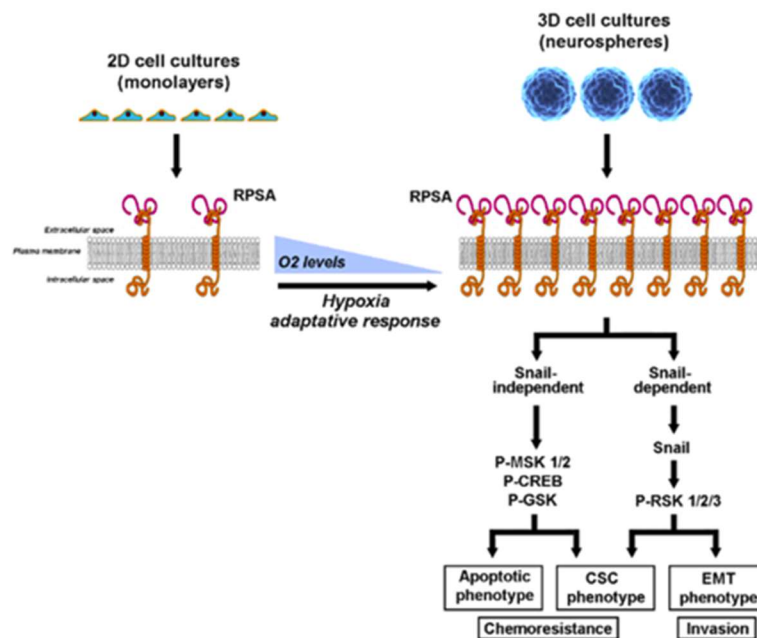


**Figure 2.4:** Repression of the 67 kDa Laminin Receptor (RPSA) alters spheroids formation and prevents the acquisition of a cancer stem cell phenotype. **A)** U87 glioblastoma monolayers were transiently transfected with a scrambled sequence (siScrambled) or with a siRNA directed against RPSA (siRPSA). Next, the cells were cultured with the Tumorsphere Medium Xf with SupplementMix for 72 hours in the absence or presence of 30  $\mu$ M EGCG. Representative phase contrast pictures of the spheroids formed were taken (the scale bar indicates the length of 500  $\mu$ m), and **B)** 72 hours spheroid size quantified as described in the Methods section. (\*\*\*) = 0.001  $\geq$  p  $\geq$  0.0001; \*\*\*\* = 0.0001  $\geq$  p). Cell lysates were harvested from adherent or spheroids obtained at 72 hours and upon transient siScrambled or siRPSA transfection. Western blot analysis of **C)** EMT markers RPSA, SNAIL, and  $\beta$ -Actin, as well as the indicated **D)** apoptosis and transducing intermediates expression was performed as described in the Methods section. **E)** Total RNA was extracted

from adherent or neurospheres, and RT-qPCR analysis was used to assess the expression of CSC markers (CD133, SOX2, and NANOG), and EMT marker SNAIL.



**Figure 2.5:** Repression of SNAIL alters spheroids formation, prevents the acquisition of a cancer stem cell phenotype, but does not affect the acquisition of the apoptotic signature. **A)** U87 glioblastoma monolayers were transiently transfected with a scrambled sequence (siScrambled) or with a siRNA directed against SNAIL (siSNAIL). Next, the cells were cultured with the Tumorsphere Medium Xf with SupplementMix for 72 hours in the absence or presence of 30  $\mu$ M EGCG. Representative phase contrast pictures of the spheroids formed were taken (the scale bar indicates the length of 500  $\mu$ m), and **B)** 72 hours spheroid size quantified as described in the Methods section. (\*\*\* = 0.001  $\geq$  p  $\geq$  0.0001; \*\*\*\* = 0.0001  $\geq$  p). Cell lysates were harvested from adherent or spheroids obtained at 72 hours and upon transient siScrambled or siSNAIL transfection. Western blot analysis of **C)** EMT markers RPSA, SNAIL, and  $\beta$ -Actin, as well as the indicated **D)** apoptosis and transducing intermediates expression was performed as described in the Methods section. **E)** Total RNA was extracted from adherent or neurospheres, and RT-qPCR analysis was used to assess the expression of CSC markers (CD133, SOX2, and NANOG).



**Figure 2.6:** Schematic representation summarizing the crosstalk linking Snail to RPSA, and the action of EGCG on the neurosphere molecular signature. U87 glioblastoma monolayers (2D cell cultures) can be cultured into 3D neurospheres and recapitulate the CSC invasive and chemoresistant phenotypes, through in part induction of the epithelial-to-mesenchymal (EMT) process and adaptive response to low O<sub>2</sub> levels (hypoxia) when spheroids are formed. Neurospheres express increased RPSA levels which contributes to both a Snail-dependent and Snail-independent events. EGCG was demonstrated to target Snail-dependent signaling through the reduction of EMT biomarkers, RSK phosphorylation, and to lead to reduced spheroids size and CSC phenotype. A potential adaptive apoptotic phenotype also involves a Snail-independent signaling where RPSA regulates the phosphorylation status of MSK/CREB/GSK3 $\alpha/\beta$  during spheroids formation. Altogether, current EGCG pharmacological intervention against the acquisition of a CSC phenotype supports its chemopreventive properties.

## 2.8 References

- Akrida I, Bravou V, Papadaki H. The deadly cross-talk between Hippo pathway and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cancer. *Mol Biol Rep.* 2022 Oct;49(10):10065-10076. doi: 10.1007/s11033-022-07590-z. Epub 2022 May 23. PMID: 35604626.
- Alves ALV, Gomes INF, Carloni AC, Rosa MN, da Silva LS, Evangelista AF, Reis RM, Silva VAO. Role of glioblastoma stem cells in cancer therapeutic resistance: a perspective on antineoplastic agents from natural sources and chemical derivatives. *Stem Cell Res Ther.* 2021 Mar 24;12(1):206. doi: 10.1186/s13287-021-02231-x. PMID: 33762015; PMCID: PMC7992331.
- Amereh M, Edwards R, Akbari M, Nadler B. In-Silico Modeling of Tumor Spheroid Formation and Growth. *Micromachines (Basel).* 2021 Jun 25;12(7):749. doi: 10.3390/mi12070749. PMID: 34202262; PMCID: PMC8303756.
- Avila-Carrasco L, Majano P, Sánchez-Toméro JA, Selgas R, López-Cabrera M, Aguilera A, González Mateo G. Natural Plants Compounds as Modulators of Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Front Pharmacol.* 2019 Jul 30;10:715. doi: 10.3389/fphar.2019.00715. PMID: 31417401; PMCID: PMC6682706.
- Bhattacharya S, Calar K, de la Puente P. Mimicking tumor hypoxia and tumor-immune interactions employing three-dimensional in vitro models. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020 May 1;39(1):75. doi: 10.1186/s13046-020-01583-1. PMID: 32357910; PMCID: PMC7195738.
- Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, Zheng S, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell.* 2013 Oct 10;155(2):462-77. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.034.
- Britschgi A, Simon HU, Tobler A, Fey MF, Tschan MP. Epigallocatechin-3-gallate induces cell death in acute myeloid leukaemia cells and supports all-trans retinoic acid-induced neutrophil differentiation via death-associated protein kinase 2. *Br J Haematol.* 2010 Apr;149(1):55-64. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.08040.x. Epub 2010 Jan 20. PMID: 20096012.
- Buyuk B, Jin S, Ye K. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Signaling Pathways Responsible for Breast Cancer Metastasis. *Cell Mol Bioeng.* 2021 Sep 2;15(1):1-13. doi: 10.1007/s12195-021-00694-9. PMID: 35096183; PMCID: PMC8761190.
- Carbonell WS, DeLay M, Jahangiri A, Park C C, Aghi M K.  $\beta$ 1 integrin targeting potentiates antiangiogenic therapy and inhibits the growth of bevacizumab-resistant glioblastoma. *Cancer Res.* 2013 May 15;73(10):3145-54. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0011. PMID: 23644530.
- Chan MM, Chen R, Fong D. Targeting cancer stem cells with dietary phytochemical - Repositioned drug combinations. *Cancer Lett.* 2018 Oct 1;433:53-64. doi: 10.1016/j.canlet.2018.06.034. Epub 2018 Jun 28. PMID: 29960048; PMCID: PMC7117025.
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics.* 2018 Sep 1;34(17):i884-i890. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560. PMID: 30423086.
- Chen W, Zhang Y, Li R, Huang W, Wei X, Zeng D, Liang Y, Zeng Y, Chen M, Zhang L, Gao W, Zhu Y, Li Y, Zhang G. Notch3 Transactivates Glycogen Synthase Kinase-3-Beta and Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal

- Transition in Breast Cancer Cells. *Cells*. 2022 Sep 14;11(18):2872. doi: 10.3390/cells11182872. PMID: 36139447; PMCID: PMC9497076.
- Davies AH, Reipas K, Hu K, Berns R, Firmino N, Stratford AL, Dunn SE. Inhibition of RSK with the novel small-molecule inhibitor LJI308 overcomes chemoresistance by eliminating cancer stem cells. *Oncotarget*. 2015 Aug 21;6(24):20570-7. doi: 10.18632/oncotarget.4135. PMID: 26011941; PMCID: PMC4653026.
- Djedjai S, Gonzalez Suarez N, El Cheikh-Hussein L, Rodriguez Torres S, Gresseau L, Dhayne S, Joly-Lopez Z, Annabi B. MT1-MMP Cooperates with TGF- $\beta$  Receptor-Mediated Signaling to Trigger SNAIL and Induce Epithelial-to-Mesenchymal-like Transition in U87 Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 30;22(23):13006. doi: 10.3390/ijms222313006. PMID: 34884812; PMCID: PMC8657819.
- Fujimura Y, Kumazoe M, Tachibana H. 67-kDa Laminin Receptor-Mediated Cellular Sensing System of Green Tea Polyphenol EGCG and Functional Food Pairing. *Molecules*. 2022 Aug 11;27(16):5130. doi: 10.3390/molecules27165130. PMID: 36014370; PMCID: PMC9416087.
- Gonzalez Suarez N, Fernandez-Marrero Y, Torabidastgerdooei S, Annabi B. EGCG Prevents the Onset of an Inflammatory and Cancer-Associated Adipocyte-like Phenotype in Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Response to the Triple-Negative Breast Cancer Secretome. *Nutrients*. 2022 Mar 5;14(5):1099. doi: 10.3390/nu14051099. PMID: 35268073; PMCID: PMC8912398.
- Han X, Kuang Y, Chen H, Liu T, Zhang J, Liu J. p19INK4d: More than Just a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. *Curr Drug Targets*. 2020;21(1):96-102. doi: 10.2174/1389450120666190809161901. PMID: 31400265 Review.
- Huang Z, Zhang Z, Zhou C, Liu L, Huang C. Epithelial-mesenchymal transition: The history, regulatory mechanism, and cancer therapeutic opportunities. *MedComm (2020)*. 2022 May 18;3(2):e144. doi: 10.1002/mco2.144. PMID: 35601657; PMCID: PMC9115588.
- Laks DR, Masterman-Smith M, Visnyei K, Angenieux B, Orozco NM, Foran I, Yong WH, Vinters HV, Liau LM, Lazareff JA, Mischel PS, Cloughesy TF, Horvath S, Kornblum HI. Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma. *Stem Cells*. 2009 Apr;27(4):980-7. doi: 10.1002/stem.15. PMID: 19353526; PMCID: PMC3177534.
- Le CT, Leenders WPJ, Molenaar RJ, van Noorden CJF. Effects of the Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate on Glioma: A Critical Evaluation of the Literature. *Nutr Cancer*. 2018 Apr;70(3):317-333. doi: 10.1080/01635581.2018.1446090. Epub 2018 Mar 23. PMID: 29570984.
- Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Oct;2(10):a003236. doi: 10.1101/cshperspect.a003236. Epub 2010 Aug 18. PMID: 20719876; PMCID: PMC2944361.
- Liu K, Tsung K, Attenello FJ. Characterizing Cell Stress and GRP78 in Glioma to Enhance Tumor Treatment. *Front Oncol*. 2020 Dec 11;10:608911. doi: 10.3389/fonc.2020.608911. PMID: 33363039; PMCID: PMC7759649.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8. PMID: 25516281.

- Ménard S, Tagliabue E, Colnaghi MI. The 67 kDa laminin receptor as a prognostic factor in human cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;52(1-3):137-45. doi: 10.1023/a:1006171403765. PMID: 10066078.
- Morais Freitas V, Nogueira da Gama de Souza L, Cyreno Oliveira E, Furuse C, Cavalcanti de Araújo V, Gastaldoni Jaeger R. Malignancy-related 67kDa laminin receptor in adenoid cystic carcinoma. Effect on migration and beta-catenin expression. *Oral Oncol.* 2007 Nov;43(10):987-98. doi: 10.1016/j.oraloncology.2006.11.005. Epub 2007 Jan 25. PMID: 17257887.
- Mortezaee K, Majidpoor J, Kharazinejad E. Epithelial-mesenchymal transition in cancer stemness and heterogeneity: updated. *Med Oncol.* 2022 Sep 7;39(12):193. doi: 10.1007/s12032-022-01801-0. PMID: 36071302.
- Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl).* 2015 Dec 11;3:83-92. doi: 10.2147/HP.S93413. PMID: 27774485; PMCID: PMC5045092.
- Olmez I, Zhang Y, Manigat L, Benamar M, Brenneman B, Nakano I, Godlewski J, Bronisz A, Lee J, Abbas T, Abounader R, Purow B. Combined c-Met/Trk Inhibition Overcomes Resistance to CDK4/6 Inhibitors in Glioblastoma. *Cancer Res.* 2018 Aug 1;78(15):4360-4369. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3124. Epub 2018 May 29. PMID: 29844123 Free PMC article.
- Pavon LF, Marti LC, Sibov TT, Malheiros SM, Brandt RA, Cavalheiro S, Gamarra LF. In vitro Analysis of Neurospheres Derived from Glioblastoma Primary Culture: A Novel Methodology Paradigm. *Front Neurol.* 2014 Jan 7;4:214. doi: 10.3389/fneur.2013.00214. PMID: 24432012; PMCID: PMC3883037.
- Sadrkhanloo M, Entezari M, Orouei S, Ghollasi M, Fathi N, Rezaei S, Hejazi ES, Kakavand A, Saebfar H, Hashemi M, Goharrizi MASB, Salimimoghadam S, Rashidi M, Taheriazam A, Samarghandian S. STAT3-EMT axis in tumors: Modulation of cancer metastasis, stemness and therapy response. *Pharmacol Res.* 2022 Aug;182:106311. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106311. Epub 2022 Jun 15. PMID: 35716914.
- Saitoh M. Epithelial-Mesenchymal Transition by Synergy between Transforming Growth Factor- $\beta$  and Growth Factors in Cancer Progression. *Diagnostics (Basel).* 2022 Sep 1;12(9):2127. doi: 10.3390/diagnostics12092127. PMID: 36140527; PMCID: PMC9497767.
- Shammas MA, Neri P, Koley H, Batchu RB, Bertheau RC, Munshi V, Prabhala R, Fulciniti M, Tai YT, Treon SP, Goyal RK, Anderson KC, Munshi NC. Specific killing of multiple myeloma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate extracted from green tea: biologic activity and therapeutic implications. *Blood.* 2006 Oct 15;108(8):2804-10. doi: 10.1182/blood-2006-05-022814. Epub 2006 Jun 29. PMID: 16809610; PMCID: PMC1895573.
- Sicard AA, Dao T, Suarez NG, Annabi B. Diet-Derived Gallated Catechins Prevent TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition, Cell Migration and Vasculogenic Mimicry in Chemosensitive ES-2 Ovarian Cancer Cells. *Nutr Cancer.* 2021;73(1):169-180. doi: 10.1080/01635581.2020.1733624. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32126843.
- Smiley SB, Zarrinmayeh H, Das SK, Pollok KE, Vannier MW, Veronesi MC. Novel therapeutics and drug-delivery approaches in the modulation of glioblastoma stem cell resistance. *Ther Deliv.* 2022 Apr;13(4):249-273. doi: 10.4155/tde-2021-0086. Epub 2022 May 26. PMID: 35615860.



- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 25;102(43):15545-50. doi: 10.1073/pnas.0506580102. Epub 2005 Sep 30. PMID: 16199517.
- Sun HR, Wang S, Yan SC, Zhang Y, Nelson PJ, Jia HL, Qin LX, Dong QZ. Therapeutic Strategies Targeting Cancer Stem Cells and Their Microenvironment. *Front Oncol*. 2019 Oct 24;9:1104. doi: 10.3389/fonc.2019.01104. PMID: 31709180; PMCID: PMC6821685.
- Taghibakhshi A, Barisam M, Saidi MS, Kashaninejad N, Nguyen NT. Three-Dimensional Modeling of Avascular Tumor Growth in Both Static and Dynamic Culture Platforms. *Micromachines (Basel)*. 2019 Aug 31;10(9):580. doi: 10.3390/mi10090580. PMID: 31480431; PMCID: PMC6780963.
- Vijay GV, Zhao N, Den Hollander P, Toneff MJ, Joseph R, Pietila M, Taube JH, Sarkar TR, Ramirez-Pena E, Werden SJ, Shariati M, Gao R, Sobieski M, Stephan CC, Sphyris N, Miura N, Davies P, Chang JT, Soundararajan R, Rosen JM, Mani SA. GSK3 $\beta$  regulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2019 Mar 7;21(1):37. doi: 10.1186/s13058-019-1125-0. PMID: 30845991; PMCID: PMC6407242.
- Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, deCarvalho AC, Lyu S, Li P, Li Y, Barthel F, Cho HJ, Lin YH, Satani N, Martinez-Ledesma E, Zheng S, Chang E, Sauv e CG, Olar A, Lan ZD, Finocchiaro G, Phillips JJ, Berger MS, Gabrusiewicz KR, Wang G, Eskilsson E, Hu J, Mikkelsen T, DePinho RA, Muller F, Heimberger AB, Sulman EP, Nam DH, Verhaak RGW. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*. 2017 Jul 10;32(1):42-56. e6. doi: 10.1016/j.ccell.2017.06.003. PMID: 28697342.
- Wen PY, Omuro A, Ahluwalia MS, Fathallah-Shaykh HM, Mohile N, Lager JJ, Laird AD, Tang J, Jiang J, Egile C, Cloughesy TF. Phase I dose-escalation study of the PI3K/mTOR inhibitor voxalisib (SAR245409, XL765) plus temozolomide with or without radiotherapy in patients with high-grade glioma. *Neuro Oncol*. 2015 Sep;17(9):1275-83. doi: 10.1093/neuonc/nov083. Epub 2015 May 26.
- Xiang X, Phung Y, Feng M, Nagashima K, Zhang J, Broaddus VC, Hassan R, Fitzgerald D, Ho M. The development and characterization of a human mesothelioma in vitro 3D model to investigate immunotoxin therapy. *PLoS One*. 2011 Jan 31;6(1):e14640. doi: 10.1371/journal.pone.0014640. PMID: 21305058; PMCID: PMC3031536.
- Xu Y, Lee SH, Kim HS, Kim NH, Piao S, Park SH, Jung YS, Yook JI, Park BJ, Ha NC. Role of CK1 in GSK3beta-mediated phosphorylation and degradation of Snail. *Oncogene*. 2010 May 27;29(21):3124-33. doi: 10.1038/onc.2010.77. Epub 2010 Mar 22. PMID: 20305697.
- Yang TM, Barbone D, Fennell DA, Broaddus VC. Bcl-2 family proteins contribute to apoptotic resistance in lung cancer multicellular spheroids. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009 Jul;41(1):14-23. doi: 10.1165/rcmb.2008-0320OC. Epub 2008 Dec 18. PMID: 19097992; PMCID: PMC2701959.
- Zhang J, Furuta T, Sabit H, Tamai S, Jiapaer S, Dong Y, Kinoshita M, Uchida Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Zhao S, Nakada M. Gelsolin inhibits malignant phenotype of glioblastoma and is regulated by miR-654-5p and miR-450b-5p. *Cancer Sci*. 2020 Jul;111(7):2413-2422. doi: 10.1111/cas.14429. Epub 2020 May 29. PMID: 32324311.

Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol.* 2004 Oct;6(10):931-40. doi: 10.1038/ncb1173. Epub 2004 Sep 26. PMID: 15448698.

## CHAPITRE 3

### DISCUSSION

Le but de la recherche présentée était de déterminer si l'EGCG, une des catéchines venant du thé vert (Weiseman et al., 1997), peut prévenir l'acquisition du phénotype souche des GBM. Cela comprend des altérations au niveau de l'expression de plusieurs protéines.

Il y a en premier lieu des protéines dont l'expression est altérée lorsque les cellules cancéreuses se transforment en CSC. D'ailleurs, leurs niveaux d'expressions sont souvent analysés lors des recherches sur les CSC. À cause de cela, ces protéines sont connues sous le nom de marqueurs à CSC (Karsten & Goletz, 2013). Il y a aussi une altération dans l'expression des protéines anti-apoptotiques. Cela permettrait aux CSC d'échapper à l'apoptose et aussi d'acquérir un phénotype de CSC (lui et al., 2006). De plus, plusieurs autres protéines impliquées dans des voies de signalisations qui contribuent à la prolifération cellulaire des CSC ont une expression altérée dans celles-ci (Brown et al., 2017). En dernier lieu, l'obtention du phénotype souche cancéreux peut se faire à travers la transition épithélio-mésenchymateuse (TÉM), un processus où les cellules épithéliales deviennent polarisées afin d'avoir un phénotype mésenchymateux. Ce phénomène permet la métastase et la migration des cellules cancéreuses (Mani et al., 2008; Iwamoto, 2016).

L'acquisition du phénotype de CSC à travers l'utilisation du modèle de sphéroïdes de cellules U87 a permis de confirmer que les marqueurs de CSC CD133, SOX2 et NANOG sont surexprimés lorsque les cellules U87 sont sous la forme de sphéroïdes que lorsqu'ils sont en monocouche (Fan et al, 2010; Yilmazer, 2018). Puisque la recherche se concentre sur la prévention, l'EGCG a été introduit au début de la formation des sphéroïdes. Elle a réussi à prévenir la formation de sphéroïdes matures de façon dose-dépendante (Zhu et al., 2017), ainsi prouvant les caractéristiques anti-cancéreuses qu'elle possède (Ahn et al, 1999). L'expression des marqueurs à CSC a été réduite lors du traitement à l'EGCG, ce qui est accord avec l'étude de Zhu et al (Zhu et al., 2017).

La diminution de l'expression de CD133 et NANOG par l'EGCG a été observée en dose-réponse, à l'exception de SOX2 où l'expression était plus élevée lorsque les sphéroïdes ont subi le traitement à 3  $\mu\text{M}$  d'EGCG. C'est seulement à 10  $\mu\text{M}$  que son expression commence à réduire. Il se pourrait que cette concentration d'EGCG ne soit pas suffisante pour réduire son expression. En effet, une étude de Tang et al a démontré

que l'expression de SOX2 n'est pas réduite dans les CSC de pancréas comparé à NANOG où son expression a été réduite (Tang et al., 2012). Cependant, une autre étude de Jiang et al a démontré que l'expression de SOX2 était réduite de façon dose-dépendante dans les CSC de poumon (Jiang et al., 2018). Ainsi, l'expression des marqueurs à CSC peut varier en fonction du type de cancer. Cependant, nous ne sommes pas certains si le niveau d'expression des marqueurs à CSC dépend de la taille des sphéroïdes. Les résultats pourraient démontrer en effet, que l'expression de ces marqueurs serait une conséquence de la formation des sphéroïdes. Cependant, il se pourrait que la surexpression d'un marqueur ou de quelques marqueurs à CSC engendrerait la formation (Yilmazer, 2018).

La transition épithélio-mésenchymateuse (TÉM) est un processus crucial dans la progression tumorale. En effet, l'acquisition du phénotype mésenchymateux a manifesté des aspects similaires avec l'acquisition d'un phénotype souche dans les cellules cancéreuses (Iwadate, 2016). À cause de cela, il est important de déterminer si la TÉM est un processus qui pourrait arriver dans les CSC de glioblastome. Cela a été déterminé en regardant l'expression des protéines SNAIL et FIBRONECTINE. Les résultats démontrent que l'expression de SNAIL, et par conséquent celle de la FIBRONECTINE, est augmentée lorsque les sphéroïdes sont formés. Cela veut aussi dire que les CSC peuvent subir une TÉM, et que ces deux gènes y seraient impliqués (Liu et al., 2006). L'EGCG réduit l'expression des deux marqueurs de façon dose-dépendante, ce qui veut dire qu'il peut prévenir la TÉM. Il n'y a pas beaucoup de recherche sur l'expression de SNAIL et de FIBRONECTINE dans des modèles de sphéroïdes de glioblastomes. Cependant, une étude de Zhang et al a prouvé que l'utilisation de l'EGCG a ralenti la migration des cellules souches de glioblastomes (Zhang, & Jia, 2008).

Les résultats des sphéroïdes concordent avec les résultats sur les cellules venant des tissus biologiques de glioblastome et de gliome à bas grade. En effet, les cellules de GBM ont une plus haute expression des marqueurs CD133 SOX2 et NANOG, et l'expression de ceux-ci dans les cellules de gliomes à bas grade est plus faible. Cela voudrait dire que plus le grade de gliome est élevé, plus la possibilité d'une acquisition d'un phénotype souche est possible. C'est probablement possible à cause de l'instabilité génomique parmi les cellules de la tumeur qui fait en sorte qu'il y a un forte sous-population de CSC (Safa et al., 2015). De plus, une étude effectuée par Zhang et al. a démontré qu'il y a une corrélation entre l'expression des marqueurs de CSC CD133 et Nestin et le niveau de grade du gliome (Zhang et al., 2008).

On voit des résultats similaires avec les marqueurs de la TÉM. Nos résultats indiquent que l'expression des marqueurs est plus élevée dans les cellules de GBM que dans les cellules de gliomes à bas grades. Cela concorde encore avec le fait que les CSC de GBM ont des points en commun avec les gliomes de hauts grades. Cela serait le cas aussi avec le TÉM (Ning et al., 2020; Takashima et al., 2019).

Les résultats transcriptomiques révèlent les voies de signalisation impliquées dans la prévention de l'acquisition d'un phénotype souche à travers l'EGCG. Une des voies de phosphorylation qui est sollicitée lors du traitement est la voie de la phosphorylation oxydative. Cela voudrait donc dire que cette voie serait nécessaire pour prévenir l'acquisition d'un phénotype souche. La littérature indique que la phosphorylation oxydative serait utilisée pour la progression tumorale (Van Noorden et al., 2021; Peiris-Pagès et al., 2016). Cependant, une étude a démontré que l'augmentation de la phosphorylation oxydative peut être aussi présente lorsqu'un traitement est utilisé afin de réduire la viabilité des cellules souches de glioblastome (Michelakis et al., 2010). Les différents résultats obtenus sont probablement une conséquence de l'hétérogénéité du génome des cellules présentes dans une tumeur.

Une autre voie de signalisation qui est sollicitée lors du traitement à l'EGCG est la voie de la réponse de l'interféron alpha (IFN- $\alpha$ ). La voie de signalisation de IFN- $\alpha$  implique l'activation de STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1), ce qui résulte à l'activation de protéines supplémentaires impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose. (Gil, & Esteban, M., 2000; Jagus et al., 1999). Alors, il se pourrait que l'EGCG agit en tant que ligand au récepteur de l'IFN- $\alpha$ . Cependant, il n'y a pas d'étude qui peut confirmer cette hypothèse, alors de la recherche plus approfondie serait nécessaire.

La troisième voie qui serait importante lors du traitement à l'EGCG selon les résultats transcriptomiques serait la sénescence. La sénescence est un phénomène où il y a un arrêt de la croissance cellulaire. Elle peut par conséquent contribuer au traitement thérapeutique contre le cancer (Fakhri et al., 2021). C'était le cas dans une étude effectuée par Udroui et al où les résultats démontrent que l'EGCG augmente le taux de sénescence dans les cellules de glioblastome U251 (Udroui et al., 2019). En sachant cela, il serait possible que l'EGCG engendre aussi la sénescence dans les CSC de glioblastomes.

Le traitement à l'EGCG a provoqué aussi la baisse de l'activité de certaines voies de signalisation. Les trois plus importantes seraient : la signalisation de TGF- $\beta$ , la TÉM et la voie de signalisation de l'intégrine. Cela voudrait donc dire que ces voies de signalisation contribueraient à la progression tumorale des CSC de GBM. En effet, il a été prouvé que la TGF- $\beta$  peut contribuer à la progression tumorale des GBM (Roy et al.,

2015) et les CSC mésenchymaux des glioblastomes (Beier et al., 2012). De plus, une étude de Roth, et al. a démontré que l'intégrine contrôle l'expression de la TGF- $\beta$ , et que l'inhibition de celle-ci empêche l'expression de la TGF- $\beta$ . De plus, une étude de Lathia et al a démontré qu'il y a une forte expression de l'intégrine  $\alpha 6$  dans les cellules souches de glioblastomes.

Il a fallu par la suite déterminer si les voies de signalisations anti-apoptotiques sont utilisées lors de l'obtention du phénotype souche de CSC de GBM. Cela a été fait en examinant l'expression des marqueurs BCL-XL et BCL-2. Leur expression a augmenté lors de la formation des sphéroïdes. Cependant, BCL-XL semble avoir une expression plus élevée que BCL-2. Cela veut donc dire que cette protéine serait la plus sollicitée dans CSC de GBM afin de permettre la progression tumorale (He et al., 2022; Campbell & Tait, 2018). L'EGCG permet la baisse de l'expression des deux marqueurs. En effet, l'EGCG inhibe la viabilité des cellules cancéreuses, et elle le fait en inhibant l'expression des protéines anti-apoptotiques tels que BCL-2 et BCL-XL, ainsi qu'en permettant la surexpression des protéines pro-apoptotiques (Zhang et al. 2015; Shankar et al. 2007). Cependant, la baisse de leurs expressions n'est pas aussi prononcée que les autres protéines analysées en immunobuvardage. Il se pourrait que cette voie de signalisation ne soit pas la plus importante pour la prévention de l'acquisition du phénotype souche. On peut en effet le constater dans les résultats de données transcriptomiques : parmi les voies de signalisations qui sont sollicitées lors du traitement à l'EGCG, l'apoptose semble être la moins importante.

La voie de signalisation PI3K/AKT est une voie qui est souvent sollicitée lors de la progression tumorale des GBM (Chakravarti, A. et al., 2004), ce qui fait en sorte qu'elle pourrait être utilisée pour l'acquisition du phénotype souche de celles-ci. Les résultats démontrent une augmentation de l'expression de PI3K et le niveau de phosphorylation d'AKT lorsque les sphéroïdes sont formés. Cela veut dire que ces protéines sont importantes pour l'obtention du phénotype souche des GBM et possiblement leur progression tumorale (Wei et al, 2013). Par la suite, un traitement à l'EGCG réduit l'expression de PI3K. Puisque nous savons que l'EGCG réduit la taille des sphéroïdes et empêche la progression tumorale, et que PI3K est impliqué dans la progression tumorale, il est normal de voir une baisse de son expression. De plus, une étude de Sun, et al. a démontré que l'EGCG peut inhiber l'activité de PI3K (Sun et al., 2020).

Malgré le fait que la littérature démontre que l'EGCG peut réduire le niveau de phosphorylation d'AKT dans des cellules cancéreuses (Sun et al., 2020; Zhang et al., 2015), les résultats démontrent que la baisse de la phosphorylation d'AKT n'est pas très significative. Cela pourrait en premier lieu être due au protocole

utilisé. En effet, les sphéroïdes de Zhang et al. ont été obtenus en utilisant un milieu DMEM F12 avec le supplément B27, le facteur de croissance de fibroblaste de base à 20 ng/ml et le facteur de croissance épidermique à 20 ng/ml, tandis que nous avons utilisé le milieu TumosphereMedium Xf avec le SupplementMix. Cela peut donner des résultats différents. De plus l'activation d'AKT peut se faire via des voies de signalisations autres que la PI3K. Ces signalisations pourraient aussi être responsables à la résistance aux traitement thérapeutiques. Par conséquent, il serait préférable de viser plusieurs cibles qui sont impliquées dans la voie de signalisation de PI3K/AKT (Sami & Karsy, 2013; Tamburini et al., 2008; Molina et al., 2010).

Un des substrats de la protéine AKT est la protéine GSK3 $\alpha\beta$  (GSK3). En effet, la phosphorylation de celle-ci peut se faire à travers la voie de signalisation PI3K/AKT (Wong et al., 2007). Cette voie de signalisation pourrait être responsable de l'augmentation de la phosphorylation de GSK3 lors de la formation des sphéroïdes. En effet, la phosphorylation de GSK3 mène à une accumulation du promoteur de cycle cellulaire Cyclin D1 (Diehl et al., 1998). Cela veut donc dire que l'inhibition de GSK3 est nécessaire pour l'acquisition du phénotype de cellules souches de GBM. Le niveau de phosphorylation diminue lorsque l'EGCG est utilisé. Cela peut être due au fait que l'EGCG peut inhiber l'expression de PI3K et la phosphorylation d'AKT et par conséquent engendrer la baisse de phosphorylation de GSK3.

On a voulu par la suite déterminer si l'obtention d'un phénotype de cellules souches provoque la réparation de l'ADN à travers l'activité de PARP. Puisque les cellules souches cancéreuses ont la capacité de réparer l'ADN endommagé afin qu'elles puissent survivre, il est normal qu'il y ait une hausse de son expression lorsque le phénotype de cellules souches est obtenu (Lesueur et al., 2018). Il y a aussi une augmentation de la quantité de PARP clivé, ce qui voudrait dire qu'il y aurait des cellules qui deviennent en apoptose lors de la formation des sphéroïdes. Le traitement à l'EGCG ne semble pas baisser la quantité de PARP. Cela voudrait donc dire que l'EGCG seul n'est pas suffisant pour empêcher la réparation à l'ADN amorcée par cette dernière (Lundholm et al., 2013). Contrairement à la littérature, le traitement à l'EGCG n'engendre pas une hausse de la quantité de PARP clivé. Au contraire, celle-ci diminue lorsque le traitement à l'EGCG est effectué. Cela voudrait donc dire que le mécanisme d'apoptose que l'EGCG inflige sur les sphéroïdes de GBM ne s'effectue pas à travers le clivage de PARP (Ricks et al., 2015; Siegelin et al., 2008).

Par la suite, on a voulu savoir si des voies de phosphorylation supplémentaires sont sollicitées lors de l'acquisition du phénotype souche chez les glioblastomes. Nous avons entre-autres examiné les niveaux

de phosphorylation de MSK1/2 et de CREB, en sachant que lorsque MSK1/2 est phosphorylé, il peut phosphoryler la protéine CREB à travers la voie de signalisation des MAPK. De plus, ce dernier peut stimuler la progression tumorale des GBM (Daniel et al., 2018). Les résultats démontrent qu'il y a une hausse de la phosphorylation des deux protéines que lorsque les sphéroïdes sont formés. Cela veut donc dire que ces protéines contribueraient à la progression tumorale des CSC de GBM. L'EGCG peut réduire le niveau de phosphorylation de ces deux protéines. Malgré le fait qu'il n'y a pas beaucoup de recherche sur l'effet de l'EGCG sur leur niveau de phosphorylation, il a été déjà démontré que l'EGCG peut réduire le niveau de phosphorylation de ERK1/2, une protéine qui peut phosphoryler la protéine MSK1/2 (Chung et al., 2001). Une baisse de phosphorylation de ERK1/2 résulte à une baisse de phosphorylation de MSK1/2 et par conséquent, une baisse de CREB.

CREB est aussi un substrat pour la protéine RSK. La phosphorylation de celle-ci augmente lors de la formation des sphéroïdes. Puisque les isoformes RSK1 et RSK2 peuvent être impliqués dans la progression tumorale de plusieurs types de cancer (Houles & Roux, 2018), il y a des chances qu'elles soient hyperphosphorylées lors de la formation des sphéroïdes. En effet, Sulzmaier et al. a démontré qu'il y a une hausse de l'expression de RSK2 dans les glioblastomes afin d'engendrer l'invasion cellulaire. La phosphorylation diminue lorsque l'EGCG est introduit (Sulzmaier et al., 2016). En effet, des études récentes ont démontré que la protéine RSK2 serait une des cibles de l'EGCG (Chen et al., 2015).

En sachant que l'EGCG forme une interaction avec le récepteur à la laminine 67LR, il était aussi important de déterminer si cette protéine est nécessaire dans la prévention de l'acquisition du phénotype souche des cellules de GBM. Il a fallu avant tout déterminer son expression dans les sphéroïdes. Les résultats démontrent que l'expression du récepteur à la laminine 67LR augmente lorsque les sphéroïdes sont formés. De plus, un knockdown du gène RPSA (gène codant pour le récepteur à la laminine 67LR) empêche le développement optimal de ces dernières.

Le récepteur à la laminine 67LR jouerait aussi un rôle dans la TÉM. En effet, une étude menée par Wu et al. a démontré que le précurseur du récepteur à la laminine 67LR, la protéine 37LRP contribuerait à la métastase des gliomes (Wu et al., 2016). Sur ce, il serait normal de voir une baisse de l'expression de SNAIL et de fibronectine lorsqu'il y a le knockdown du gène RPSA. Les résultats démontrent que ce récepteur est nécessaire pour la TÉM (Wang et al., 2014). Les résultats obtenus sont similaires avec les résultats d'analyse sur les cellules de GBM et les cellules de gliomes à bas grade. L'expression du récepteur à la laminine,



de SNAIL et de RIBRONECTINE étaient plus élevées dans les cellules de glioblastome. Tout cela prouve que l'expression des marqueurs de la TÉM augmente en fonction du niveau de malicité des tumeurs (Tao et al., 2020)

Cette protéine est aussi nécessaire pour la progression tumorale ainsi que pour la maintenance du phénotype souche des GBM (Ménard et al., 1998; Formisano et al., 2012). Malgré le fait que le récepteur à la laminine 67LR est un récepteur pour l'EGCG, son expression dans les sphéroïdes diminue lorsque celles-ci sont traitées à l'EGCG. Cela voudrait donc dire que l'EGCG peut agir à travers une voie de signalisation indépendante au récepteur à la laminine 67LR (Huang et al., 2020; Liu et al., 2019). C'est probablement pour cela que l'EGCG peut tout de même réduire la taille des sphéroïdes qui ont subi un knockdown du gène RPSA.

Des analyses supplémentaires ont été effectuées afin de savoir si la baisse de l'expression du récepteur à la laminine 67LR engendrait des changements dans les voies de signalisation qui sont impliquées dans l'acquisition du phénotype souche des glioblastomes. Une baisse de l'expression du récepteur à la laminine 67LR résulte à une baisse de l'expression des protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-XL. Cela veut donc dire que le récepteur régule l'expression de ces marqueurs afin de permettre la progression tumorale des cellules souches (Li et al., 2016; Lu et al., 2016). Il se pourrait aussi que la baisse de l'expression amène les cellules cancéreuses en apoptose (Moodley & Weiss, 2013). En effet, la quantité de PARP clivé augmente lors de la baisse de l'expression du récepteur.

Une baisse de l'expression du récepteur à la laminine 67LR a mené aussi à une baisse de l'expression de la protéine PI3K, ainsi qu'une baisse de la phosphorylation de la protéine AKT et GSK3 $\alpha\beta$ . En sachant que le récepteur à la laminine 67LR permet la prolifération et la survie cellulaire des cellules cancéreuses (Moodley & Weiss, 2013), il se pourrait qu'elle puisse être capable de réguler l'activité de PI3K, et par conséquent la phosphorylation d'AKT et de GSK3.

La baisse de la phosphorylation de ERK à travers la baisse de l'expression du récepteur à la laminine 67LR pourrait aussi être responsable de la baisse de phosphorylation de MSK1/2 observée dans les résultats (Schuck et al., 2003). Cependant, la baisse de l'expression du récepteur à la laminine 67LR n'a pas l'air d'être suffisante afin de réduire le niveau phosphorylation de CREB. Il se pourrait que le knockdown ne soit pas suffisant pour réduire le niveau de phosphorylation de CREB.

La phosphorylation de la protéine RSK baisse lorsque l'expression du récepteur à la laminine 67LR est réduite. Cela voudrait donc dire que le récepteur permet la progression tumorale à travers la hausse de phosphorylation de RSK. Il se pourrait que la baisse de phosphorylation soit faite via la protéine ERK 1/2. En effet, une étude réalisée par Wu et al. a démontré que la baisse de l'expression du précurseur du récepteur à la laminine 67LR, la protéine 37LRP, peut résulter à une baisse de l'expression de ERK 1/2 (Wu et al., 2016). De plus, cette dernière peut phosphoryler RSK (Bode & Dong, 2013).

Nous avons voulu par la suite déterminer si la protéine SNAIL était importante pour l'acquisition du phénotype souche des cellules de glioblastomes puisque la baisse de l'expression du récepteur à la laminine 67LR résultait en une baisse de l'expression de SNAIL. Les résultats démontrent que le knockdown de SNAIL empêche la formation optimale des sphéroïdes et inhibe l'expression des marqueurs à CSC. Cela veut dire que la protéine SNAIL est importante pour la progression tumorale des CSC des glioblastomes (Kurrey et al., 2009) et par conséquent l'acquisition du phénotype souche. Une baisse de l'expression de SNAIL n'a en revanche pas d'influence sur l'expression du récepteur à la laminine 67LR. Cela voudrait donc dire que SNAIL ne régule pas l'expression du récepteur à la laminine 67LR, mais celui-ci peut réguler l'expression de SNAIL. De plus, nos résultats démontrent que SNAIL permet la progression tumorale des cellules souches de GBM à travers plusieurs voies de signalisation. L'une d'entre elles est la voie anti-apoptotique. En effet, le knockdown de SNAIL a mené à une baisse de l'expression de BCL-XL et BCL-2, ce qui veut dire que SNAIL joue un rôle dans la survie cellulaire (Liang et al., 2019).

SNAIL semble aussi avoir un effet sur l'expression de PI3K/AKT. En effet, l'expression de PI3K est significativement réduite lorsqu'il y a le knockdown. En sachant que la voie PI3K/AKT peut réguler l'activité de SNAIL (Wang et al., 2020), il se pourrait que SNAIL puisse par la suite augmenter l'expression de PI3K et la phosphorylation d'AKT afin de permettre la progression tumorale. Cependant, la phosphorylation d'AKT et de GSK3 reste encore relativement élevée lors du knockdown. Il se pourrait que SNAIL n'a pas autant d'influence sur AKT que sur PI3K. Par conséquent, une forte phosphorylation d'AKT résulte à une forte phosphorylation de GSK (Song, 2020)

Contrairement à la littérature, le clivage de PARP ne semble pas augmenté lors du knockdown de SNAIL dans les sphéroïdes (Qi, et al., 2012). En effet, le clivage augmente seulement lorsque les cellules U87 sont cultivées en 3 dimensions. Il se pourrait qu'il y ait une résistance à l'apoptose à travers le clivage de PARP

lorsque les cellules obtiennent un phénotype de CSC (Shi et al., 2012). Alors, un knockdown de SNAIL n'est pas suffisant.

Les résultats démontrent aussi qu'il y a un lien entre l'expression de SNAIL et le niveau de phosphorylation de MSK1/2, CREB et RSK. En effet, les niveaux de phosphorylation baissent lorsqu'il y a le knockdown de SNAIL. Cela veut donc dire que la baisse de l'expression de SNAIL provoque le ralentissement de la progression tumorale (Wu & Zhou, 2010) des CSC de GBM car le niveau de phosphorylation des protéines qui sont habituellement impliquées dans ce processus a diminué.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La recherche présentée avait trois objectifs principaux : le premier était de déterminer s'il était possible d'utiliser l'EGCG en tant qu'agent pharmacologique afin de prévenir l'acquisition du phénotype souche des cellules de GBM. Pour ce faire, il a fallu examiner la capacité des cellules U87 de GBM à générer des sphéroïdes lorsque l'EGCG a été introduit au début de leur formation. Il a fallu par la suite examiner l'expression des marqueurs à CSC. Puisque l'EGCG peut agir en tant que ligand pour le récepteur à la laminine 67LR, nous avons fixé comme deuxième objectif de déterminer si le récepteur à la laminine 67LR était important pour la prévention de l'acquisition du phénotype souche à l'aide de l'EGCG. Pour ce faire, nous avons fait un knockdown du récepteur à la laminine à l'aide d'un siRNA pour RPSA, le gène codant pour le récepteur à la laminine 67LR. Il a fallu par la suite examiner la formation des sphéroïdes ainsi que l'expression des marqueurs à CSC. Le troisième objectif était de déterminer si la protéine snail jouait un rôle dans l'acquisition du phénotype souche de GBM, puisque nous avons découvert que son expression était aussi réduite lorsqu'il y a eu le knockdown du récepteur à la laminine 67LR. Pour ce faire, nous avons procédé aux mêmes étapes que le deuxième objectif, à l'exception de l'utilisation d'un siRNA pour le gène SNAIL. Nous avons aussi observé l'état des sphéroïdes. Ces dernières se formaient de manière dose-dépendante au bout de 72 heures de traitement. L'ajout de l'EGCG a permis de prévenir la formation optimale de sphéroïdes.

Les résultats ont démontré que l'acquisition d'un phénotype souche résultait à une hausse de l'expression des trois marqueurs de CSC CD133, SOX2 et NANOG. Les résultats démontrent que les CSC des GBM ont le potentiel d'effectuer la TÉM. En effet, il y a eu une hausse de l'expression des marqueurs de la TÉM SNAIL et FIBRONECTINE. De plus, l'acquisition du phénotype souche résulte à une hausse de l'augmentation de l'expression du récepteur à la laminine 67LR. Un traitement à l'EGCG a permis la baisse de l'expression de tous ces marqueurs. Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus à travers les tissus de glioblastome et de gliomes à bas grade. Dans ce cas-ci, les cellules de GBM avaient une plus forte expression de ces marqueurs que les cellules de gliomes à bas grade, et l'EGCG permettait la baisse de l'expression de ceux-ci.

L'acquisition du phénotype souche des GBM permet aussi la progression tumorale des CSC des GBM. En effet, il y a eu une augmentation de l'expression des protéines impliquées dans les voies anti-apoptotiques,

dans la prolifération cellulaire, la survie, la croissance et la différenciation cellulaire des CSC de GBM. Un traitement à l'EGCG a permis la baisse de l'expression de ces marqueurs.

Les résultats transcriptomiques nous ont permis de déterminer les voies de signalisation qui seraient importantes pour la progression tumorale des CSC de glioblastome. Les voies les plus importantes étaient la voie de signalisation de la TGF- $\beta$ , la T $\acute{E}$ M et la voie de signalisation des intégrines. Les résultats ont aussi démontré les voies de signalisation qui seraient impliqués lors de la prévention de l'acquisition du phénotype souche à travers l'EGCG. Les voies de signalisations les plus importantes sont la phosphorylation oxydative, la réponse à l'IFN- $\alpha$  ainsi que la sénescence cellulaire.

Par la suite, les résultats ont démontré que le récepteur à la laminine 67LR est nécessaire pour la formation des sphéroïdes et par conséquent, l'acquisition du phénotype souches des CSC de GBM. Elle serait aussi nécessaire pour la progression tumorale des CSC de glioblastomes. Cependant, elle n'est pas nécessaire pour la réduction de la taille des sphéroïdes lorsque celle-ci sont traitées à l'EGCG. Nous avons aussi constaté que le récepteur à la laminine 67LR serait important pour la T $\acute{E}$ M puisqu'une baisse de l'expression de celle-ci a mené à une baisse de l'expression de SNAIL.

Nous avons ensuite déterminé que la protéine SNAIL était importante pour l'acquisition du phénotype souche des CSC de GBM, car un knockdown du gène résultait à une inhibition de la formation des sphéroïdes. Tout comme le récepteur à la laminine 67LR, SNAIL jouerait un rôle dans l'expression des marqueurs à CSC, mais son implication dans les autres voies de signalisation qui permettent la progression tumorale n'est pas aussi importante que le récepteur à la laminine 67LR.

Il serait éventuellement intéressant de pouvoir déterminer la voie que l'EGCG utilise afin de remplir sa fonction puisque nous avons déterminé qu'elle n'interagit pas avec le récepteur à la laminine 67LR dans les cellules de GBM. Il serait aussi intéressant d'effectuer un knockout du gène codant pour le récepteur à la laminine afin de déterminer si cette action peut contribuer davantage à la prévention de l'acquisition du phénotype souche des GBM. Si c'est le cas, on pourrait envisager de trouver un moyen d'inhiber le plus que possible son expression afin d'empêcher la progression tumorale des CSC de glioblastomes. Il serait aussi possible d'étudier davantage le rôle de la signalisation entre l'intégrine  $\alpha$  et la TGF- $\beta$  puisque les résultats et la littérature démontrent qu'il y aurait un lien entre ces voies de signalisation afin de permettre la progression tumorale. Par la suite, il serait intéressant de déterminer si les CSC de GBM ont la capacité

de migrer puisque les résultats démontrent que la TÉM serait un processus qui est impliqué dans la progression tumorale de ces dernières.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adams, J. & Cory, S. (2007). Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current opinion in immunology*, 19 (5), s. 488–496.
- Agarwala, S. S., & Kirkwood, J. M. (2000). Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *The oncologist*, 5(2), 144-151.
- Ahn, H.-Y. et al. (1999). Epigallocatechin-3 Gallate Selectively Inhibits the PDGF-BB–induced Intracellular Signaling Transduction Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells and Inhibits Transformation of oes-transfected NIH 3T3 Fibroblasts and Human Glioblastoma Cells (A172). *Molecular biology of the cell*, 10 (4), s. 1093–1104.
- Almatroodi, S. A. et al. (2020). Potential Therapeutic Targets of Epigallocatechin Gallate (EGCG), the Most Abundant Catechin in Green Tea, and Its Role in the Therapy of Various Types of Cancer. *Molecules*, 25 (14), s. 3146.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3983-3988.
- Al-Saleh, W. A. L. I. D., Delvenne, P., Van Den Brule, F. A., Menard, S., Boniver, J., & Castronovo, V. (1997). Expression of the 67 KD laminin receptor in human cervical preneoplastic and neoplastic squamous epithelial lesions: an immunohistochemical study. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 181(3), 287-293.
- Anandh Babu, P. & Liu, D. (2008). Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update. *Current medicinal chemistry*, 15 (18), s. 1840–1850.
- Anjum, R., & Blenis, J. (2008). The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(10), 747-758.
- Ardini, E., Sporchia, B., Pollegioni, L., Modugno, M., Ghirelli, C., Castiglioni, F., ... & Ménard, S. (2002). Identification of a novel function for 67-kDa laminin receptor: increase in laminin degradation rate and release of motility fragments. *Cancer Research*, 62(5), 1321-1325.
- Arneth, B., 2019. Tumor Microenvironment. *Medicina* 56, 15.. doi:10.3390/medicina56010015
- Arthur, J. S. C. (2008). MSK activation and physiological roles. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 13(15), 5866-5879.
- Bacac, M., & Stamenkovic, I. (2008). Metastatic cancer cell. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 3, 221-247.
- Badur, M. G., Muthusamy, T., Parker, S. J., Ma, S., McBrayer, S. K., Cordes, T., ... & Metallo, C. M. (2018). Oncogenic R132 IDH1 mutations limit NADPH for de novo lipogenesis through (D) 2-hydroxyglutarate production in fibrosarcoma cells. *Cell reports*, 25(4), 1018-1026.

- Baer, J. C., Freeman, A. A., Newlands, E. S., Watson, A. J., Rafferty, J. A., & Margison, G. P. (1993). Depletion of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumour cells. *British journal of cancer*, 67(6), 1299-1302.
- Balentine, D. A., Wiseman, S. A., & Bouwens, L. C. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 37(8), 693-704.
- Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease*, 16(1), 1-13.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., ... & Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *nature*, 444(7120), 756-760.
- Bar, E. E., Lin, A., Mahairaki, V., Matsui, W. & Eberhart, C. G. (2010). Hypoxia Increases the Expression of Stem-Cell Markers and Promotes Clonogenicity in Glioblastoma Neurospheres. *The american journal of pathology*, 177 (3), s. 1491–1502.
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences*, 9(3), 193.
- Batista, R., Cruvinel-Carlioni, A., Vinagre, J., Peixoto, J., Catarino, T. A., Campanella, N. C., ... & Lima, J. (2016). The prognostic impact of TERT promoter mutations in glioblastomas is modified by the rs2853669 single nucleotide polymorphism. *International journal of cancer*, 139(2), 414-423.
- Battle, E., & Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nature medicine*, 23(10), 1124-1134.
- Begg, A. C., Stewart, F. A., & Vens, C. (2011). Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nature Reviews Cancer*, 11(4), 239-253.
- Beier, C. P. et al. (2012). The Cancer Stem Cell Subtype Determines Immune Infiltration of Glioblastoma. *Stem cells and development*, 21 (15), s. 2753–2761.
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., ... & Beier, C. P. (2007). CD133+ and CD133– glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer research*, 67(9), 4010-4015.
- Bettuzzi, S., Brausi, M., Rizzi, F., Castagnetti, G., Peracchia, G., & Corti, A. (2006). Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study. *Cancer research*, 66(2), 1234-1240.
- Bhat, K. P., Balasubramaniyan, V., Vaillant, B., Ezhilarasan, R., Hummelink, K., Hollingsworth, F., ... & Aldape, K. (2013). Mesenchymal differentiation mediated by NF-κB promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer cell*, 24(3), 331-346.
- Bi, C. L., Fang, J. S., Chen, F. H., Wang, Y. J., & Wu, J. (2007). Chemoresistance of CD133 (+) tumor stem cells from human brain glioma. *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Central South University. Medical Sciences*, 32(4), 568-573.



- Biasoli, D., Kahn, S. A., Cornélio, T. A., Furtado, M., Campanati, L., Chneiweiss, H., ... & Borges, H. L. (2013). Retinoblastoma protein regulates the crosstalk between autophagy and apoptosis, and favors glioblastoma resistance to etoposide. *Cell death & disease*, 4(8), e767-e767.
- Bode, A. M. & Dong, Z. (2013). Signal Transduction and Molecular Targets of Selected Flavonoids. *Antioxidants & redox signaling*, 19 (2), s. 163–180. doi:10.1089/ars.2013.5251
- Boutet, A., De Frutos, C. A., Maxwell, P. H., Mayol, M. J., Romero, J., & Nieto, M. A. (2006). Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *The EMBO journal*, 25(23), 5603-5613.
- Bozulic, L., & Hemmings, B. A. (2009). PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Current opinion in cell biology*, 21(2), 256-261.
- Brandner, S. et al. (2022). Diagnostic accuracy of 1p/19q codeletion tests in oligodendroglioma: A comprehensive meta-analysis based on a Cochrane systematic review. *Neuropathology and applied neurobiology*, 48 (4). doi:10.1111/nan.12790
- Brat, D. J., Castellano-Sanchez, A. A., Hunter, S. B., Pecot, M., Cohen, C., Hammond, E. H., ... & Van Meir, E. G. (2004). Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer research*, 64(3), 920-927.
- Brenner, D. R., Poirier, A., Woods, R. R., Ellison, L. F., Billette, J. M., Demers, A. A., ... & Holmes, E. (2022). Projection du fardeau du cancer au Canada en 2022. *CMAJ*, 194(23), E819-E826
- Brescia, P. et al. (2013). CD133 Is Essential for Glioblastoma Stem Cell Maintenance. *Stem cells*, 31 (5), s. 857–869.
- Brescia, P., Richichi, C., & Pelicci, G. (2012). Current strategies for identification of glioma stem cells: adequate or unsatisfactory?. *Journal of oncology*, 2012.
- Brindle, P., Linke, S., & Montminy, M. (1993). Protein-kinase-A-dependent activator in transcription factor CREB reveals new role for CREM repressors. *Nature*, 364(6440), 821-824.
- Brown, D. V. et al. (2017). Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intra-tumor heterogeneity. *PLOS ONE*, 12 (2), s. e0172791. doi:10.1371/journal.pone.0172791
- Budach, W., Gioioso, D., Taghian, A., Stuschke, M., & Suit, H. D. (1997). Repopulation capacity during fractionated irradiation of squamous cell carcinomas and glioblastomas in vitro. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 39(3), 743-750.
- Burch, P. R. (2012). *The biology of cancer: A new approach*. Springer Science & Business Media.
- Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J., & Swanton, C. (2013). The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*, 501(7467), 338-345.

- Caenepeel, S., Charydczak, G., Sudarsanam, S., Hunter, T., & Manning, G. (2004). The mouse kinome: discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proceedings of the national academy of sciences*, *101*(32), 11707-11712.
- Cai, S., Bi, Z., Bai, Y., Zhang, H., Zhai, D., Xiao, C., ... & Yang, C. (2020). Glycyrrhizic acid-induced differentiation repressed stemness in hepatocellular carcinoma by targeting c-Jun N-terminal kinase 1. *Frontiers in oncology*, *9*, 1431.
- Campbell KJ, Tait SWG. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol.* 2018 May;*8*(5):180002. doi: 10.1098/rsob.180002. PMID: 29769323; PMCID: PMC5990650.
- Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., ... & Thomas, J. E. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, *448*(7152), 439-444.
- Certo, M., Moore, V. D. G., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A., & Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer cell*, *9*(5), 351-365.
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2015). How does multistep tumorigenesis really proceed?. *Cancer discovery*, *5*(1), 22-24.
- Chakrabarti, I., Cockburn, M., Cozen, W., Wang, Y. P., & Preston-Martin, S. (2005). A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974–1999. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, *104*(12), 2798-2806.
- Chakravarti, A., Zhai, G., Suzuki, Y., Sarkesh, S., Black, P. M., Muzikansky, A., & Loeffler, J. S. (2004). The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *Journal of Clinical Oncology*, *22*(10), 1926-1933.
- Chamberlain, M. C., & Tsao-Wei, D. D. (2004). Salvage chemotherapy with cyclophosphamide for recurrent, temozolomide-refractory glioblastoma multiforme. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, *100*(6), 1213-1220.
- Chamberlain, M. C., Tsao-Wei, D. D., & Groshen, S. (2006). Salvage chemotherapy with cyclophosphamide for recurrent temozolomide-refractory anaplastic astrocytoma. *Cancer*, *106*(1), 172-179.
- Chen, F. X., Qian, Y. R., Duan, Y. H., Ren, W. W., Yang, Y., Zhang, C. C., ... & Ji, Y. H. (2009). Down-regulation of 67LR reduces the migratory activity of human glioma cells in vitro. *Brain research bulletin*, *79*(6), 402-408.
- Chen, H. et al. (2015). Computational and Biochemical Discovery of RSK2 as a Novel Target for Epigallocatechin Gallate (EGCG). *PLOS ONE*, *10* (6), s. e0130049.
- Chen, M. S., Chen, D. I., & Dou, Q. P. (2004). Inhibition of proteasome activity by various fruits and vegetables is associated with cancer cell death. *In vivo*, *18*(1), 73-80.
- Chen, S., Lewallen, M., & Xie, T. (2013). Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development*, *140*(2), 255-265.

- Cheng, C. J., Fujimura, S., Grunberger, D., & Weinstein, I. B. (1972). Interaction of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (NSC 79037) with nucleic acids and proteins in vivo and in vitro. *Cancer research*, 32(1), 22-27.
- Cheng, L. et al. (2011). Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 406 (4), s. 643–648.
- Cheng, W. Y., Kandel, J. J., Yamashiro, D. J., Canoll, P., & Anastassiou, D. (2012). A multi-cancer mesenchymal transition gene expression signature is associated with prolonged time to recurrence in glioblastoma. *PLoS one*, 7(4), e34705.
- Chow, L. M., Endersby, R., Zhu, X., Rankin, S., Qu, C., Zhang, J., ... & Baker, S. J. (2011). Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb pathways induces high-grade astrocytoma in adult brain. *Cancer cell*, 19(3), 305-316.
- Chung, J. Y., Park, J. O., Phyu, H., Dong, Z. & Yang, C. S. (2001). Mechanisms of inhibition of the Ras-MAP kinase signaling pathway in 30.7b Ras 12 cells by tea polyphenols (-)-epigallocatechin-3-gallate and theaflavin-3,3'-digallate 1. *The FASEB journal*, 15 (11), s. 2022–2024.
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., ... & Wahl, G. M. (2006). Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research*, 66(19), 9339-9344.
- Cleaver, O., & Melton, D. A. (2003). Endothelial signaling during development. *Nature medicine*, 9(6), 661-668.
- Clynes, D., Higgs, D. R., & Gibbons, R. J. (2013). The chromatin remodeller ATRX: a repeat offender in human disease. *Trends in biochemical sciences*, 38(9), 461-466.
- Conley, B. J., Denham, M., Gulluyan, L., Olsson, F., Cole, T. J., & Mollard, R. (2005). Mouse embryonic stem cell derivation, and mouse and human embryonic stem cell culture and differentiation as embryoid bodies. *Current Protocols in Cell Biology*, 28(1), 23-2.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378(6559), 785-789.
- Cruceru, M. L., Neagu, M., Demoulin, J. B., & Constantinescu, S. N. (2013). Therapy targets in glioblastoma and cancer stem cells: lessons from haematopoietic neoplasms. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(10), 1218-1235.
- Cullen, J. M., & Breen, M. (2016). An overview of molecular cancer pathogenesis, prognosis, and diagnosis. *Tumors in domestic animals*, 1-26.
- Daniel, P. M. et al. (2018). Intratumor MAPK and PI3K signaling pathway heterogeneity in glioblastoma tissue correlates with CREB signaling and distinct target gene signatures. *Experimental and molecular pathology*, 105 (1), s. 23–31.
- Dantzer, F., de la Rubia, G., Ménissier-de Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G., & Schreiber, V. (2000). Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly (ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry*, 39(25), 7559-7569.

- Davis, F. G., Freels, S., Grutsch, J., Barlas, S., & Brem, S. (1998). Survival rates in patients with primary malignant brain tumors stratified by patient age and tumor histological type: an analysis based on Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) data, 1973–1991. *Journal of neurosurgery*, 88(1), 1-10.
- De Manzoni, G., Guglielmi, A., Verlati, G., Tomezzoli, A., Pelosi, G., Schiavon, I., & Cordiano, C. (1998). Prognostic significance of 67-kDa laminin receptor expression in advanced gastric cancer. *Oncology*, 55(5), 456-460.
- Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, J. M., & Alessi, D. R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *The EMBO journal*, 17(15), 4426-4441.
- Denardo, D. G., Johansson, M., & Coussens, L. M. (2008). Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer and metastasis reviews*, 27 (1), s. 11–18.
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., & Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & development*, 12(22), 3499-3511.
- DiNitto, J. P., & Lambright, D. G. (2006). Membrane and juxtamembrane targeting by PH and PTB domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(8), 850-867.
- Duda, P., Akula, S. M., Abrams, S. L., Steelman, L. S., Martelli, A. M., Cocco, L., ... & McCubrey, J. A. (2020). Targeting GSK3 and associated signaling pathways involved in cancer. *Cells*, 9(5), 1110.
- Duffy, M. J., McGowan, P. M., & Gallagher, W. M. (2008). Cancer invasion and metastasis: changing views. *The Journal of pathology*, 214(3), 283-293.
- Dufresne, C. J., & Farnworth, E. R. (2001). A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *The Journal of nutritional biochemistry*, 12(7), 404-421.
- Dunn, G. P. et al. (2012). Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes & development*, 26 (8), s. 756–784.
- Duriez, P., & Shah, G. M. (1997). Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochemistry and Cell Biology*, 75(4), 337-349.
- Eckel-Passow, J. E., Lachance, D. H., Molinaro, A. M., Walsh, K. M., Decker, P. A., Sicotte, H., ... & Jenkins, R. B. (2015). Glioma groups based on 1p/19q, IDH, and TERT promoter mutations in tumors. *New England Journal of Medicine*, 372(26), 2499-2508.
- Einstein, A. J., Moser, K. W., Thompson, R. C., Cerqueira, M. D., & Henzlova, M. J. (2007). Radiation dose to patients from cardiac diagnostic imaging. *Circulation*, 116(11), 1290-1305.
- Eldar-Finkelman, H., Seger, R., Vandenheede, J. R., & Krebs, E. G. (1995). Inactivation of Glycogen Synthase Kinase-3 by Epidermal Growth Factor Is Mediated by Mitogen-activated Protein Kinase/p90 Ribosomal Protein S6 Kinase Signaling Pathway in NIH/3T3 Cells (\*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(3), 987-990.

- Enslin, H., Tokumitsu, H., & Soderling, T. R. (1995). Phosphorylation of CREB by CaM-kinase IV activated by CaM-kinase IV kinase. *Biochemical and biophysical research communications*, 207(3), 1038-1043.
- Evan, G. I., & Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *nature*, 411(6835), 342-348.
- F Quail, D., J Taylor, M., & Postovit, L. M. (2012). Microenvironmental regulation of cancer stem cell phenotypes. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 7(3), 197-216.
- Fakhri, S., Moradi, S. Z., Ash-Rafzadeh, A., & Bishayee, A. (2021). Targeting cellular senescence in cancer by plant secondary metabolites: A systematic review. *Pharmacological research*, 105961.
- Fan, X. et al. (2010). NOTCH Pathway Blockade Depletes CD133-Positive Glioblastoma Cells and Inhibits Growth of Tumor Neurospheres and Xenografts. *Stem cells*, 28 (1), s. 5–16. doi:10.1002/stem.254
- Fiebig, A. A., Zhu, W., Hollerbach, C., Leber, B. & Andrews, D. W. (2006). Bcl-XL is qualitatively different from and ten times more effective than Bcl-2 when expressed in a breast cancer cell line. *BMC cancer*, 6 (1).
- Fontanini, G., Vignati, S., Chiné, S., Lucchi, M., Mussi, A., Angeletti, C. A., ... & Bevilacqua, G. (1997). 67-Kilodalton laminin receptor expression correlates with worse prognostic indicators in non-small cell lung carcinomas. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 3(2), 227-231.
- Ford, C. L., Randal-Whitis, L., & Ellis, S. R. (1999). Yeast proteins related to the p40/laminin receptor precursor are required for 20S ribosomal RNA processing and the maturation of 40S ribosomal subunits. *Cancer research*, 59(3), 704-710.
- Formisano, P. et al. (2012). PED/PEA-15 interacts with the 67 kD laminin receptor and regulates cell adhesion, migration, proliferation and apoptosis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 16 (7), s. 1435–1446.
- Fox, B. D., Cheung, V. J., Patel, A. J., Suki, D., & Rao, G. (2011). Epidemiology of metastatic brain tumors. *Neurosurgery Clinics*, 22(1), 1-6.
- Frame, S., Cohen, P., & Biondi, R. M. (2001). A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Molecular cell*, 7(6), 1321-1327.
- Fu, J. D., Yao, J. J., Wang, H., Cui, W. G., Leng, J., Ding, L. Y., & Fan, K. Y. (2019). Effects of EGCG on proliferation and apoptosis of gastric cancer SGC7901 cells via down-regulation of HIF-1 $\alpha$  and VEGF under a hypoxic state. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*, 23, 155-161.
- Fujita, N., Sato, S., & Tsuruo, T. (2003). Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 49254-49260.
- Fulci, G., Ishii, N., Van Meir, E.G., 1998. p53 and Brain Tumors: From Gene Mutations to Gene Therapy. *Brain Pathology* 8, 599–613.

- G Linkous, A., & M Yazlovitskaya, E. (2011). Angiogenesis in glioblastoma multiforme: navigating the maze. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 11(8), 712-718.
- Galdieri, L., Jash, A., Malkova, O., Mao, D. D., DeSouza, P., Chu, Y. E., ... & Chheda, M. G. (2021). Defining phenotypic and functional heterogeneity of glioblastoma stem cells by mass cytometry. *JCI insight*, 6(4).
- Gangemi, R. M. R., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M. C., Malatesta, P., ... & Corte, G. (2009). SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem cells*, 27(1), 40-48.
- Gao, X., McDonald, J. T., Naidu, M., Hahnfeldt, P., & Hlatky, L. (2014). A proposed quantitative index for assessing the potential contribution of reprogramming to cancer stem cell kinetics. *Stem cells international*, 2014.
- Garros-Regulez, L., Garcia, I., Carrasco-Garcia, E., Lantero, A., Aldaz, P., Moreno-Cugnon, L., ... & Matheu, A. (2016). Targeting SOX2 as a therapeutic strategy in glioblastoma. *Frontiers in oncology*, 6, 222.
- Gil, J., & Esteban, M. (2000). Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*, 5(2), 107-114.
- Gilbert, C. A., & Ross, A. H. (2009). Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies. *Journal of cellular biochemistry*, 108(5), 1031-1038.
- Gimple, R. C., Bhargava, S., Dixit, D., & Rich, J. N. (2019). Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes & development*, 33(11-12), 591-609.
- Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306-313.
- Greenberg, M. E., Greene, L. A., & Ziff, E. B. (1985). Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 260(26), 14101-14110.
- Griffin, C. A., Burger, P., Morsberger, L., Yonescu, R., Swierczynski, S., Weingart, J. D., & Murphy, K. M. (2006). Identification of der (1; 19)(q10; p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 65(10), 988-994.
- Gubina, E., Luo, X., Kwon, E., Sakamoto, K., Shi, Y. F., & Mufson, R. A. (2001).  $\beta$ c cytokine receptor-induced stimulation of cAMP response element binding protein phosphorylation requires protein kinase C in myeloid cells: a novel cytokine signal transduction cascade. *The Journal of Immunology*, 167(8), 4303-4310.
- Guo, L., Sun, C., Xu, S., Xu, Y., Dong, Q., Zhang, L., ... & Guo, F. (2019). Knockdown of long non-coding RNA linc-ITGB1 inhibits cancer stemness and epithelial-mesenchymal transition by reducing the expression of Snail in non-small cell lung cancer. *Thoracic cancer*, 10(2), 128-136.

- Gupta, S., Hastak, K., Afaq, F., Ahmad, N., & Mukhtar, H. (2004). Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappaB and induction of apoptosis. *Oncogene*, *23*(14), 2507-2522.
- Gutman, S. I., Piper, M., Grant, M. D., Basch, E., Olinisky, D. M., & Aronson, N. (2013). Progression-free survival: what does it mean for psychological well-being or quality of life?.
- Haase, S. et al. (2018). Mutant ATRX: uncovering a new therapeutic target for glioma. *Expert opinion on therapeutic targets*, *22* (7), s. 599–613.
- Han, S., Liu, Y., Cai, S. J., Qian, M., Ding, J., Larion, M., ... & Yang, C. (2020). IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *British journal of cancer*, *122*(11), 1580-1589.
- He, W., Li, X., Morsch, M., Ismail, M., Liu, Y., Rehman, F. U., ... & Shi, B. (2022). Brain-targeted codelivery of Bcl-2/Bcl-xl and Mcl-1 inhibitors by biomimetic nanoparticles for orthotopic glioblastoma therapy. *ACS nano*, *16*(4), 6293-6308.
- Heddleston, J. M., Li, Z., Lathia, J. D., Bao, S., Hjelmeland, A. B., & Rich, J. N. (2010). Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *British journal of cancer*, *102*(5), 789-795.
- Heddleston, J. M., Li, Z., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., & Rich, J. N. (2009). The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell cycle*, *8*(20), 3274-3284.
- Hendricks, B. K., Cohen-Gadol, A. A., & Miller, J. C. (2015). Novel delivery methods bypassing the blood-brain and blood-tumor barriers. *Neurosurgical focus*, *38*(3), E10.
- Herceg, Z., & Wang, Z. Q. (2001). Functions of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *477*(1-2), 97-110.
- Herrlinger, U., Tzaridis, T., Mack, F., Steinbach, J. P., Schlegel, U., Sabel, M., ... & Society, C. (2019). Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The lancet*, *393*(10172), 678-688.
- Higdon, J. V., & Frei, B. (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions.
- Hingorani, M., Colley, W. P., Dixit, S., & Beavis, A. M. (2012). Hypofractionated radiotherapy for glioblastoma: strategy for poor-risk patients or hope for the future?. *The British journal of radiology*, *85*(1017), e770-e781.
- Houles, T., & Roux, P. P. (2018, February). Defining the role of the RSK isoforms in cancer. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 48, pp. 53-61). Academic Press.
- Hsieh, A., Ellsworth, R., & Hsieh, D. (2011). Hedgehog/GLI1 regulates IGF dependent malignant behaviors in glioma stem cells. *Journal of cellular physiology*, *226*(4), 1118-1127.

- Huang, Y.-J., Wang, K.-L., Chen, H.-Y., Chiang, Y.-F. & Hsia, S.-M. (2020). Protective Effects of Epigallocatechin Gallate (EGCG) on Endometrial, Breast, and Ovarian Cancers. *Biomolecules*, *10* (11), s. 1481.
- Huang, Z., Cheng, L., Guryanova, O. A., Wu, Q., & Bao, S. (2010). Cancer stem cells in glioblastoma—molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein & cell*, *1*(7), 638-655.
- Hynes, R. O. (1973). Alteration of cell-surface proteins by viral transformation and by proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *70*(11), 3170-3174.
- Ishiguro, T. et al. (2017). Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer science*, *108* (3), s. 283–289.
- Iwadate, Y. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncology letters*, *11* (3), s. 1615–1620.
- Jagus, R., Joshi, B., & Barber, G. N. (1999). PKR, apoptosis and cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *31*(1), 123-138.
- Jastaniyah, N., Murtha, A., Pervez, N., Le, D., Roa, W., Patel, S., ... & Abdulkarim, B. (2013). Phase I study of hypofractionated intensity modulated radiation therapy with concurrent and adjuvant temozolomide in patients with glioblastoma multiforme. *Radiation oncology*, *8*(1), 1-9.
- Jenkins, R. B., Blair, H., Ballman, K. V., Giannini, C., Arusell, R. M., Law, M., ... & Buckner, J. C. (2006). A t (1; 19)(q10; p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer research*, *66*(20), 9852-9861.
- Jessen, K. R. (2004). Glial cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *36*(10), 1861-1867
- Jiang, P., Chen, A., Wu, X., Zhou, M., ul Haq, I., Mariyam, Z., & Feng, Q. (2018). NEAT1 acts as an inducer of cancer stem cell-like phenotypes in NSCLC by inhibiting EGCG-upregulated CTR1. *Journal of cellular physiology*, *233*(6), 4852-4863.
- Jovanovic, K., Chetty, C. J., Khumalo, T., Da Costa Dias, B., Ferreira, E., Malindisa, S. T., ... & Weiss, S. F. (2015). Novel patented therapeutic approaches targeting the 37/67 kDa laminin receptor for treatment of cancer and Alzheimer's disease. *Expert opinion on therapeutic patents*, *25*(5), 567-582.
- Ju, F., Atyah, M. M., Horstmann, N., Gul, S., Vago, R., Bruns, C. J., ... & Ren, N. (2022). Characteristics of the cancer stem cell niche and therapeutic strategies. *Stem Cell Research & Therapy*, *13*(1), 1-17.
- Kahlert, U. D., Nikkhah, G., & Maciaczyk, J. (2013). Epithelial-to-mesenchymal (-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. *Cancer letters*, *331*(2), 131-138.
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, *119*(6), 1420-1428.
- Kang, S., Elf, S., Lythgoe, K., Hitosugi, T., Taunton, J., Zhou, W., ... & Chen, J. (2010). p90 ribosomal S6 kinase 2 promotes invasion and metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma cells. *The Journal of clinical investigation*, *120*(4), 1165-1177.
- Karsten, U. & Goletz, S. (2013). What makes cancer stem cell markers different?. *Springerplus*, *2* (1), s. 301.



- Khan, N., & Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life sciences*, *81*(7), 519-533.
- Khan, N., Afaq, F., Saleem, M., Ahmad, N., & Mukhtar, H. (2006). Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer research*, *66*(5), 2500-2505.
- Khodamoradi, F., Ghoncheh, M., Pakzad, R., Gandomani, H. S., & Salehiniya, H. (2017). The incidence and mortality of brain and central nervous system cancer and their relationship with human development index in the world. *World Cancer Res J*, *4*, e985.
- Kinoshita, K., Kaneda, Y., Sato, M., Saeki, Y., Wataya-Kaneda, M., Hoffmann, A., & Kaneda, Y. (1998). LBP-p40 binds DNA tightly through associations with histones H2A, H2B, and H4. *Biochemical and biophysical research communications*, *253*(2), 277-282.
- Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Cavenee WK. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. IARC Press, Lyon 2000
- Kochi, N., Tani, E., Morimura, T., & Itagaki, T. (1983). Immunohistochemical study of fibronectin in human glioma and meningioma. *Acta neuropathologica*, *59*(2), 119-126.
- Koh, H. J., Lee, S. M., Son, B. G., Lee, S. H., Ryoo, Z. Y., Chang, K. T., ... & Huh, T. L. (2004). Cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(38), 39968-39974.
- Kreso, A., & Dick, J. E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell stem cell*, *14*(3), 275-291.
- Kreso, A., O'Brien, C. A., Van Galen, P., Gan, O. I., Notta, F., Brown, A. M., ... & Dick, J. E. (2013). Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science*, *339*(6119), 543-548.
- Kuriyama, S., Shimazu, T., Ohmori, K., Kikuchi, N., Nakaya, N., Nishino, Y., ... & Tsuji, I. (2006). Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: the Ohsaki study. *Jama*, *296*(10), 1255-1265.
- Kurrey, N. K. et al. (2009). Snail and Slug Mediate Radioresistance and Chemoresistance by Antagonizing p53-Mediated Apoptosis and Acquiring a Stem-Like Phenotype in Ovarian Cancer Cells. *Stem cells*, *27* (9), s. 2059–2068.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular cell*, *17*(4), 525-535.
- Lacroix, M., Abi-Said, D., Fournay, D. R., Gokaslan, Z. L., Shi, W., DeMonte, F., ... & Sawaya, R. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of neurosurgery*, *95*(2), 190-198.
- Landowski, T. H., Dratz, E. A., & Starkey, J. R. (1995). Studies of the structure of the metastasis-associated 67 kDa laminin binding protein: fatty acid acylation and evidence supporting dimerization of the 32 kDa gene product to form the mature protein. *Biochemistry*, *34*(35), 11276-11287.

- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., ... & Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, *367*(6464), 645-648.
- Lapointe, S., Perry, A., & Butowski, N. A. (2018). Primary brain tumours in adults. *The Lancet*, *392*(10145), 432-446.
- Lathia, J. D. et al. (2010). Integrin Alpha 6 Regulates Glioblastoma Stem Cells. *Cell stem cell*, *6* (5), s. 421–432.
- Lathia, J. D., Gallagher, J., Heddleston, J. M., Wang, J., Eyler, C. E., MacSwords, J., ... & Rich, J. N. (2010). Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell stem cell*, *6*(5), 421-432.
- Lathia, J. D., Venere, M., Rao, M. S., & Rich, J. N. (2011). Seeing is believing: are cancer stem cells the Loch Ness monster of tumor biology?. *Stem cell reviews and reports*, *7*(2), 227-237.
- Lee, Christoph I. and others (eds),
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., ... & Fine, H. A. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer cell*, *9*(5), 391-403.
- Lee, M. J., Maliakal, P., Chen, L., Meng, X., Bondoc, F. Y., Prabhu, S., ... & Yang, C. S. (2002). Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *11*(10), 1025-1032.
- Lee, S. H., Jo, S. H., Lee, S. M., Koh, H. J., Song, H., Park, J. W., ... & Huh, T. L. (2004). Role of NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP<sup>+</sup>-ICDH) on cellular defence against oxidative injury by  $\gamma$ -rays. *International journal of radiation biology*, *80*(9), 635-642.
- Lee, S. Y. (2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & diseases*, *3*(3), 198-210.
- Lee, W. J., Shim, J. Y., & Zhu, B. T. (2005). Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Molecular pharmacology*, *68*(4), 1018-1030.
- Leroy, B., Fournier, J. L., Ishioka, C., Monti, P., Inga, A., Fronza, G., & Soussi, T. (2013). The TP53 website: an integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis. *Nucleic acids research*, *41*(D1), D962-D969.
- Lesueur, P., Chevalier, F., El-Habr, E. A., Junier, M. P., Chneiweiss, H., Castéra, L., ... & Saintigny, Y. (2018). Radiosensitization effect of talazoparib, a parp inhibitor, on glioblastoma stem cells exposed to low and high linear energy transfer radiation. *Scientific reports*, *8*(1), 1-12.
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., & Korsmeyer, S. J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer cell*, *2*(3), 183-192.

- Li, H., Li, Z., Xu, Y. M., Wu, Y., Yu, K. K., Zhang, C., ... & Chen, F. X. (2014). Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis, inhibits proliferation and decreases invasion of glioma cell. *Neuroscience bulletin*, *30*(1), 67-73.
- Li, J., Liu, X., Wang, W., Li, C., & Li, X. (2020). MSK1 promotes cell proliferation and metastasis in uveal melanoma by phosphorylating CREB. *Archives of Medical Science*, *16*(5), 1176-1188.
- Li, Y., Li, D., Chen, J., & Wang, S. (2016). A polysaccharide from *Pinellia ternata* inhibits cell proliferation and metastasis in human cholangiocarcinoma cells by targeting of Cdc42 and 67 kDa Laminin Receptor (LR). *International journal of biological macromolecules*, *93*, 520-525.
- Liang, H., Chen, G., Li, J., & Yang, F. (2019). Snail expression contributes to temozolomide resistance in glioblastoma. *American Journal of Translational Research*, *11*(7), 4277.
- Lin, C. H., Shen, Y. A., Hung, P. H., Yu, Y. B., & Chen, Y. J. (2012). Epigallocatechin gallate, polyphenol present in green tea, inhibits stem-like characteristics and epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *12*(1), 1-12.
- Lin, L.-C., Wang, M.-N., Tseng, T.-Y., Sung & Tsai, T.-H. (2007). Pharmacokinetics of (-)-Epigallocatechin-3-gallate in Conscious and Freely Moving Rats and Its Brain Regional Distribution. *Journal of agricultural and food chemistry*, *55* (4), s. 1517–1524.
- Lin, T. C., Yang, C. H., Cheng, L. H., Chang, W. T., Lin, Y. R., & Cheng, H. C. (2019). Fibronectin in cancer: friend or foe. *Cells*, *9*(1), 27
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, *64*, 4-17.
- Liu, C. et al. (2019). Advances in the Antagonism of Epigallocatechin-3-gallate in the Treatment of Digestive Tract Tumors. *Molecules*, *24* (9), s. 1726.
- Liu, C., Sage, J. C., Miller, M. R., Verhaak, R. G., Hippenmeyer, S., Vogel, H., ... & Zong, H. (2011). Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell*, *146*(2), 209-221.
- Liu, G. et al. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular cancer*, *5* (1), s. 67.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I. R., ... & Yu, J. S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular cancer*, *5*(1), 1-12.
- Liu, Y. et al. (2016). High PARP-1 expression is associated with tumor invasion and poor prognosis in gastric cancer. *Oncology letters*, *12* (5), s. 3825–3835.
- Liu, Y., Guo, Q., Zhang, H., Li, G. H., Feng, S., Yu, X. Z., ... & Jin, F. (2015). Effect of siRNA-Livin on drug resistance to chemotherapy in glioma U251 cells and CD133+ stem cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *10*(4), 1317-1323.

- López-Vicente, L., Pons, B., Coch, L., Teixidó, C., Hernández-Losa, J., Armengol, G., & Ramon y Cajal, S. (2011). RSK4 inhibition results in bypass of stress-induced and oncogene-induced senescence. *Carcinogenesis*, 32(4), 470-476.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., ... & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6), 803-820.
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., ... & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro-oncology*, 23(8), 1231-1251.
- Louis, D. N., Pomeroy, S. L., & Cairncross, J. G. (2002). Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer cell*, 1(2), 125-128.
- Low, K. C., & Tergaonkar, V. (2013). Telomerase: central regulator of all of the hallmarks of cancer. *Trends in biochemical sciences*, 38(9), 426-434.
- Lu, C. L., Xu, J., Yao, H. J., Luo, K. L., Li, J. M., Wu, T., & Wu, G. Z. (2016). Inhibition of human 67-kDa laminin receptor sensitizes multidrug resistance colon cancer cell line SW480 for apoptosis induction. *Tumor Biology*, 37(1), 1319-1325
- Lucas, J. T., Huang, A. J., Mott, R. T., Lesser, G. J., Tatter, S. B., & Chan, M. D. (2015). Anaplastic ganglioglioma: a report of three cases and review of the literature. *Journal of neuro-oncology*, 123(1), 171-177.
- Lundholm, L., Hååg, P., Zong, D., Juntti, T., Mörk, B., Lewensohn, R., & Viktorsson, K. (2013). Resistance to DNA-damaging treatment in non-small cell lung cancer tumor-initiating cells involves reduced DNA-PK/ATM activation and diminished cell cycle arrest. *Cell death & disease*, 4(1), e478-e478.
- Mahabir, R., Tanino, M., Elmansuri, A., Wang, L., Kimura, T., Itoh, T., ... & Tanaka, S. (2014). Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma. *Neuro-oncology*, 16(5), 671-685.
- Maile, E. J., Barnes, I., Finlayson, A. E., Sayeed, S., & Ali, R. (2016). Nervous system and intracranial tumour incidence by ethnicity in England, 2001–2007: a descriptive epidemiological study. *PLoS One*, 11(5), e0154347.
- Mani, S. A. et al. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, 133 (4), s. 704–715.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., ... & Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704-715.
- Maraka, S., & Janku, F. (2018). BRAF alterations in primary brain tumors. *Discovery medicine*, 26(141), 51-60.
- Masson, N., & Ratcliffe, P. J. (2014). Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer & metabolism*, 2(1), 1-17.

- Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., von Kriegsheim, A., & Kolch, W. (2011). Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes & cancer*, 2(3), 232-260.
- Mattiuzzi, C., & Lippi, G. (2019). Current cancer epidemiology. *Journal of epidemiology and global health*, 9(4), 217.
- Mayr, B. M., Canettieri, G., & Montminy, M. R. (2001). Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19), 10936-10941.
- Mayr, B., & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(8), 599-609.
- McCoy, C. E., Campbell, D. G., Deak, M., Bloomberg, G. B., & Arthur, J. S. C. (2005). MSK1 activity is controlled by multiple phosphorylation sites. *Biochemical Journal*, 387(2), 507-517.
- Mccoy, M. G. et al. (2019). Endothelial cells promote 3D invasion of GBM by IL-8-dependent induction of cancer stem cell properties. *Scientific reports*, 9 (1). doi:10.1038/s41598-019-45535-y
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Montalto, G., Cervello, M., ... & Martelli, A. M. (2012). Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget*, 3(9), 954.
- McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2002). The role of tea in human health: an update. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(1), 1-13.
- Ménard, S., Tagliabue, E. & Colnaghi, M. I. (1998). The 67 kDa laminin receptor as a prognostic factor in human cancer. *Breast cancer research and treatment*, 52 (1-3), s. 137–145.
- Mereles, D., & Hunstein, W. (2011). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for clinical trials: more pitfalls than promises?. *International journal of molecular sciences*, 12(9), 5592-5603.
- Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J., & Maley, C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature reviews cancer*, 6(12), 924-935.
- Michelakis, E. D., Sutendra, G., Dromparis, P., Webster, L., Haromy, A., Niven, E., ... & Petruk, K. C. (2010). Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Science translational medicine*, 2(31), 31ra34-31ra34.
- Miller, D. S., Bauer, B., & Hartz, A. M. (2008). Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*, 60(2), 196-209.
- Mizoguchi, M. et al. (2012). Molecular characteristics of glioblastoma with 1p/19q co-deletion. *Brain tumor pathology*, 29 (3), s. 148–153.
- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., & Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell stem cell*, 7(2), 150-161.

- Molina, J. R., Hayashi, Y., Stephens, C., & Georgescu, M. M. (2010). Invasive glioblastoma cells acquire stemness and increased Akt activation. *Neoplasia*, *12*(6), 453-IN5.
- Montuori, N., & Sobel, M. E. (1996). The 67-kDa laminin receptor and tumor progression. *Attempts to Understand Metastasis Formation I*, 205-214.
- Montuori, N., Selleri, C., Risitano, A. M., Raiola, A. M., Ragno, P., Vecchio, L. D., ... & Rossi, G. (1999). Expression of the 67-kDa laminin receptor in acute myeloid leukemia cells mediates adhesion to laminin and is frequently associated with monocytic differentiation. *Clinical cancer research*, *5*(6), 1465-1472.
- Moodley, K., & Weiss, S. F. (2013). Downregulation of the non-integrin laminin receptor reduces cellular viability by inducing apoptosis in lung and cervical cancer cells. *PLoS one*, *8*(3), e57409.
- Moore, V. D. G., Brown, J. R., Certo, M., Love, T. M., Novina, C. D., & Letai, A. (2007). Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *The Journal of clinical investigation*, *117*(1), 112-121.
- Morris, C. S., & Esiri, M. M. (1991). Immunocytochemical study of macrophages and microglial cells and extracellular matrix components in human CNS disease: 1. Gliomas. *Journal of the neurological sciences*, *101*(1), 47-58.
- Moulishankar, A., & Lakshmanan, K. (2020). Data on molecular docking of naturally occurring flavonoids with biologically important targets. *Data in brief*, *29*, 105243.
- Muller, P., Vousden, K. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* **15**, 2–8 (2013). <https://doi.org/10.1038/ncb2641>
- 'Multiple Circumscribed Masses', in Christoph I. Lee, Constance D. Lehman, and Lawrence W. Bassett (eds), *Breast Imaging, Rotations in Radiology* (New York, 2018; online edn, Oxford Academic, 1 Mar. 2018)
- Nadji, M., Nassiri, M., Fresno, M., Terzian, E., & Morales, A. R. (1999). Laminin receptor in lymph node negative breast carcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, *85*(2), 432-436.
- Nakada, M., Furuta, T., Hayashi, Y., Minamoto, T., & Hamada, J. I. (2012). The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma. *Frontiers in oncology*, *2*, 98.
- Negri, A., Naponelli, V., Rizzi, F., & Bettuzzi, S. (2018). Molecular targets of epigallocatechin—Gallate (EGCG): A special focus on signal transduction and cancer. *Nutrients*, *10*(12), 1936.
- Ning, W., Qiu, Z., Ji, X., Wang, X., An, Y., Wang, S., & Zhang, H. (2020). The prognostic value of EMT in glioma and its role in the glioma immune microenvironment. *Journal of Molecular Neuroscience*, *70*(10), 1501-1511.
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology*, *170*(5), 1445-1453.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., ... & Kleihues, P. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer research*, *64*(19), 6892-6899.

- Ohnishi, T., Arita, N., Hiraga, S., Higuchi, M., & Hayakawa, T. (1991). Human malignant glioma cells migrate to fibronectin and laminin: Role of extracellular matrix components in glioma cell invasion. In *Biological aspects of brain tumors* (pp. 408-415). Springer, Tokyo.
- Ostermann, S., Csajka, C., Buclin, T., Leyvraz, S., Lejeune, F., Decosterd, L. A., & Stupp, R. (2004). Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clinical cancer research*, *10*(11), 3728-3736.
- Ostrom, Q. T. et al. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro-oncology*, *16* (7), s. 896–913.
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., ... & Barnholtz-Sloan, J. S. (2013). CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-oncology*, *15*(suppl\_2), ii1-ii56.
- Pastrana, E., Silva-Vargas, V., & Doetsch, F. (2011). Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell stem cell*, *8*(5), 486-498.
- Patarroyo, M., Tryggvason, K., & Virtanen, I. (2002, June). Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 12, No. 3, pp. 197-207). Academic Press.
- Peiris-Pagès, M., Martínez-Outschoorn, U. E., Pestell, R. G., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2016). Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Research*, *18*(1), 1-10.
- Pervin, M., Unno, K., Nakagawa, A., Takahashi, Y., Iguchi, K., Yamamoto, H., ... & Nakamura, Y. (2017). Blood brain barrier permeability of (–)-epigallocatechin gallate, its proliferation-enhancing activity of human neuroblastoma SH-SY5Y cells, and its preventive effect on age-related cognitive dysfunction in mice. *Biochemistry and biophysics reports*, *9*, 180-186.
- Phillips, H. S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W. F., Soriano, R. H., Wu, T. D., ... & Aldape, K. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer cell*, *9*(3), 157-173.
- Pistollato, F., Abbadì, S., Rampazzo, E., Persano, L., Della Puppa, A., Frasson, C., ... & Basso, G. (2010). Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem cells*, *28*(5), 851-862.
- Plaks, V., Kong, N. & Werb, Z. (2015). The Cancer Stem Cell Niche: How Essential Is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells?. *Cell stem cell*, *16* (3), s. 225–238.
- Podlevsky, J. D., & Chen, J. J. L. (2012). It all comes together at the ends: telomerase structure, function, and biogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *730*(1-2), 3-11.
- Posner, J. B. (1996). Brain metastases: 1995. A brief review. *Journal of neuro-oncology*, *27*(3), 287-293.
- Qi, S. et al. (2012). ZEB2 Mediates Multiple Pathways Regulating Cell Proliferation, Migration, Invasion, and Apoptosis in Glioma. *PLOS ONE*, *7* (6), s. e38842.

- Qin, J., Ying, W., Cheng, X., Wu, X., Lu, B., Liang, Y., ... & Lu, W. (2014). A well-circumscribed border with peripheral Doppler signal in sonographic image distinguishes epithelioid trophoblastic tumor from other gestational trophoblastic neoplasms. *PloS one*, *9*(11), e112618.
- Rak, J., Filmus, J., Finkenzeller, G., Grugel, S., Marme, D., & Kerbel, R. S. (1995). Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews*, *14*(4), 263-277.
- Rao, C. N., Castronovo, V., Schmitt, M. C., Wewer, U. M., Claysmith, A. P., Liotta, L. A., & Sobel, M. E. (1989). Evidence for a precursor of the high-affinity metastasis-associated murine laminin receptor. *Biochemistry*, *28*(18), 7476-7486.
- Reyskens, K. M., & Arthur, J. S. C. (2016). Emerging roles of the mitogen and stress activated kinases MSK1 and MSK2. *Frontiers in cell and developmental biology*, *4*, 56.
- Ricks, T. K., Chiu, H. J., Ison, G., Kim, G., McKee, A. E., Kluetz, P., & Pazdur, R. (2015). Successes and challenges of PARP inhibitors in cancer therapy. *Frontiers in oncology*, *5*, 222.
- Rodón, L., González-Juncà, A., del Mar Inda, M., Sala-Hojman, A., Martínez-Sáez, E., & Seoane, J. (2014). Active CREB1 Promotes a Malignant TGF $\beta$ 2 Autocrine Loop in Glioblastoma TGF $\beta$ 2 Autocrine Loop. *Cancer discovery*, *4*(10), 1230-1241.
- Rojiani, A. M., & Dorovini-Zis, K. (1996). Glomeruloid vascular structures in glioblastoma multiforme: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Journal of neurosurgery*, *85*(6), 1078-1084.
- Rajo, F., Garcia-Parra, J., Zazo, S., Tusquets, I., Ferrer-Lozano, J., Menendez, S., ... & Albanell, J. (2012). Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer. *Annals of oncology*, *23*(5), 1156-1164.
- Romeo, Y., Zhang, X., & Roux, P. P. (2012). Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochemical Journal*, *441*(2), 553-569
- Roth, P., Silginer, M., Goodman, S. L., Hasenbach, K., Thies, S., Maurer, G., ... & Weller, M. (2013). Integrin control of the transforming growth factor- $\beta$  pathway in glioblastoma. *Brain*, *136*(2), 564-576.
- Roy, L.-O., Poirier, M.-B. & Fortin, D. (2015). Chloroquine inhibits the malignant phenotype of glioblastoma partially by suppressing TGF-beta. *Investigational new drugs*, *33* (5), s. 1020–1031.
- Rubin, L. L., & Staddon, J. M. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annual review of neuroscience*, *22*, 11.
- Ruiz-Garcia, H., Alvarado-Estrada, K., Schiapparelli, P., Quinones-Hinojosa, A., & Trifiletti, D. M. (2020). Engineering three-dimensional tumor models to study glioma cancer stem cells and tumor microenvironment. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 558381.
- Rulyak, S. J., Brentnall, T. A., Lynch, H. T. & Austin, M. A. (2003). Characterization of the neoplastic phenotype in the familial atypical multiple-mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. *Cancer*, *98* (4), s. 798–804.



- Safa, A. R., Saadatzadeh, M. R., Cohen-Gadol, A. A., Pollok, K. E., & Bijangi-Vishehsaraei, K. (2015). Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs. *Genes & diseases*, 2(2), 152-163.
- Saima, A., & Anwar, U. H. (2006). Morphological spectrum of vascular changes in glioblastoma multiforme.
- Sakamoto, K. M., & Frank, D. A. (2009). CREB in the pathophysiology of cancer: implications for targeting transcription factors for cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 15(8), 2583-2587.
- Samali, A., Szegezdi, E., MacDonald, D. C., Chonghaile, T. N., & Gupta, S. (2009). Bcl-2 family on guard at the ER. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296, C941-C953.
- Sami, A., & Karsy, M. (2013). Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in glioblastoma: novel therapeutic agents and advances in understanding. *Tumor Biology*, 34(4), 1991-2002.
- Sanjuán, X., Fernández, P. L., Miquel, R., Muñoz, J., Castronovo, V., Ménard, S., ... & CAMPO, E. (1996). Over-expression of the 67-kD laminin receptor correlates with tumour progression in human colorectal carcinoma. *The Journal of pathology*, 179(4), 376-380.
- Sasi, N., Hwang, M., Jaboin, J., Csiki, I., & Lu, B. (2009). Regulated cell death pathways: new twists in modulation of BCL2 family function. *Molecular cancer therapeutics*, 8(6), 1421-1429.
- Sawaya, R., Bindal, R. K., Lang, F. F., & Suki, D. (2012). Metastatic brain tumors. In *Brain tumors* (pp. 864-892). Elsevier Ltd.
- Schiffer, D., Mellai, M., Annovazzi, L., Caldera, V., Piazzzi, A., Denysenko, T., & Melcarne, A. (2014). Stem cell niches in glioblastoma: a neuropathological view. *BioMed research international*, 2014.
- Schuck, S., Soloaga, A., Schrott, G., Arthur, J. S. C., & Nordheim, A. (2003). The kinase MSK1 is required for induction of c-fos by lysophosphatidic acid in mouse embryonic stem cells. *BMC molecular biology*, 4(1), 1-8.
- Schultz, S., Pinsky, G. S., Wu, N. C., Chamberlain, M. C., Rodrigo, A. S., & Martin, S. E. (2005). Fine needle aspiration diagnosis of extracranial glioblastoma multiforme: Case report and review of the literature. *Cytojournal*, 2, 19.
- Seo, S., Jeon, H. Y., & Kim, H. (2017). Comparison of cellular transforming activity of OCT4, NANOG, and SOX2 in immortalized astrocytes. *DNA and Cell Biology*, 36(11), 1000-1009.
- Serra, V., Eichhorn, P. J., García-García, C., Ibrahim, Y. H., Prudkin, L., Sánchez, G., ... & Baselga, J. (2013). RSK3/4 mediate resistance to PI3K pathway inhibitors in breast cancer. *The Journal of clinical investigation*, 123(6), 2551-2563.
- Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Food/nahrung*, 44(3), 158-163.
- Shankar, S., Suthakar, G., & Srivastava, R. K. (2007). Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell cycle and induces apoptosis in pancreatic cancer. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 12(13), 5039-5051.
- Shay, J. W., & Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *European journal of cancer*, 33(5), 787-791.

- Shay, J. W., Zou, Y., Hiyama, E., & Wright, W. E. (2001). Telomerase and cancer. *Human molecular genetics*, *10*(7), 677-685.
- Shaywitz, A. J., & Greenberg, M. E. (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annual review of biochemistry*, *68*, 821.
- Sheppard, A. M., Brunstrom, J. E., Thornton, T. N., Gerfen, R. W., Broekelmann, T. J., McDonald, J. A., & Pearlman, A. L. (1995). Neuronal production of fibronectin in the cerebral cortex during migration and layer formation is unique to specific cortical domains. *Developmental biology*, *172*(2), 504-518.
- Shergalis, A., Bankhead, A., Luesakul, U., Muangsin, N. & Neamati, N. (2018). Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. *Pharmacological reviews*, *70* (3), s. 412–445.
- Shergalis, A., Bankhead, A., Luesakul, U., Muangsin, N., & Neamati, N. (2018). Current challenges and opportunities in treating glioblastoma. *Pharmacological reviews*, *70*(3), 412-445.
- Shi, L., Zhang, S., Feng, K., Wu, F., Wan, Y., Wang, Z., ... & You, Y. (2012). MicroRNA-125b-2 confers human glioblastoma stem cells resistance to temozolomide through the mitochondrial pathway of apoptosis. *International journal of oncology*, *40*(1), 119-129.
- Shimizu, M., Adachi, S., Masuda, M., Kozawa, O., & Moriwaki, H. (2011). Cancer chemoprevention with green tea catechins by targeting receptor tyrosine kinases. *Molecular nutrition & food research*, *55*(6), 832-843.
- Siegelin, M. D., Habel, A., & Gaiser, T. (2008). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) downregulates PEA15 and thereby augments TRAIL-mediated apoptosis in malignant glioma. *Neuroscience letters*, *448*(1), 161-165.
- Sigal, A., & Rotter, V. (2000). Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer research*, *60*(24), 6788-6793.
- Simon, J., Arthur, C., Fong, A. L., Dwyer, J. M., Davare, M., Reese, E., Obrietan, K., & Impey, S. (2004). Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *Journal of Neuroscience*, *24*(18), 4324-4332.
- Singh, B. N., Shankar, S., & Srivastava, R. K. (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical pharmacology*, *82*(12), 1807-1821.
- Singh, N., Miner, A., Hennis, L., & Mittal, S. (2021). Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma-a comprehensive review. *Cancer Drug Resistance*, *4*(1), 17-43.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research*, *63*(18), 5821-5828.
- Smith, A., Giunta, B., Bickford, P. C., Fountain, M., Tan, J., & Shytle, R. D. (2010). Nanolipidic particles improve the bioavailability and  $\alpha$ -secretase inducing ability of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for the treatment of Alzheimer's disease. *International journal of pharmaceutics*, *389*(1-2), 207-212.

- Smolen, G. A., Zhang, J., Zubrowski, M. J., Edelman, E. J., Luo, B., Yu, M., ... & Haber, D. A. (2010). A genome-wide RNAi screen identifies multiple RSK-dependent regulators of cell migration. *Genes & development*, 24(23), 2654-2665.
- Snuderl, M., Fazlollahi, L., Le, L. P., Nitta, M., Zhelyazkova, B. H., Davidson, C. J., ... & Iafrate, A. J. (2011). Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer cell*, 20(6), 810-817.
- Soeda, A. et al. (2015). The Evidence of Glioblastoma Heterogeneity. *Scientific reports*, 5 (1), s. 7979.
- Song, J. (2020). Targeting epithelial-mesenchymal transition pathway in hepatocellular carcinoma. *Clinical and molecular hepatology*, 26 (4), s. 484–486.
- Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S. G., Touloumis, A., Collins, V. P., Marioni, J. C., ... & Tavaré, S. (2013). Intra-tumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(10), 4009-4014.
- Steinmann, J., Buer, J., Pietschmann, T., & Steinmann, E. (2013). Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *British journal of pharmacology*, 168(5), 1059-1073.
- Strom, Q. T., Gittleman, H., Xu, J., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2016). CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol*, 18(Suppl 5), v1-v75.
- Stupp, R., Brada, M., Van Den Bent, M. J., Tonn, J. C., & Pentheroudakis, G. E. S. M. O. (2014). High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*, 25, iii93-iii101.
- Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., ... & Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England*
- Sulman, E. P., Ismaila, N., & Chang, S. M. (2017). Radiation therapy for glioblastoma: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline endorsement of the American Society for Radiation Oncology guideline. *Journal of oncology practice*, 13(2), 123-127.
- Sultanem, K., Lambert, C., Gopaul, D., Corns, R., Leblanc, R., & Souhami, L. (2001). The use of hypofractionated accelerated intensity modulated irradiation in the treatment of glioblastoma multiforme: Preliminary results of a phase I trial. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 51(3), 204.
- Sulzmaier, F. J. et al. (2016). RSK2 activity mediates glioblastoma invasiveness and is a potential target for new therapeutics. *Oncotarget*, 7 (48), s. 79869–79884.
- Sulzmaier, F. J., & Ramos, J. W. (2013). RSK Isoforms in Cancer Cell Invasion and Metastasis RSKs Regulate Metastasis. *Cancer research*, 73(20), 6099-6105.
- Sun, L., Zhang, Y., Zhang, W., Lai, X., Li, Q., Zhang, L., & Sun, S. (2020). Green tea and black tea inhibit proliferation and migration of HepG2 cells via the PI3K/Akt and MMPs signalling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 125, 109893.

- Sutherland, C. (2011). What are the bona fide GSK3 substrates?. *International journal of Alzheimer's Disease, 2011*
- Sutherland, C., & Cohen, P. (1994). The  $\alpha$ -isoform of glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle is inactivated by p70 S6 kinase or MAP kinase-activated protein kinase-1 in vitro. *FEBS letters, 338*(1), 37-42.
- Sutherland, C., Leighton, I. A., & Cohen, P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3  $\beta$  by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochemical Journal, 296*(1), 15-19.
- Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y. & Yamada, K. (2004). A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nature structural & molecular biology, 11* (4), s. 380–381.
- Takashima, Y., Kawaguchi, A., & Yamanaka, R. (2019). Promising prognosis marker candidates on the status of epithelial–mesenchymal transition and glioma stem cells in glioblastoma. *Cells, 8*(11), 1312.
- Tamburini, J., Chapuis, N., Bardet, V., Park, S., Sujobert, P., Willems, L., ... & Bouscary, D. (2008). Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 111*(1), 379-382.
- Tamimi, A. F., & Juweid, M. (2017). Epidemiology and outcome of glioblastoma. *Exon Publications, 143-153*.
- Tamura, K., Aoyagi, M., Wakimoto, H., Ando, N., Nariai, T., Yamamoto, M., & Ohno, K. (2010). Accumulation of CD133-positive glioma cells after high-dose irradiation by Gamma Knife surgery plus external beam radiation. *Journal of neurosurgery, 113*(2), 310-318.
- Tandel, G. S., Biswas, M., Kakde, O. G., Tiwari, A., Suri, H. S., Turk, M., ... & Suri, J. S. (2019). A review on a deep learning perspective in brain cancer classification. *Cancers, 11*(1), 111.
- Tang, S.-N. et al. (2012). Inhibition of sonic hedgehog pathway and pluripotency maintaining factors regulate human pancreatic cancer stem cell characteristics. *International journal of cancer, 131* (1), s. 30–40.
- Tao, C., Huang, K., Shi, J., Hu, Q., Li, K., & Zhu, X. (2020). Genomics and prognosis analysis of epithelial-mesenchymal transition in glioma. *Frontiers in Oncology, 10*, 183.
- Testa, J. R., & Bellacosa, A. (2001). AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 98*(20), 10983-10985.
- Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of GlioblastomaGBM Epidemiology and Biomarkers. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention, 23*(10), 1985-1996.
- Turpeenniemi-Hujanen, T., Thorgeirsson, U. P., Rao, C. N., & Liotta, L. A. (1986). Laminin increases the release of type IV collagenase from malignant cells. *Journal of Biological Chemistry, 261*(4), 1883-1889.
- Udroiu, I., Marinaccio, J. & Sgura, A. (2019). Epigallocatechin-3-gallate induces telomere shortening and clastogenic damage in glioblastoma cells. *Environmental and molecular mutagenesis, 60* (8), s. 683–692.

- Uribe, D., Torres, A., Rocha, J. D., Niechi, I., Oyarzún, C., Sobrevia, L., ... & Quezada, C. (2017). Multidrug resistance in glioblastoma stem-like cells: Role of the hypoxic microenvironment and adenosine signaling. *Molecular aspects of medicine*, *55*, 140-151.
- Valtz, N. L., Hayes, T. E., Norregaard, T., Liu, S. M., & McKay, R. D. (1991). An embryonic origin for medulloblastoma. *The New biologist*, *3*(4), 364-371.
- Van Aller GS, Carson JD, Tang W, Peng H, Zhao L, Copeland RA, Tummino PJ, Luo L. Epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea, is a dual phosphoinositide-3-kinase/mTOR inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;406:194–9
- Van den Brule, F. A., Berchuck, A., Bast, R. C., Liu, F. T., Gillet, C., Sobel, M. E., & Castronovo, V. (1994). Differential expression of the 67-kD laminin receptor and 31-kD human laminin-binding protein in human ovarian carcinomas. *European journal of cancer*, *30*(8), 1096-1099.
- Van Den Brûle, F. A., Buicu, C., Berchuck, A., Bast, R. C., Deprez, M., Liu, F. T., ... & Castronovo, V. (1996). Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1, and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma. *Human pathology*, *27*(11), 1185-1191.
- Van Noorden, C. J., Hira, V. V., van Dijck, A. J., Novak, M., Breznik, B., & Molenaar, R. J. (2021). Energy metabolism in IDH1 wild-type and IDH1-mutated glioblastoma stem cells: a novel target for therapy?. *Cells*, *10*(3), 705.
- Van Tellingen, O., Yetkin-Arik, B., De Gooijer, M. C., Wesseling, P., Wurdinger, T., & De Vries, H. E. (2015). Overcoming the blood–brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resistance Updates*, *19*, 1-12.
- Vats, A., Bielby, R. C., & Tolley, N. S. (2005). Nerem R. Polak JM. *Stem cells. Lancet*, *366*, 592-602.
- Vega, S. et al. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes & development*, *18* (10), s. 1131–1143. doi:10.1101/gad.294104
- Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., ... & Cancer Genome Atlas Research Network. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell*, *17*(1), 98-110.
- Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature*, *469* (7330), s. 314–322.
- Voog, J., & Jones, D. L. (2010). Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell stem cell*, *6*(2), 103-115.
- Waltregny, D., de Leval, L., Ménard, S., de Leval, J., & Castronovo, V. (1997). Independent prognostic value of the 67-kd laminin receptor in human prostate cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *89*(16), 1224-1227.
- Wan, F., Zhang, S., Xie, R., Gao, B., Campos, B., Herold-Mende, C., & Lei, T. (2010). The utility and limitations of neurosphere assay, CD133 immunophenotyping and side population assay in glioma stem cell research. *Brain pathology*, *20*(5), 877-889.

- Wang, X., Zhen, X., Wang, J., Zhang, J., Wu, W., & Jiang, X. (2013). Doxorubicin delivery to 3D multicellular spheroids and tumors based on boronic acid-rich chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, *34*(19), 4667-4679.
- Wang, Y., Dong, H., Xu, M., Xin, B., Niu, W., Xu, D., ... & Liu, L. (2014). 37-kDa laminin receptor precursor promotes lung adenocarcinoma cell invasion and metastasis by epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Gene Therapy*, *21*(4), 150-157.
- Wang, Z. et al. (2020). MRPS16 facilitates tumor progression via the PI3K/AKT/Snail signaling axis. *Journal of cancer*, *11* (8), s. 2032–2043.
- Wei, Y., Jiang, Y., Zou, F., Liu, Y., Wang, S., Xu, N., ... & Jiang, J. (2013). Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(17), 6829-6834.
- Weinberg, J. S., Lang, F. F., & Sawaya, R. (2001). Surgical management of brain metastases. *Current oncology reports*, *3*(6), 476-483.
- Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S. M., ... & Reifenberger, G. (2015). Glioma. *Nature reviews Disease primers*, *1*(1), 1-18.
- Westphal, M., Ram, Z., Riddle, V., Hilt, D., & Bortey, E. (2006). Gliadel® wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. *Acta neurochirurgica*, *148*(3), 269-275.
- Wilson, T. A., Karajannis, M. A., & Harter, D. H. (2014). Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surgical neurology international*, *5*.
- Wiseman, S. A., Balentine, D. A., & Frei, B. (1997). Antioxidants in tea. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, *37*(8), 705-718.
- Wolburg, H., & Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood–brain barrier: development, composition and regulation. *Vascular pharmacology*, *38*(6), 323-337.
- Wolburg, H., & Paulus, W. (2010). Choroid plexus: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, *119*(1), 75-88.
- Wong, A. D., Ye, M., Levy, A. F., Rothstein, J. D., Bergles, D. E., & Searson, P. C. (2013). The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Frontiers in neuroengineering*, *6*, 7.
- Wong, M. L., Kaye, A. H., & Hovens, C. M. (2007). Targeting malignant glioma survival signalling to improve clinical outcomes. *Journal of clinical neuroscience*, *14*(4), 301-308.
- Wu, H. et al. (2016). The 37-kDa laminin receptor precursor regulates the malignancy of human glioma cells. *Cell biochemistry and function*, *34* (7), s. 516–521.
- Wu, H., Li, J., Xu, D., Jv, D., Meng, X., Qiao, P., ... & Shi, B. (2016). The 37-kDa laminin receptor precursor regulates the malignancy of human glioma cells. *Cell Biochemistry and Function*, *34*(7), 516-521.

- Wu, W., Klockow, J. L., Zhang, M., Lafortune, F., Chang, E., Jin, L., ... & Daldrup-Link, H. E. (2021). Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacological Research*, *171*, 105780.
- Wu, Y., Zhou, B. TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* **102**, 639–644 (2010).
- Xie, C. R., You, C. G., Zhang, N., Sheng, H. S., & Zheng, X. S. (2018). Epigallocatechin gallate preferentially inhibits O6-methylguanine DNA-methyltransferase expression in glioblastoma cells rather than in nontumor glial cells. *Nutrition and cancer*, *70*(8), 1339-1347.
- Xing, W. K., Shao, C., Qi, Z. Y., Yang, C., & Wang, Z. (2015). The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis. *Drug design, development and therapy*, *9*, 3341.
- Yadav, P., & Shankar, B. S. (2019). Radio resistance in breast cancer cells is mediated through TGF- $\beta$  signalling, hybrid epithelial-mesenchymal phenotype and cancer stem cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *111*, 119-130.
- Yao, M., Li, S., Wu, X., Diao, S., Zhang, G., He, H., ... & Lu, Y. (2018). Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. *Cellular & molecular immunology*, *15*(8), 737-739.
- Yarden, Y., Kuang, W. J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J., ... & Ullrich, A. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *The EMBO journal*, *6*(11), 3341-3351.
- Ye, Y. (2021). Nanog promotes stem-like traits of glioblastoma cells. *Frontiers in bioscience*, *26* (3), s. 552–565.
- Yi, S. Y., Hao, Y. B., Nan, K. J., & Fan, T. L. (2013). Cancer stem cells niche: a target for novel cancer therapeutics. *Cancer treatment reviews*, *39*(3), 290-296.
- Yilmazer, A. (2018). Evaluation of cancer stemness in breast cancer and glioblastoma spheroids in vitro. *3 biotech*, *8* (9).
- Yoon, H. S., Choi, S. H., Park, J. H., Min, J. Y., Hyon, J. Y., Yang, Y., ... & Chung, Y. H. (2021). A Novel Protein–Protein Interaction between RSK3 and I $\kappa$ B $\alpha$  and a New Binding Inhibitor That Suppresses Breast Cancer Tumorigenesis. *Cancers*, *13*(12), 2973.
- Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*, *9*(1), 47-59.
- Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation*, *119*(6), 1429-1437.
- Yilmazer, A. (2018). Evaluation of cancer stemness in breast cancer and glioblastoma spheroids in vitro. *3 biotech*, *8* (9).
- Zhang, W., & Jia, J. (2008). Green tea extract, epigallocatechin-3-gallate, inhibits the growth and invasive ability of human glioma cells. *Molecular Medicine Reports*, *1*(5), 735-739.

- Zhang Y, Wang SX, Ma JW, Li HY, Ye JC, Xie SM, Du B, Zhong XY (2015) EGCG inhibits properties of glioma stem-like cells and synergizes with temozolomide through downregulation of P-glycoprotein inhibition. *J Neurooncol* 121:41–52.
- Zhang, H., Wang, R., Yu, Y., Liu, J., Luo, T., & Fan, F. (2019). Glioblastoma treatment modalities besides surgery. *Journal of Cancer*, 10(20), 4793.
- Zhang, J., Nie, S., & Wang, S. (2013). Nanoencapsulation enhances epigallocatechin-3-gallate stability and its antiatherogenic bioactivities in macrophages. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(38), 9200–9209.
- Zhang, M., Song, T., Yang, L., Chen, R., Wu, L., Yang, Z., & Fang, J. (2008). Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 27(1), 1-7.
- Zhang, Q., Feng, Y., & Kennedy, D. (2017). Multidrug-resistant cancer cells and cancer stem cells hijack cellular systems to circumvent systemic therapies, can natural products reverse this?. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(5), 777-801.
- Zhang, X., Zhang, W., Mao, X. G., Zhen, H. N., Cao, W. D., & Hu, S. J. (2013). Targeting role of glioma stem cells for glioblastoma multiforme. *Current medicinal chemistry*, 20(15), 1974-1984.
- Zhang, Y., Wang, S. X., Ma, J. W., Li, H. Y., Ye, J. C., Xie, S. M., ... & Zhong, X. Y. (2015). EGCG inhibits properties of glioma stem-like cells and synergizes with temozolomide through downregulation of P-glycoprotein inhibition. *Journal of neuro-oncology*, 121(1), 41-52.
- Zhou, F., Yang, Y. & Xing, D. (2011). Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *The FEBS journal*, 278 (3), s. 403–413. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07965.x
- Zhu, J., Jiang, Y., Yang, X., Wang, S., Xie, C., Li, X., ... & Zhong, C. (2017). Wnt/ $\beta$ -catenin pathway mediates (–)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibition of lung cancer stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(1), 15-21.
- Zhu, Y., Guignard, F., Zhao, D., Liu, L., Burns, D. K., Mason, R. P., ... & Parada, L. F. (2005). Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer cell*, 8(2), 119-130.