# Evaluation *in vivo* des effets suppresseurs de tumeur du cluster miR-X sur les cellules initiatrices de gliomes de haut grade de malignité

## The miR-X cluster tumor suppressor effects on high grade glioma-initiating cells: *in vivo* assessment

**F Almairac [1], M Fareh [2], S De-La-Forest [2], L Turchi [2], F Burel-Vandenbos [3], D Fontaine [1], P Paquis [1], T Virolle [2]**

*1. Neurochirurgie CHU Nice - Hôpital Pasteur, Nice*
*2. INSERM U 898 Faculté de Médecine - Tour Pasteur, Nice*
*3. Anatomo-pathologie CHU Nice - Hôpital Pasteur, Nice*

**Mots clés**

- Glioblastomes
- Gliomes
- Micro-ARN
- Cellules souches cancéreuses
- Xénogreffes

**Résumé**

Objectifs. Les cellules initiatrices de gliomes (CIG) ont des propriétés souches (autorenouvellement-multipotence) et sont résistantes aux traitements conventionnels. Leur rôle est majeur dans la récidive systématique des glioblastomes. L'expression stable du cluster miR-X (groupement de 5 micro-ARN) par les CIG permet de réprimer leurs propriétés souches *in vitro*. Nous voulions confirmer, *in vivo*, les effets suppresseurs de tumeur du cluster miR-X sur les CIG.
Méthodes. Nous avons réalisé des xénogreffes orthotopiques sur des souris NOD/SCID. Les cellules injectées étaient des CIG issues de l'exérèse de gliomes malins humains. Deux types de CIG étaient greffées : les contrôles non modifiées (CIG CTL) et les CIG exprimant stablement le cluster miR-X (CIG miR). Les souris étaient réparties en trois groupes selon les cellules injectées : « contrôles », « miR » et « mélanges ». L'évolution tumorale a été suivie par bioluminescence *in vivo* chaque semaine et en anatomopathologie lors du sacrifice.
Résultats. Trente-quatre souris ont été greffées. Le suivie moyen était de 10,4 semaines. Les groupes « contrôles » émettaient plus de luminescence que les autres groupes ($p < 0,039$). En anatomopathologie, dans les groupes « miR » et « mélanges » le foyer tumoral était soit absent, soit de taille diminuée par rapport aux groupes « contrôles ». Ces résultats suggèrent un effet antiprolifératif du cluster miR-X sur les CIG, par inhibition de l'autorenouvellement.
Conclusion. Cette étude confirme les effets suppresseurs de tumeur du cluster miR-X sur les CIG en condition *in vivo*. Ces résultats doivent être appliqués à d'autres lignées de CIG et à d'autres modèles animaux avant passage chez l'homme.

**Keywords**

- Glioblastomas
- Gliomas
- MiRNA
- Cancer stem cells
- Xenografts

**Abstract**

Objectives. Glioma-initiating cells (GiCs) are defined by their extensive self-renewal, differentiation, and are naturally resistant to conventional treatments. GiCs are known to be involved in glioblastomas systematic recurrence and tumor growth. Stable miR-X cluster expression (5 micro-RNA group) in GiCs promotes exit from stemness with loss of stem-like signature, self-renewal, and infiltration within ex vivo model of brain tissues. Our aim was to confirm the tumor suppressor effects of the miR-X cluster in mice using intracranial GiCs xenografts.
Methods. We performed orthotopic xenografts in NOD/SCID mice. Injected cells were GiCs from human malignant gliomas. These primary cell lines were composed by non-modified GiCs (GiCs CTL), and by GiCs stably expressing the miR-X cluster (GiCs miR). Each cell line stably expressed a luciferase reporter gene. Three groups of mice were formed: "control", "cluster", and "mixed" groups composed of different proportions of GiCs CTL and GiCs miR. Tumor progression was assessed by a bioluminescence imaging each week, and by histological analysis at the end of the experiment.
Results. Thirty-four mice were distributed in 7 groups. The median of follow-up time was 10.4 weeks. "Control" groups had a higher luminescent signal than "cluster" and "mixed" groups ($p \leq 0.039$). Histological analysis showed a decreased tumor size, or its absence, in "cluster" and "mixed" groups compared to "control" groups. These results suggest a miR-X cluster anti-proliferative effect on GiCs by inhibition of self-renewal properties.
Conclusion. Our study confirms in vivo the miR-X cluster tumor suppressor effects. However these results have to be confirmed on other primary GiCs lines and by using different animal models before a possible human application.

**Correspondance :**

*F Almairac - Service de neurochirurgie - CHU de Nice, hôpital Pasteur, pavillon G*
*avenue de la voie Romaine, 06000 Nice*
*E-mail : fabien.almairac@gmail.com*

Disponible en ligne sur www.bium.univ-paris5.fr/acad-chirurgie
1634-0647 - © 2012 Académie nationale de chirurgie. Tous droits réservés.

Tableau 1. Comparaison des moyennes de luminescence des groupes de souris greffées au cours d'une période comparable pour chacun des groupes.

| Groupes | Valeur luminescence (écart-type) | Valeur *p* |
|---|---|---|
| « contrôle » n°1 *vs.* « cluster » | 4,12 x10$^5$ (± 1,52 x10$^5$)<br>1,05 x10$^5$ (± 1,68 x10$^4$) | 0,002 |
| « contrôle » n°1 *vs.* « mélange ½ - ½ » n°1 | 4,12 x10$^5$ (± 1,52 x10$^5$)<br>1,18 x10$^5$ (± 2,80 x10$^4$) | 0,002 |
| « contrôle » n°2 *vs.* « mélange ½ - ½ » n°2 | 1,95 x10$^5$ (± 1,02 x10$^5$)<br>1,07 x10$^5$ (± 3,48 x10$^4$) | 0,039 |
| « cluster » *vs.* « mélange ½ - ½ » n°1 | 1,05 x10$^5$ (± 1,68 x10$^4$)<br>1,18 x10$^5$ (± 2,80 x10$^4$) | 0,699 |

Les valeurs de la luminescence sont exprimées en p/s/cm²/sr.

Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes et les plus agressives de l'adulte (1). Le traitement standard associe chirurgie d'exérèse, chimioradiothérapie concomitante, puis chimiothérapie d'entretien. La survie médiane ne dépasse pas 15 mois et la récidive est la règle (2). Cette rechute tumorale systématique est expliquée en partie par la présence de cellules souches cancéreuses ou cellules initiatrices de gliomes (CIG) dans le cas des glioblastomes. Ces cellules, minoritaires dans la tumeur, sont essentielles à l'initiation et au développement tumoral (3). Elles possèdent des propriétés d'autorenouvellement, de différenciation et de résistance aux thérapies conventionnelles. Cibler les CIG représente donc un enjeu thérapeutique majeur.
Le cluster miR-X, groupement de 5 micro-ARN, est fortement induit et exprimé lors de la différenciation en milieu sérum des CIG. L'expression stable de ce cluster dans des CIG, par transduction lentivirale, est capable de réprimer les propriétés souches de ces cellules et d'inhiber leur prolifération et infiltration au sein d'un tissu organotypique (4). Un effet à distance des CIG exprimant le cluster miR-X (CIG miR) sur les CIG non modifiées « contrôles » (CIG CTL) a été mis en évidence lors de cocultures cellulaires. Des molécules diffusibles seraient sécrétées dans le milieu de culture par les CIG miR, expliquant cet effet paracrine.
Les objectifs de cette étude étaient de confirmer, en condition *in vivo*, les effets suppresseurs de tumeur du cluster miR-X sur les CIG. Il fallait, pour cette première étape chez l'animal, répondre à deux questions essentielles :

- les CIG miR ont-elles perdues leur capacité à former une tumeur ?
- l'effet paracine des CIG miR sur les CIG CTL est-il reproduit en condition *in vivo* ?

## Matériels et méthodes

### Greffes

Entre janvier et juillet 2011, nous avons réalisé des xénogreffes intracraniales orthotopiques sur des souris immunodéficientes NOD/SCID. Les greffes se faisaient avec un cadre de stéréotaxie dans le striatum droit. Les cellules injectées étaient des CIG issues de l'exérèse de gliomes malins humains. Ces lignées primaires étaient constituées de CIG non modifiées « contrôles » (CIG CTL) et de CIG exprimant stablement le cluster miR-X (CIG miR). Elles exprimaient stablement le gène rapporteur de la luciférase « LUC » afin de les suivre en imagerie par bioluminescence. Pour répondre aux deux questions des objectifs, différents groupes de souris ont été constitués selon le type de cellules injectées. Des groupes « contrôles » qui n'ont reçu que des CIG CTL, des groupes « cluster » qui n'ont reçu que des CIG miR, et des groupes « mélanges » qui ont reçu des CIG CTL et CIG miR.
L'évolution tumorale a été suivie de deux façons : par bioluminescence à un rythme hebdomadaire (souris vivantes) et en anatomo-pathologie lors du sacrifice. Pour l'étude histologique, une coloration hématoxyline-éosine des coupes de cerveaux incluses en paraffine étaient faites. Une analyse immunohistochimique avec un anticorps anti-vimentine humaine permettait de révéler en marron les cellules humaines tumorales injectées au sein de ce tissu murin.

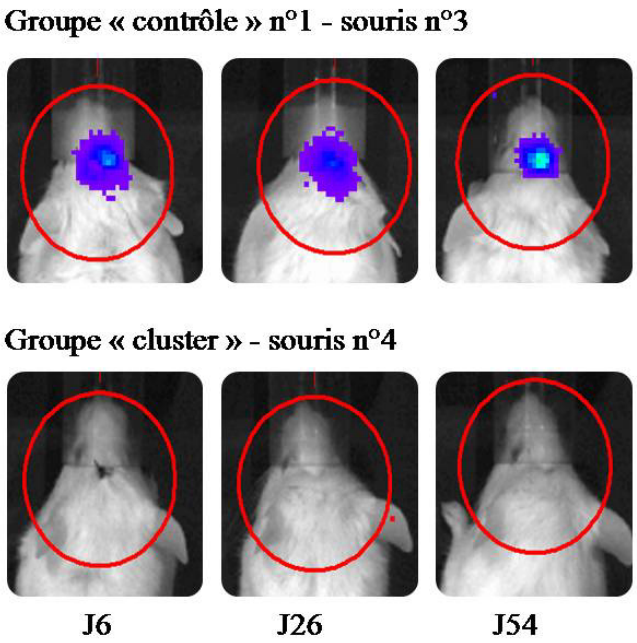


Figure 1. Photographies de l'émission de luminescence des CIG CTL « LUC » (souris n°3 du groupe « contrôle » n°1, en haut) et des CIG miR « LUC » (souris n°4 du groupe « cluster », en bas).
La caméra détectait le dégagement de lumière des CIG CTL « LUC » (groupe « contrôle » n°1), mais pas celui des cellules CIG miR « LUC » (groupe « cluster »), tout au long de l'expérimentation.

### Analyses statistiques

Lorsque les données étaient paramétriques, après vérification de la normalité de la distribution et calcul des variances des échantillons, le test t de Student a été fait. Lorsque les échantillons à comparer avaient un effectif trop petit (données non paramétriques), le test de Mann-Whitney a été utilisé. La significativité était retenue pour un $p < 0,05$. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT® (Addinsoft, France).

## Résultats

Trente-quatre souris ont été réparties en sept groupes. Le suivie moyen était de 10,4 semaines (4-16).

### Bioluminescence

En bioluminescence, les groupes « contrôles » émettaient systématiquement plus de luminescence que les groupes « cluster » et « mélanges » ($p \leq 0,039$). En présence de CIG miR, et quel que soit le rapport cellulaire des mélanges, les CIG CTL n'émettaient plus suffisamment de luminescence et n'étaient plus détectées par l'appareil. Le métabolisme des CIG « contrôles » était donc modifié par le cluster miR-X (tableau 1, fig. 1 et fig. 2).

### Anatomopathologie

En anatomopathologie, les groupes « contrôles » présentaient

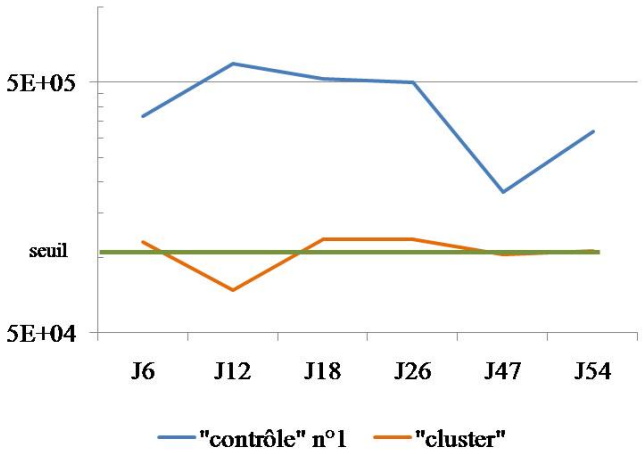


Figure 2. Comparaison de la moyenne de luminescence des groupes « contrôle » n°1 et « cluster ».
La moyenne de luminescence émise par les CIG CTL « LUC » greffées aux souris du groupe « contrôle » n°1 (courbe bleue) était supérieure à celle émise par les CIG miR « LUC » greffées aux souris du groupe « cluster » (courbe orange). Cette différence de luminescence est statistiquement significative ($p$ = 0,002). Les valeurs de la luminescence sont exprimées en p/s/cm²/sr et représentées en log10. Le seuil de détection de la caméra est fixé à $1x10^5$p/s/cm²/sr (ligne verte).

un foyer tumoral plus volumineux que dans les autres groupes. Des cellules infiltrantes étaient observées dans tous les groupes, mais ceux qui avaient reçu des CIG miR ne présentaient pas de foyer tumoral à distance du site d'injection (fig. 3).
Ces résultats suggèrent un effet inhibiteur du cluster miR-X sur la prolifération des CIG.

## Discussion

L'utilisation du cluster miR-X en pratique courante s'appuierait sur le principe de cibler spécifiquement le contingent « souche » des cellules tumorales de gliomes de haut grade (les CIG), afin de les rendre soit quiescentes, soit chimio/radio sensibles. Après réalisation d'une exérèse ou d'une biopsie tumorale, l'administration du cluster miR-X pourrait se faire par plusieurs voies, directes *in situ* ou systémiques. Les CIG résiduelles, qui font systématiquement le lit de la récidive, pourraient être ainsi forcées à sortir de leur état souche et accessibles à un traitement adjuvant anticancéreux conventionnel.
Plusieurs approches sont envisageables : la thérapie génique, pour délivrer la région codante du cluster miR-X par transduction lentivirale ou adénovirale aux cellules cibles (5) ; la thérapie cellulaire, en se servant de biomatériaux emprisonnant des CIG miR mais laissant diffuser le principe actif pour le délivrer aux cellules cibles (6-7) ; l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses du patient, qui ont un tropisme neurologique particulier et notamment pour les tumeurs gliales (8). Elles exprimeraient la région codante du cluster miR-X et délivreraient aux CIG le principe actif.

## Conclusion

Cette étude confirme les effets suppresseurs de tumeur du cluster miR-X sur les CIG. En condition *in vivo*, il empêche ou réduit le regroupement cellulaire en foyer tumoral et semble inhiber la prolifération des CIG. Ces résultats doivent être confirmés par l'expérimentation sur d'autres lignées primaires de CIG et sur d'autres modèles animaux avant évaluation clinique. La méthode idéale d'administration du cluster miR-X ou du principe actif produit par les CIG miR doit également être définie avant une éventuelle application thérapeutique.

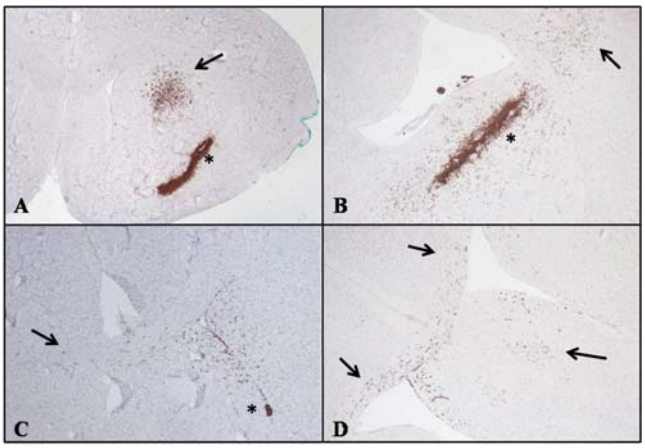


Figure 3. Coupes histologiques des cerveaux de souris greffées.
Immunohistochimie sur coupes incluses en paraffine avec anticorps antivimentine humaine colorant en marron les cellules greffées, regroupées en foyers tumoraux (*) et en cellules infiltrantes (→).
A. Souris 2 du groupe « contrôle » n°1, grossissement x20. Le foyer tumoral est de taille moyenne, des cellules ont infiltré et se regroupent dans le striatum.
B. Souris 4 du groupe « contrôle » n°2, (x40). Foyer tumoral de taille moyenne, infiltration peritumorale et du corps calleux.
C. Souris 5 du groupe « cluster » (x40). Petit foyer tumoral, infiltration cellulaire du corps calleux, pas de regroupement tumoral à distance.
D. Souris 1 du groupe « mélange ½ - ½ » (1/2 de CIG CTL et 1/2 de CIG miR), (x40). Pas de foyer tumoral, infiltration striatale et du corps calleux, pas de regroupement tumoral à distance.

## Questions

**Question de B Lobel**
Votre réflexion sur les cellules initiatrices de gliomes à propriétés de cellules souches peut-elle s'appliquer à d'autres tumeurs et lesquelles ?
**Réponse**
Oui, la notion de cellules souches cancéreuses a été proposée pour la première fois dans le cas de la leucémie aiguë myéloïde et validée depuis dans de nombreuses tumeurs solides telles que le cancer du sein, de la prostate, du pancréas et du colon.
**Question de M Germain**
Compliments. Vous avez utilisé du sérum de veau fœtal. Or les produits fœtaux prélevés avant le 21e jour ont des particularités. Pouvez-vous préciser l'intérêt de ce sérum ?
**Réponse**
Le sérum de veau fœtal (SVF) est le sérum le plus largement utilisé en culture cellulaire. Les protéines globulaires, nommées albumine de sérum bovin, sont le composant majeur du sérum de veau fœtal. L'importante variété de protéines dans le SVF maintient les cellules en culture dans un milieu dans lequel elles peuvent survivre, grandir et se multiplier.
**Question de J Baulieux**
L'approche de l'origine tumorale des tumeurs du pancréas à partir d'une cellule souche « progénitrice » est comparable à ce que l'on peut retrouver au niveau du foie, où la même cellule souche, maintenant identifiée, est à l'origine de certains carcinomes hépatocytaires et adénomes, vraisemblablement aussi de certains cholangiocarcinomes, ce qui pourrait expliquer certaines tumeurs mixtes hépatocholangiocarcinomes. Cela ouvre, par ailleurs, certaines voies thérapeutiques nouvelles, au stade initial de la cancérogenèse.
**Réponse**
La démarche de l'équipe de recherche de mon laboratoire d'accueil, dirigée par le Dr Thierry Virolle, est d'identifier les mécanismes de régulation des cellules souches de glioblastome pour pouvoir les cibler spécifiquement. Il s'agit d'un axe de recherche en cancérologie de plus en plus emprunté par les laboratoires car, semble-t-il, très prometteur.

## Références


1. Hoffman S, Propp JM, McCarthy BJ. Temporal trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1999. Neuro Oncol 2006 ; 8 : 27-37.
2. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med 2005 ; 352 : 987-96.
3. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001 ; 414 : 105-11.
4. Fareh M, Turchi L, Virolle V, Debruyne D, Almairac F, de-la-Forest Divonne S, et al. The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. Cell Death Differ 2011 Jul 1.
5. Kroeger KM, Muhammad AK, Baker GJ, Assi H, Wibowo MK, Xiong W, et al. Gene therapy and virotherapy: novel therapeutic approaches for brain tumors. Discov Med 2010 ; 10 : 293-304.
6. Emerich DF, Winn SR, Christenson L, Palmatier MA, Gentile FT, Sanberg PR. A novel approach to neural transplantation in Parkinson's disease: use of polymer-encapsulated cell therapy. Neurosci Biobehav Rev 1992 ; 16 : 437-47.
7. Jiao YP, Cui FZ. Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. Biomed Mater 2007 ; 2 : R24-37.
8. Roger M, Clavreul A, Venier-Julienne MC, Passirani C, Sindji L, Schiller P, et al. Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for delivery of nanoparticles to brain tumors. Biomaterials 2010 ; 31 : 8393-401.