

Année 2013

**LES CELLULES SOUCHES CANCÉREUSES,  
ORIGINES DU CANCER ? HYPOTHÈSES,  
CARACTÉRISTIQUES ET IMPLICATIONS  
THÉRAPEUTIQUES EN MÉDECINE HUMAINE  
ET VÉTÉRINAIRE**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

le.....

par

**Marie, Catherine JACOLOT**

Née le 30 juillet 1988 à Paris 15<sup>ième</sup>

JURY

**Président : Pr.  
Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL**

**Membres**

**Directeur : M. PANTHIER Jean Jacques  
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort au sein de l'unité de génétique  
médicale et moléculaire**

**Assesseur : Mme PILOT-STORCK Fanny  
Maître de conférences au sein de l'unité de physiologie et thérapeutique**



*À ma mère à qui je dois tout et que je  
n'oublie pas ...*



## LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur GOGNY Marc

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires: Mme et MM. : BRUGERE Henri, BRUGERE-PICOUX Jeanne, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard, CRESPEAU François, DEPUTTE Bertrand, MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, POUCHELON Jean-Louis, ROZIER Jacques

### **DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)**

**Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur**

<b>- UNITE DE CARDIOLOGIE</b> Mme CHETBOUL Valérie, Professeur * Mme GKOUNI Vassiliki, Praticien hospitalier	<b>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES</b> M. BLAGA Radu Gheorghe, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. CHERMETTE René, Professeur * M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARIGNAC Geneviève, Maître de conférences M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. BENSIGNOR Emmanuel, Professeur contractuel
<b>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE</b> M. AUDIGIE Fabrice, Professeur M. DENOIX Jean-Marie, Professeur Mme TRACHSEL Dagmar, Maître de conférences contractuel Mme DUPAYS Anne-Gaëlle, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier * Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences	<b>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE</b> M. FAYOLLE Pascal, Professeur M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur * M. NIEBAUER Gert, Professeur contractuel Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences
<b>- UNITE D'IMAGERIE MEDICALE</b> Mme BEDU-LEPERLIER Anne-Sophie, Maître de conférences contractuel Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier	<b>- UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE</b> Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences Mme MASSE-MOREL Gaëlle, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP)* M. MAUFFRE Vincent, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel, (rattaché au DPASP)
<b>- UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT</b> M. GRANDJEAN Dominique, Professeur * Mme YAGUIYAN-COLLIARD Laurence, Maître de conférences contractuel Mme CLERO Delphine, Maître de conférences contractuel	<b>- DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION</b> M. PARAGON Bernard, Professeur
<b>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE</b> Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences *	<b>- DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS</b> Mme ROUX Françoise, Maître de conférences

### **DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)**

**Chef du département : M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur**

<b>- DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES</b> M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences	<b>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR</b> M. ADJOU Karim, Professeur * M. BELBIS Guillaume, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel, M. HESKIA Bernard, Professeur contractuel M. MILLEMANN Yves, Professeur
<b>- UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE</b> M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences	<b>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE</b> M. ARNE Pascal, Maître de conférences* M. BOSSE Philippe, Professeur M. COURREAU Jean-François, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY-BARASSIN Isabelle, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Professeur
<b>- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES</b> M. BENET Jean-Jacques, Professeur Mme DUFOUR Barbara, Professeur* Mme HADDAD/HOANG-XUAN Nadia, Professeur Mme PRAUD Anne, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel	

### **DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)**

**Chef du département : Mme COMBRISSON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences**

<b>- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES</b> M. CHATEAU Henry, Maître de conférences* Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur Mme ROBERT Céline, Maître de conférences	<b>- UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE</b> M. BOULOIS Henri-Jean, Professeur Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* Mme LE ROUX Delphine, Maître de conférences stagiaire
<b>- DISCIPLINE : ANGLAIS</b> Mme CONAN Muriel, Professeur certifié	<b>- UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE</b> Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur M. PERROT Sébastien, Maître de conférences M. TISSIER Renaud, Maître de conférences*
<b>- UNITE DE BIOCHIMIE</b> M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences* M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences	<b>- UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE</b> Mme COMBRISSON Hélène, Professeur Mme PILOT-STORCK Fanny, Maître de conférences M. TIRET Laurent, Maître de conférences*
<b>- DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE</b> M. PHILIPS, Professeur certifié	<b>- UNITE DE VIROLOGIE</b> M. ELOIT Marc, Professeur Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences *
<b>- UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE</b> Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur*	<b>- DISCIPLINE : ETHOLOGIE</b> Mme GILBERT Caroline, Maître de conférences
<b>-UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE</b> Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences* M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur Mme LALOY Eve, Maître de conférences contractuel M. REYES GOMEZ Edouard, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel	<b>* responsable d'unité</b>



# **REMERCIEMENTS**

*Au Professeur de la faculté de Médecine de Créteil, qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse, hommage le plus respectueux*

*À monsieur Jean-Jacques Panthier, merci pour l'intelligence de nos échanges, votre réactivité, la pertinence de vos remarques et la confiance que vous m'avez accordée dans la conduite de cette thèse*

*À madame Fanny Pilot-Storck, qui m'a fait honneur d'être l'assesseur de ma thèse, merci pour vos judicieux conseils, votre positivité et votre sympathie*

*À ma mère, qui me manque et qui me donne la force de tracer mon propre chemin*

*À mon père, merci pour supporter mon mauvais caractère, merci pour ton soutien et ta présence*

*À mon frère, Pierre, même si la distance et les idées nous ont séparés, en nostalgie de nos souvenirs d'enfance partagés*

*À ma famille, Mam, Tara, Cathy, Yves, Audrey et Laure, merci pour vos personnalités singulières*

*À Dominique, merci pour ton écoute, ton aide et tes conseils avisés qui m'ont aidée à relativiser mes études et la vie*

*À mes amies chères : Camille, Julie, Audrey, Cécile, Juliette, merci d'être comme vous êtes*



# SOMMAIRE

Abréviations utilisées, quelques définitions utiles.....	7
Listes.....	11
Liste des Figures	
Listes des Tableaux	
<b>Introduction.....</b>	<b>13</b>
<b>I. Hypothèse sur les « cellules souches cancéreuses » : premières découvertes, résultats et débats.....</b>	<b>15</b>
<b>I.1. Les deux modèles principaux pouvant expliquer l'origine du cancer, observations et premières données historiques.....</b>	<b>16</b>
I.1.1. L'étude des tératocarcinomes spontanés et induits.....	18
I.1.1.1. Les tératomes et tératocarcinomes : définitions	
<i>I.1.1.1.1. Les tératomes</i>	
<i>I.1.1.1.2. Les tératocarcinomes</i>	
I.1.1.2. Les études expérimentales	
I.1.1.3. Résumé des premières données.....	19
I.1.2. L'hépatocarcinogenèse chimique.....	20
I.1.2.1. L'hépatocarcinome : conséquence d'une dédifférenciation des hépatocytes ? (années 1970)	
I.1.2.2. Evolution de l'analyse : relation entre l'alpha-foetoprotéine (AFP) et le Développement du cancer du foie (après les années 1980)	
<b>I.2. Poursuite des études : les preuves nées de l'étude des leucémies myéloïdes de l'Homme.....</b>	<b>22</b>
I.2.1. Les grands lignages cellulaires physiologiques du sang	
I.2.1.1. A la base de l'hématopoïèse physiologique : une cellule souche	
I.2.1.2. La cellule souche hématopoïétique donne naissance à plusieurs stades cellulaires : les cellules progénitrices	
I.2.2. Quelques données sur les leucémies myéloïdes.....	24
I.2.2.1. Les leucémies myéloïdes chroniques	
I.2.2.2. Les leucémies myéloïdes aiguës	
I.2.3. L'origine monoclonale du cancer	
I.2.3.1. Sujets et méthodes.....	25
I.2.3.2. Résultats et discussions	
<i>I.2.3.2.1. Résultats</i>	
<i>I.2.3.2.2. Discussion</i>	
I.2.4. Identité de la cellule à l'origine d'un cancer : une cellule souche	
<b>I.3. Approfondissement des études grâce au modèle animal.....</b>	<b>27</b>
I.3.1. Modèle animal utilisé pour les découvertes sur les cellules souches cancéreuses : les souris immunodéficientes ou qui développent spontanément des tumeurs	
I.3.1.1. Les caractéristiques de quelques souris immunodéficientes	
<i>I.3.1.1.1. Souris nude</i>	
<i>I.3.1.1.2. Souris Xid.....</i>	28
<i>I.3.1.1.3. Souris BNX</i>	
<i>I.3.1.1.4. Souris SCID (ou DICS)</i>	
I.3.1.2. Le choix du modèle des souris immunodéficientes .....	29

I.3.1.3. Les souris qui développent spontanément des tumeurs.....	30
I.3.2. L'utilisation des modèles animaux en pratique : données sur les capacités des cellules cancéreuses à proliférer <i>in vivo</i>	
I.3.2.1. Rappels et généralités	
I.3.2.2. Identification de la cellule souche leucémique <i>in vivo</i> : établissement du modèle hiérarchique	
<b>I.4. Des leucémies aux tumeurs solides.....</b>	<b>33</b>
I.4.1. Les tumeurs du sein chez la femme et les tumeurs mammaires chez les animaux	
I.4.1.1. Le cancer du sein a pour origine une cellule souche cancéreuse	
I.4.1.2. Les connaissances actuelles sur le cancer du sein.....	34
I.4.2. Identification de cellules souches cancéreuses dans d'autres tumeurs solides.....	35
I.4.2.1. Le cancer du cerveau	
I.4.2.2. Le cancer du pancréas	
I.4.2.3. Le cancer de la prostate.....	36
I.4.2.4. Le cancer de la peau	
I.4.2.5. Le cancer du côlon	
I.4.2.6. Les cancers de l'estomac et de l'intestin	
I.4.2.7. Le cancer du poumon	
I.4.2.8. Les cancers de la tête et du cou.....	37
I.4.2.9. Le cancer du foie	
I.4.3. Synthèse : tumeurs solides	
<b>I.5. Une hypothèse encore controversée.....</b>	<b>38</b>
I.5.1. Une hypothèse peu documentée	
I.5.2. Une théorie incomplète sur certains aspects.....	39
I.5.2.1. Démarche expérimentale	
I.5.2.1.1. Hypothèse	
I.5.2.1.2. Méthode, matériel et résultats	
I.5.2.2. Discussion	
<b>I.6. Conclusion de la première partie.....</b>	<b>40</b>
<b><u>II. Les caractéristiques de la cellule à l'origine du cancer.....</u></b>	<b>41</b>
<b>II.1. Des caractéristiques communes avec les cellules souches mais aussi des différences : premiers concepts</b>	
II.1.1. Qu'est ce qu'une cellule souche normale ?	
II.1.1.1. Définition et organisation de la hiérarchie cellulaire normale	
II.1.1.1.1. Définition	
II.1.1.1.2. La cellule souche, base d'une organisation hiérarchique	
II.1.1.1.3. Différents types de cellules souches.....	43
II.1.1.2. Caractéristiques principales de la cellule souche adulte	
II.1.1.3. Fonction, division et régulation	
II.1.1.3.1. Fonction	
II.1.1.3.2. Modes de division	
II.1.1.3.3. Régulation de la cellule souche.....	44
II.1.2. Une cellule responsable de la tumorigénérité : la cellule souche cancéreuse	
II.1.2.1. Des similitudes avec la cellule souche normale	
II.1.2.2. Les spécificités de la cellule souche cancéreuse.....	45
II.1.3. Comment obtient-on une cellule souche cancéreuse ?.....	46
II.1.3.1. Modèles reconnus en 2012	
II.1.3.1.1. Les tumeurs proviennent fréquemment de la transformation de cellules souches normales	
II.1.3.1.2. Des cancers peuvent être issus d'une cellule progénitrice au devenir restreint.....	47

II.1.3.1.3. Comment s'effectue la progression tumorale ?.....	48
II.1.3.1.4. Des voies de signalisation communes régulent l'auto-renouvellement des cellules souches normales et cancéreuses	
II.1.3.1.4.1. BMI-1	
II.1.3.1.4.2. Notch	
II.1.3.1.4.3. Wnt/ $\beta$ -caténine	
II.1.3.1.4.4. Sonic hedgehog	
II.1.3.1.4.5. Jun-B	
II.1.3.1.4.6. Exemples de voies impliquées dans la survie de cellules souches cancéreuses	
II.1.3.2. Conclusions sur les mécanismes cellulaires à l'origine de la tumeur.....	49
II.1.4. Estimation de la fréquence des cellules souches cancéreuses	
<b>II.2. Cellule et microenvironnement de proximité : la niche.....</b>	<b>50</b>
II.2.1. Identification de la niche	
II.2.1.1. Découvertes	
II.2.1.2. Définition	
II.2.1.3. La niche : composition et rôles	
II.2.1.3.1. Composition	
II.2.1.3.2. Rôles	
II.2.2. Une niche pour les cellules souches cancéreuses.....	51
II.2.2.1. Le postulat	
II.2.2.2. Une réalité	
II.2.2.3. La niche des cellules souches cancéreuses : l'importance de l'hypoxie	
II.2.2.4. La niche responsable de la plasticité fonctionnelle des cellules souches.....	52
II.2.2.5. Modèles proposés d'interaction entre la cellule souche cancéreuse et son environnement	
<b>II.3. Isolement des cellules souches normales et cancéreuses.....</b>	<b>53</b>
II.3.1. La méthode <i>Side Population</i> (SP)	
II.3.1.1. Définition	
II.3.1.2. Technique d'isolement des SPs	
II.3.1.3. Limites de l'identification des cellules souches par le Hoechst 33342.....	54
II.3.1.4. Un exemple : isolement d'une SP dans le cancer du sein	
II.3.1.5. Méthode SP : bilan	
II.3.2. La méthode des marqueurs membranaires caractéristiques : utilisation du phénotype des cellules souches.....	55
II.3.2.1. Quelques marqueurs caractéristiques de la surface cellulaire	
II.3.2.2. Exemple d'un marqueur de surface caractéristique commun en médecine humaine au service de la médecine vétérinaire.....	57
II.3.2.2.1. Méthode	
II.3.2.2.2. Résultats	
II.3.2.2.3. Conclusion	
<b>II.4. Conclusion de la deuxième partie.....</b>	<b>58</b>

### III. Implications du concept des cellules souches cancéreuses : vers des

<b>thérapeutiques plus efficaces.....</b>	<b>59</b>
<b>III.1. Cellules souches et conséquences thérapeutiques</b>	
III.1.1. Cellules souches cancéreuses et potentiel métastatique	
III.1.2. Cellules souches cancéreuses et récidive tumorale	
III.1.3. Cellules souches et traitements usuels.....	60
III.1.3.1. La chirurgie : un traitement palliatif	
<i>III.1.3.1.1. Un traitement initial important</i>	
<i>III.1.3.1.2. Un traitement aux effets limités.....</i>	61
III.1.3.2. Cellules souches cancéreuses et thérapies	
<i>III.1.3.2.1. Chimiothérapie : effets et limites</i>	
<i>III.1.3.2.2. Cellules souches cancéreuses et radiothérapie</i>	
III.1.3.2.2.1. Impact de la radiothérapie sur les cellules souches cancéreuses.....	62
III.1.3.2.2.1.1. Deux expériences fondatrices	
III.1.3.2.2.1.2. Deux expériences fondatrices : bilan	
III.1.3.2.2.2. Généralisation.....	63
III.1.3.3. Pourquoi des cellules souches cancéreuses sont-elles résistantes aux traitements communs ?	
<i>III.1.3.3.1. Modalités de la division cellulaire</i>	
<i>III.1.3.3.2. Une capacité d'entrer en quiescence</i>	
<i>III.1.3.3.3. L'expression exacerbée de pompes à efflux</i>	
<i>III.1.3.3.4. Des capacités supérieures de réparation des lésions de l'ADN.....</i>	64
III.1.4. Conclusions sur les conséquences thérapeutiques des cellules souches cancéreuses	
<b>III.2. Cibler les cellules souches cancéreuses.....</b>	<b>65</b>
III.2.1. Qu'est ce que la thérapie ciblée ?	
III.2.1.1. Définitions	
III.2.1.2. Notion de cible idéale	
III.2.1.3. Avantages et inconvénients de la thérapie ciblée en cancérologie des cellules souches.....	66
<i>III.2.1.3.1. Critères déterminants dans l'identification de thérapeutique ciblée</i>	
<i>III.2.1.3.2. Difficultés des thérapies ciblées</i>	
III.2.1.4. Garantir la cible pertinente	
III.2.1.5. Extraposition.....	67
III.2.2. Deux méthodes directes pour cibler les cellules souches cancéreuses.....	68
III.2.2.1. Thérapie de différenciation	
III.2.2.2. Thérapie d'élimination et de prévention	
III.2.3. Cibler quoi ? .....	69
III.2.3.1. Cibler un marqueur.....	70
<i>III.2.3.1.1. La plus logique</i>	
<i>III.2.3.1.2. La plus difficile</i>	
III.2.3.2. Cibler des éléments des voies de signalisation	
III.2.3.3. Cibler les populations SP.....	71
III.2.3.4. Cibler la niche des cellules souches cancéreuses	
<i>III.2.3.4.1. Généralités</i>	
<i>III.2.3.4.2. Exemple : inhiber l'activité du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), importante pour le maintien de l'intégrité de la niche.....</i>	72
III.2.4. Conclusion de la thérapie ciblée	
<b>III.3. Les télomérases, biomarqueurs de détection, de pronostic et d'évaluation de l'efficacité thérapeutique.....</b>	<b>73</b>
III.3.1. Biomarqueurs : définition et intérêts	
III.3.2. Les télomères et la télomérase	

<b>III.4. Questions sans réponse.....</b>	<b>74</b>
III.4.1. Lien Médecine humaine/Médecine vétérinaire.....	75
III.4.1.1. L'animal, modèle d'intérêt limité pour une connaissance de la biologie de l'Homme	
III.4.1.2. Les CSC : des implications similaires pour l'Homme et l'Animal	
III.4.2. Les questions auxquelles il faudra répondre à l'avenir	
III.4.2.1. Concernant la théorie elle-même	
III.4.2.2. Concernant les thérapeutiques.....	76
<b>Conclusion.....</b>	<b>77</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>79</b>



# ABRÉVIATIONS UTILISÉES

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABL	<i>Abelson murine leukemia</i>
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFP	Alpha-foetoprotéine
ALDH	Aldéhyde Déshydrogénase
ATRA	All-trans retinoic acid
Ba	Granulocytes basophiles
BCR	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BMI	Gène du groupe Polycomb, intervenant dans la biologie des cellules souches : <i>Polycomb ring finger oncogene</i>
Btk	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
CA-4-P	Combretastatin A-4 phosphate
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFU	<i>Colony forming unit</i>
CLP	Progéniteur lymphoïde commun
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMP	Progéniteur myéloïde commun
CS	Cellule Souche
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
CSF	<i>Colony Stimulating Factor</i>
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CSN	Cellule Souche Normale
DC	Cellule Dendritique
DEN	DiEthylNitrosamine
DICS = SCID	Syndrome d'Immunodéficience Combinée Sévère
DMXAA	Acide-4-acétique 5,6 diméthylxanthenone
EC	Carcinome Embryonnaire
ECC	Cellules de Carcinome Embryonnaire ou <i>embryonic carcinoma cells</i>
Eo	Granulocyte éosinophile
EP	Progéniteur érythroïde
EPO	Erythropoïétine
ESA	<i>Anti-epithelial-Specific Antigen</i> = Antigène spécifique anti-épithélium
FACS	<i>Flow Activated Cell Sorter</i>
GIST	Tumeur stromale gastrentestinale
GM	Granulocytes/monocytes (macrophages)
GN	Granulocyte neutrophile
G-P6-PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GR	Globule rouge
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i>
IL	Interleukine
LAM	Leucémie myéloïde aiguë
LB	Lymphocyte B
Lin	Lignage
LMC	Leucémie myéloïde chronique

LSC	<i>Leukemic Stem Cell</i>
LT	<i>Lymphocyte T</i>
MC	<i>Mastocytes</i>
MCi	<i>Mastocytes immatures</i>
MDR	<i>Multiple Drug Resistance</i>
ME	<i>Mégacaryocytes/Erythrocytes</i>
Melk	<i>Maternal embryonic leucine zipper kinase</i>
Mo	<i>Monocyte</i>
MP	<i>Macrophages</i>
Msi	<i>Musachi</i>
NK	<i>Cellule Natural Killer</i>
NOD	<i>Non Obese Diabetic</i>
nu	<i>nude</i>
P ou Pro	<i>Progéniteur</i>
PI	<i>Phosphatidylinositol</i>
PML	<i>Promyelocytic leukemia</i>
PSP	<i>Phosphoséristine phosphatase</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SCID = DICS	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SL-IC	<i>Leukemia-initiating cell</i>
SP	<i>Side Population</i>
t	<i>translocation</i>
Thy	Glycoprotéine appartenant à la super-famille des immunoglobulines et fortement exprimée à la surface des thymocytes murins
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Xid	<i>X-linked immunodeficiency</i>

# QUELQUES DÉFINITIONS UTILES

**Activité constitutive :** Ce terme désigne l'activité d'un récepteur qui est indépendante de la liaison de ce récepteur à son ligand (c'est-à-dire que le récepteur est sans cesse activé même en l'absence de ligand).

**Allogreffe :** Opération chirurgicale consistant à transférer sur un individu des parties prélevées d'un autre individu de la même espèce.

**Angiogenèse :** Processus décrivant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants. Il s'agit d'un processus physiologique normal notamment lors du développement embryonnaire ; c'est aussi un processus important dans la croissance des cancers.

**Cellules NK :** Les cellules *Natural Killer* (NK) sont de grands lymphocytes possédant des granulations spécifiques qui interviennent dans la destruction directe de cellules cibles. Les cellules NK sont des cellules cytotoxiques spécialisées dans la lyse des cellules tumorales ou infectées par un virus.

**CFU (*Colony forming unit*) :** Ce terme désigne des progéniteurs clonogéniques. Les CFU-Eo sont les précurseurs des granulocytes éosinophiles.

**CMH :** Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est un haplotype composé de gènes qui s'expriment à la surface des cellules et est responsable de l'histocompatibilité des greffes.

**Cytométrie en flux :** Dispositif permettant de trier les cellules en fonction de l'expression différentielle de marqueurs membranaires. C'est aussi une méthode de numération.

**Hépatocarcinogène :** Il s'agit d'un élément qui promeut le développement d'une tumeur hépatique.

**Locus :** Un locus est, selon Morgan, Muller, Bridges et Sturtevant, une position d'un gène sur un chromosome (au sens de position physique).

**Lysosomes :** Organites intracellulaires de moins d'un micron présents dans le cytosol de toutes les cellules eucaryotes animales, à l'exception des hématies. Ils ont une fonction de digestion essentiellement d'organites intracellulaires.

**Niche :** Microenvironnement anatomique où sont localisées les cellules souches.

**Pluripotence :** Une cellule pluripotente est capable de donner naissance à tous les types cellulaires des trois feuillets de l'embryon (ectoderme, mésoderme, endoderme), mais pas à certaines annexes de l'embryon alors qu'une cellule totipotente en est capable.

**Proto-oncogène :** Gène cellulaire susceptible de devenir, après activation, un oncogène et, à ce titre de participer au processus de transformation maligne.

**Progéniteur** (ou cellule progénitrice) : Cellule capable de se différencier en un (ou plusieurs) type(s) cellulaire(s) mais incapable d'autorenouvellement contrairement à la cellule souche.

**Xénogreffe :** Greffe entre deux individus, un donneur et un receveur, qui appartiennent à deux espèces différentes.



# LISTES

## Liste des Figures

- Figure 1** : Représentation des deux modèles pouvant expliquer l'hétérogénéité tumorale (d'après CATALANO *et al.*, 2011)
- Figure 2** : Modèle hiérarchique des tératocarcinomes selon SELL (2010)
- Figure 3** : Evolution des concentrations d'AFP sérique et changements cellulaires au cours d'une exposition prolongée à un carcinogène, le diéthylnitrosamine (DEN), (à partir de SELL et DUNSFORD, 1989)
- Figure 4** : Schéma général de l'hématopoïèse
- Figure 5** : Etape affectée chez les souris SCID/DICS
- Figure 6** : Modèle proposé par BONNET et DICK (1997) comparant la cellule souche normale et la cellule souche leucémique
- Figure 7** : Modèle hiérarchique du cancer dans les leucémies établi par SELL (2010) à partir du postulat de Pierce
- Figure 8** : Modèle hiérarchique du cancer du sein chez la femme et des tumeur mammaires chez l'animal : différenciation de l'épithélium mammaire normal et tumoral (GINESTIER *et al.*, 2007)
- Figure 9** : Evolution de la théorie de l'origine du cancer en fonction des découvertes scientifiques
- Figure 10** : Le concept de cellule souche
- Figure 11** : Modèle de l'hématopoïèse : un système hiérarchique
- Figure 12** : Les deux modes de division des cellules souches
- Figure 13** : Les 7 éléments-clés de l'oncogenèse selon HANABAN et WEINBERG (2000)
- Figure 14** : Exemple des leucémies : transformation de la cellule souche hématopoïétique en cellule souche leucémique (JORDAN, 2004)
- Figure 15** : Origine et caractéristiques de la cellule souche cancéreuse
- Figure 16** : L'hypothèse de la cellule souche cancéreuse face aux thérapies (GINESTIER *et al.*, 2007)
- Figure 17** : La thérapie ciblée
- Figure 18** : Exemples de cibles thérapeutiques potentielles en tenant compte de l'hypothèse des cellules souches cancéreuses dans le cas d'une leucémie promyélocyttaire
- Figure 19** : Illustration de l'activité de la télomérase en relation avec la croissance cellulaire et l'âge (d'après PANG et ARGYLE, 2010)

## Liste des Tableaux

- Tableau 1** : Hétérogénéité des tumeurs : caractéristiques des deux modèles proposés
- Tableau 2** : Pourcentage des enzymes A et B sur huit patientes leucémiques (FIALKOW, 1977)
- Tableau 3** : Marqueurs découverts dans certains cancers



# INTRODUCTION

Selon la définition de l'Organisation mondiale de la santé, le cancer est un terme général appliqué à un grand groupe de maladies qui peut toucher n'importe quelle partie de l'organisme. L'une de ses caractéristiques est la prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent essaimer dans d'autres organes, formant ce qu'on appelle les métastases.

Tout le monde a déjà entendu parler du cancer et sait que celui-ci peut frapper n'importe qui, à n'importe quel moment. Le cancer est un véritable fléau, fréquent en médecine humaine et vétérinaire. Il constitue un enjeu de santé publique considérable d'autant plus que son incidence augmente au cours de ces dernières décennies.

Un cancer se développe chez plus d'une personne sur trois. Il est responsable de la mort de plus d'une personne sur cinq, ce qui à titre d'exemple représente environ 200 000 personnes par an en France.

En médecine vétérinaire, le cancer est très fréquent et cause la perte d'un nombre conséquent de nos animaux domestiques (tumeur mammaire métastasant chez les femelles, fibrosarcome chez le chat, mélanome, mastocytome, lymphome, *etc.*).

Si la détection, la prévention et les thérapeutiques évoluent et sont de plus en plus efficaces, la connaissance des mécanismes impliqués dans son origine et sa formation est encore limitée.

En ce qui concerne l'origine du cancer, de multiples théories existent. Une nouvelle théorie qui propose l'existence de cellules souches cancéreuses ou initiatrices de tumeur prime et commence à faire l'unanimité au sein de la communauté scientifique. Cette théorie a été établie sur la base de recherches sur des tumeurs de l'Homme. Ces recherches reposent sur l'utilisation de xénogreffes sur des animaux modèles. L'hypothèse est encore récente. Elle sera modifiée et complétée. Néanmoins, les expériences séminales à son origine resteront inchangées.

Cette thématique se nourrit d'une approche multidisciplinaire impliquant des disciplines variées comme la cancérologie, la médecine, l'immunologie, la biochimie, la biologie moléculaire, la biologie du développement, et la pharmacologie.

Nous chercherons à synthétiser les réponses aux questions suivantes : *Quelle cellule est à l'origine du cancer ? Quelles sont ses propriétés ? Quelles sont les implications des réponses à ces deux questions ?*

Nous commencerons par présenter les expériences qui ont dévoilé l'identité d'une cellule initiatrice de cancer en suivant la chronologie historique et en insistant sur le volet expérimental. Puis, nous détaillerons les caractéristiques des cellules initiatrices de cancer. Enfin, nous envisagerons les implications et les perspectives thérapeutiques de ces nouvelles connaissances.

Une part de discussion est introduite tout au long du document afin d'enrichir notre réflexion sur un sujet qui promet encore des révolutions.



# I. Hypothèse sur les « cellules souches cancéreuses » : premières découvertes, résultats et débats

Depuis plusieurs siècles, les hommes se sont attachés à rechercher l'origine du cancer ; vers 400 avant Jésus Christ, Hippocrate parle de « carcinos » pour décrire la maladie, terme traduit peu après en mot « cancer » par un médecin romain, Celsus.

Dans la Grèce ancienne, on croyait que le cancer était dû à un déséquilibre des humeurs en particulier un excès de bile noire. Cette hypothèse fut maintenue pendant plus de 2.000 ans et au vingtième siècle encore, diverses théories reposent sur cette idée.

La première mention en faveur de l'existence de cellules souches cancéreuses date du 19<sup>ème</sup> siècle (RECAMIER, 1829 ; REMAK, 1854).

Dans les années suivantes, peu d'intérêt sera porté aux recherches sur le cancer étant donné l'urgence des problèmes causés par les maladies infectieuses (le typhus, la peste, la grippe de 1918-1919 ne sont que des exemples). Il faut attendre presque cinquante ans pour que le sujet devienne d'actualité au travers d'études sur les tératocarcinomes et les carcinomes hépatocellulaires.

En 1994, à la suite de recherches sur des leucémies, l'hypothèse selon laquelle « les cancers proviennent de la maturation de cellules souches et qu'ils sont auto-alimentés par une petite fraction de cellules ayant les caractéristiques de cellules souches » prend toute son ampleur (LAPIDOT *et al.*, 1994).

De nombreuses découvertes sur les tumeurs solides, essentiellement après 2000, renforcent cette hypothèse. Néanmoins, des interrogations persistent et les détracteurs du modèle des cellules souches cancéreuses tendent à se positionner sur une version différente de la (ou des) cellule(s) initiatrice(s) de cancer.

*Cette partie présente l'évolution des connaissances acquises depuis le début du vingtième siècle sur les cellules initiatrices de cancer, de l'élaboration du concept, en passant par la découverte capitale en 1994 (LAPIDOT *et al.*, 1994), à la généralisation de la théorie aux tumeurs solides.*

*Nous suivrons une démarche scientifique logique : questions, hypothèses, expériences puis résultats. Nous ne retiendrons que l'essentiel des expériences.*

*Nous insisterons sur le rôle-clé que le modèle murin a joué dans les découvertes. Enfin, nous évoquerons, les débats actuels sur les cellules souches et les questions encore sans réponse.*

## I.1. Les deux modèles principaux pouvant expliquer l'origine du cancer, observations et premières données historiques

Une tumeur est un tissu très hétérogène. Son développement peut être vu comme une version aberrante d'un tissu normal.

Deux modèles conceptuels de l'origine et de la progression tumorales ont été proposés pour rendre compte de cette hétérogénéité (GRIMWADE et ENVER, 2004) :

Dans le plus ancien, le **modèle stochastique**, toutes les cellules tumorales ont une capacité proliférative élevée ; les cellules tumorales prolifèrent suite à l'âge, à des apports en nutriments ou en oxygène. N'importe quelle cellule du tissu, même différenciée, peut donc, à la suite de mutations acquises de façon aléatoire, proliférer de façon indéfinie et former un clone tumoral indépendant.

Selon ce modèle, l'hétérogénéité tumorale résulte donc de mutations aléatoires et d'une sélection clonale ultérieure. L'hétérogénéité tumorale est attribuée, non seulement à la différenciation, mais aussi à des variations génétiques et épigénétiques intracloniales (facteurs intrinsèques) ainsi qu'à de multiples influences du microenvironnement (facteurs extrinsèques).

La modélisation stochastique explique aussi comment des cellules matures peuvent se dé-différencier en fonction d'un environnement adéquat et de facteurs plus ou moins favorables (importance du « terrain »).

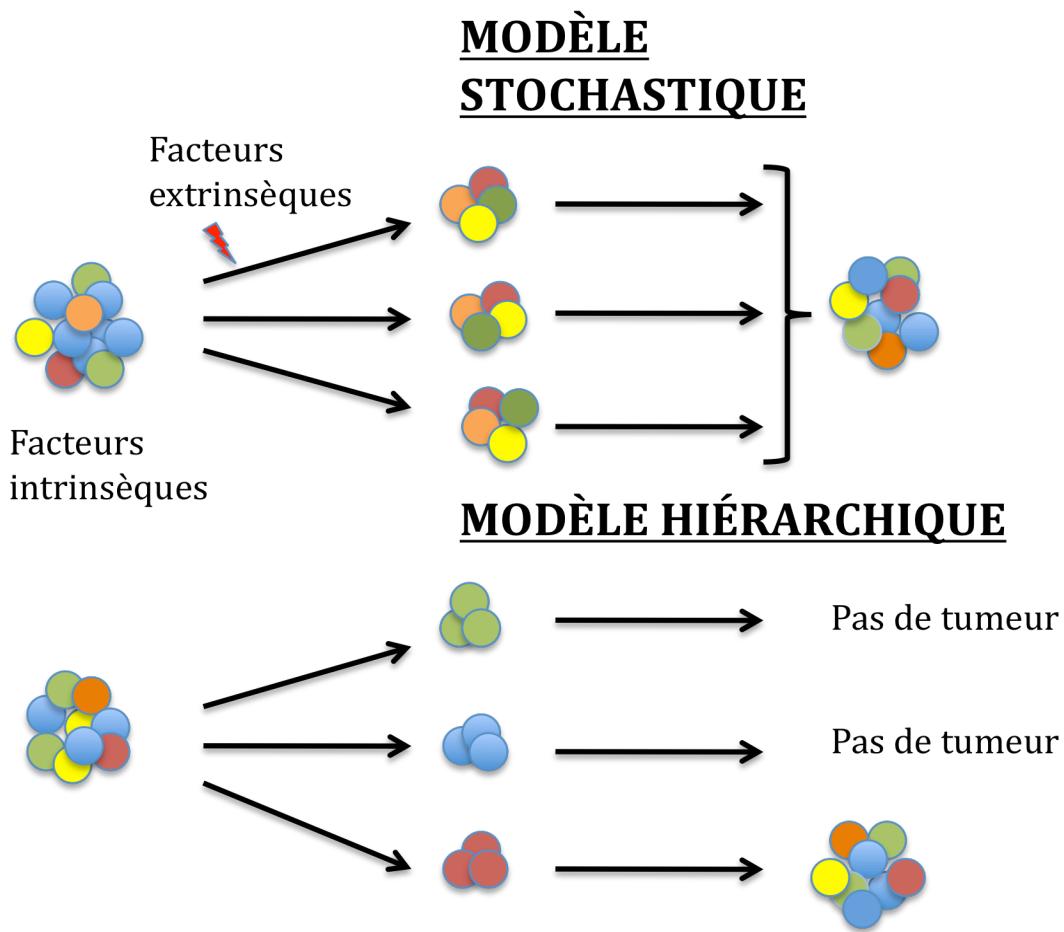
Le second modèle est le **modèle hiérarchique**, encore appelé « **l'hypothèse des cellules souches cancéreuses** » selon lequel le cancer provient de la transformation d'une petite fraction de la population tumorale, composée de cellules souches cancéreuses. Selon ce second modèle, une cellule initiatrice de cancer est le moteur de l'activité tumorigène du cancer qui se développe de manière organisée. La cellule initiatrice de cancer présente toutes les caractéristiques d'une cellule souche. Dans ce cas, la petite population cellulaire de cellules souches cancéreuses est suffisante pour initier et développer une tumeur. L'hétérogénéité tumorale résulte d'un arrêt de différenciation des cellules à différents stades.

Le microenvironnement direct de la cellule peut intervenir dans l'évolution.

La Figure 1 concrétise les deux modèles hypothétiques envisagés de la transformation maligne.

**Figure 1 :** Représentation des deux modèles pouvant expliquer l'hétérogénéité tumorale (d'après CATALANO *et al.*, 2011)

Dans le modèle stochastique, chaque cellule a une capacité élevée de prolifération tumorale. Dans le modèle hiérarchique, seulement une sous-population est capable de créer une tumeur ; ce sont les cellules souches cancéreuses (en rouge).



Le Tableau 1 résume les principales caractéristiques de chaque modèle.

**Tableau 1 :** Hétérogénéité des tumeurs : caractéristiques des deux modèles proposés

	<b>Modèle STOCHASTIQUE</b>	<b>Modèle HIÉRARCHIQUE</b>
Origine du cancer	Chaque cellule a une probabilité équivalente mais faible d'entrer dans la phase S du cycle cellulaire et de former une tumeur	Une rare population de cellules souches cancéreuses est initiatrice de cancer
Rechutes	La rechute est due à la croissance de cellules résiduelles (chaque cellule est à risque)	La rechute provient de la persistance de la cellule souche cancéreuse (plus d'informations dans la partie III)
Mécanismes tumorigènes	Mécanismes tumorigènes présents dans chaque cellule	Mécanismes tumorigènes présents uniquement dans les cellules souches cancéreuses

*La question a longtemps été de savoir laquelle des deux hypothèses semblait la plus plausible pour expliquer l'origine du cancer. La priorité de cette partie est de revenir sur les expériences fondatrices qui ont permis d'y répondre.*

### I.1.1. L'étude des tératocarcinomes spontanés et induits

Les tératocarcinomes sont les premiers modèles qui ont fourni une partie de la réponse.

#### I.1.1.1. Les tératomes et tératocarcinomes : définitions

Les tératomes et les tératocarcinomes sont respectivement des tumeurs bénignes et malignes des cellules germinales.

##### I.1.1.1.1. Les tératomes

Les tératomes sont des tumeurs bénignes des cellules germinales qui affectent le plus souvent les gonades mais peuvent occasionnellement se retrouver en position extragonadique, le plus souvent dans le médiastin antérieur ou au niveau du rétropéritoine.

Histologiquement, ces tumeurs sont formées de plusieurs tissus qui n'appartiennent pas à la lignée germinale, des tissus somatiques.

Les éléments représentatifs appartiennent aux trois feuillets embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme (DAMJANOV, 2005).

##### I.1.1.1.2. Les tératocarcinomes

Les tératocarcinomes sont des tumeurs malignes des cellules germinales composés de tissus somatiques similaires aux tératomes.

Actuellement, les anatomo-pathologistes reconnaissent que la plupart des tératocarcinomes sont faits d'un mélange de composants fœtaux, de tissus adultes et de tissus différenciés, un peu comme les composants du sac vitellin et du placenta (SELL, 2010).

*Les tératomes et les tératocarcinomes ont été les premiers cancers pour lesquels on a pensé qu'ils étaient dérivés de cellules souches.*

#### I.1.1.2. Les études expérimentales

En 1967, Leroy STEVENS a transplanté des cellules primordiales germinales provenant des crêtes génitales d'embryons mâles de la lignée consanguine de souris 129/Sv dans les testicules normaux d'adultes 129/Sv. Les cellules souches germinales ont formé un tératocarcinome au site de transplantation. Ainsi, des cellules souches germinales créaient des tumeurs lorsqu'elles étaient transplantées dans des testicules normaux de souris adultes (SELL, 2010).

STEVENS a également décrit plusieurs tératocarcinomes spontanés dans les testicules de souris 129/Sv à partir desquels il a isolé des cellules de carcinome embryonnaire (cellules EC) à partir desquelles il pouvait former une nouvelle tumeur testiculaire. Ces cellules EC furent cultivées par MARTIN et EVANS (1975).

Ces cellules sont nommées « cellules de carcinome embryonnaire » (ou ECC pour *embryonic carcinoma cells*) pour différentes raisons :

1. Ce sont des cellules souches de tumeurs malignes, qui tuent l'hôte et peuvent être transplantées en série d'une souris à l'autre et être propagées ainsi indéfiniment,
2. Elles prolifèrent en culture et ne montrent pas de signes d'inhibition de contact.

L'existence de cellules EC a été confirmée par la suite (DAMJANOV, 2005).

MINTZ et ILLMANSEE (1975) ont cherché à caractériser les cellules EC et en particulier à connaître leurs potentialités. Ils ont injecté des cellules de tératocarcinomes dans des blastocystes normaux. Des souris chimères adultes sont nées de ces expériences, ce qui indique que les cellules EC ont participé au développement embryonnaire. De plus, les cellules EC ont aussi contribué à former la lignée germinale (et les annexes embryonnaires) des chimères, ce qui montre que les cellules EC injectées dans le blastocyste sont totipotentes et doivent être considérées comme des cellules souches embryonnaires. PAPAIONNOU *et al.* (1975) ont réalisé indépendamment le même type d'expériences et ont publié les mêmes conclusions.

### I.1.1.3. Résumé des premières données

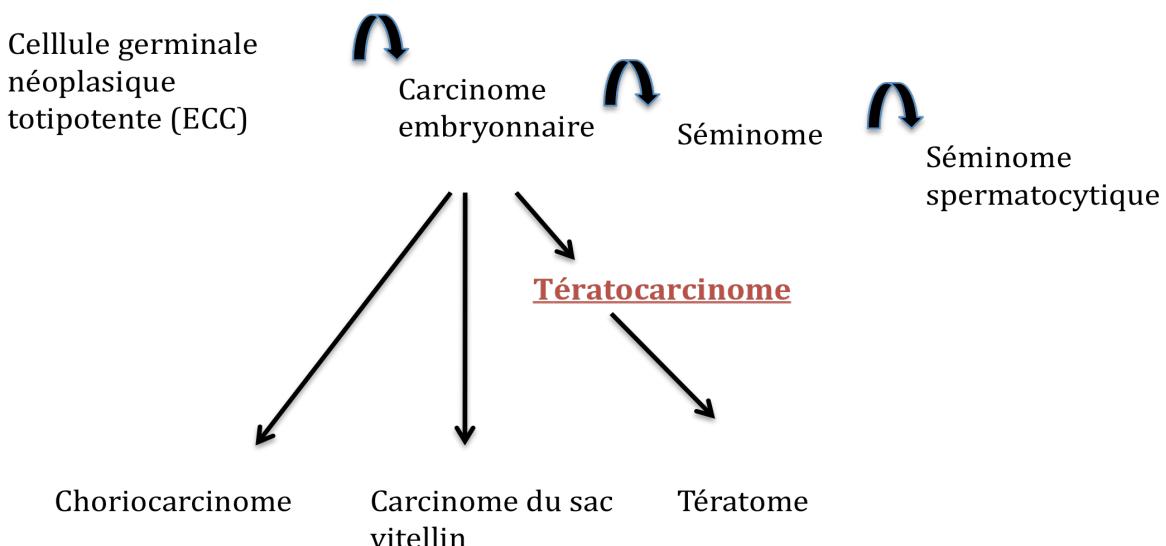
L'étude des tératocarcinomes induits et spontanés de la Souris a permis d'assembler les données nécessaires pour une analyse détaillée des tératocarcinomes humains.

SELL *et al.* (1994) a proposé un modèle hiérarchique des tératocarcinomes afin d'expliquer le rôle des cellules souches embryonnaires dans le développement des tératocarcinomes.

Selon celui-ci, les cellules souches prolifèrent pour donner naissance à des cellules cancéreuses plus ou moins différenciées. La Figure 2 présente ce modèle.

**Figure 2 :** Modèle hiérarchique des tératocarcinomes selon SELL (2010)

Selon ce modèle, une cellule germinale totipotente est à l'origine du développement d'un cancer. Selon le stade de différenciation de la cellule germinale, on observe un carcinome embryonnaire, un séminome, un séminome spermatocytique, ou un tératocarcinome. Une même cellule souche cancéreuse est à l'origine de ces différents types de tumeurs. Le tératocarcinome résulte d'un arrêt très précoce de la différenciation.



Dans les années 1970, les principes érigéant une théorie des cellules souches cancéreuses étaient clairement établis grâce à l'étude des tératocarcinomes (DAMJANOV, SOLTER, 1976).

Pourtant, le tératocarcinome fut considéré comme une exception et non comme la règle générale. De nombreux scientifiques soulignèrent la limite d'études utilisant des cellules souches de la seule lignée germinale.

## I.1.2. l'hépatocarcinogenèse chimique

Parallèlement, dans les années 1980, des études de carcinogenèse chimique sur le foie ont suggéré un autre modèle pour expliquer l'origine des hépatocarcinomes : la dédifférenciation de cellules matures (ou modèle stochastique).

### I.1.2.1. L'hépatocarcinome : conséquence d'une dédifférenciation des hépatocytes ? (années 1970)

L'hépatocarcinome est une tumeur maligne des hépatocytes ou cellules du foie. Il est possible d'induire expérimentalement un hépatocarcinome sur des animaux de laboratoire en les soumettant à un hépatocarcinogène, par exemple, de nature chimique. On parle d'hépatocarcinogenèse chimique.

Il est aisément de suivre la progression de la tumeur (Figure 3). Les carcinomes hépatiques sont en effet précédés d'une série de changements histologiquement pathologiques. Quelques hépatocytes montrent tout d'abord des changements de morphologie : ils forment des foyers. Lorsque l'exposition des modèles animaux au carcinogène est poursuivie, des nodules se forment ce qui déforme peu à peu le foie. Ces nodules ont été décrits comme des nodules hyperplasiques, pré-tumoraux et tumoraux (SELL et PIERCE, 1994). Finalement, les carcinomes hépatocellulaires apparaissent habituellement au sein même des nodules.

La plupart de ces nodules vont disparaître lorsque l'exposition au carcinogène cesse, mais certains ne régressent pas.

**La connaissance de cette suite d'événements a mené à la conclusion que le cancer du foie provenait de la dédifférenciation d'hépatocytes déjà matures. Cette interprétation a longtemps été considérée comme valide faisant perdre tout intérêt au modèle des cellules souches cancéreuses.**

### I.1.2.2. Evolution de l'analyse : relation entre l'alpha-foetoprotéine (AFP) et le développement du cancer du foie (après les années 1980)

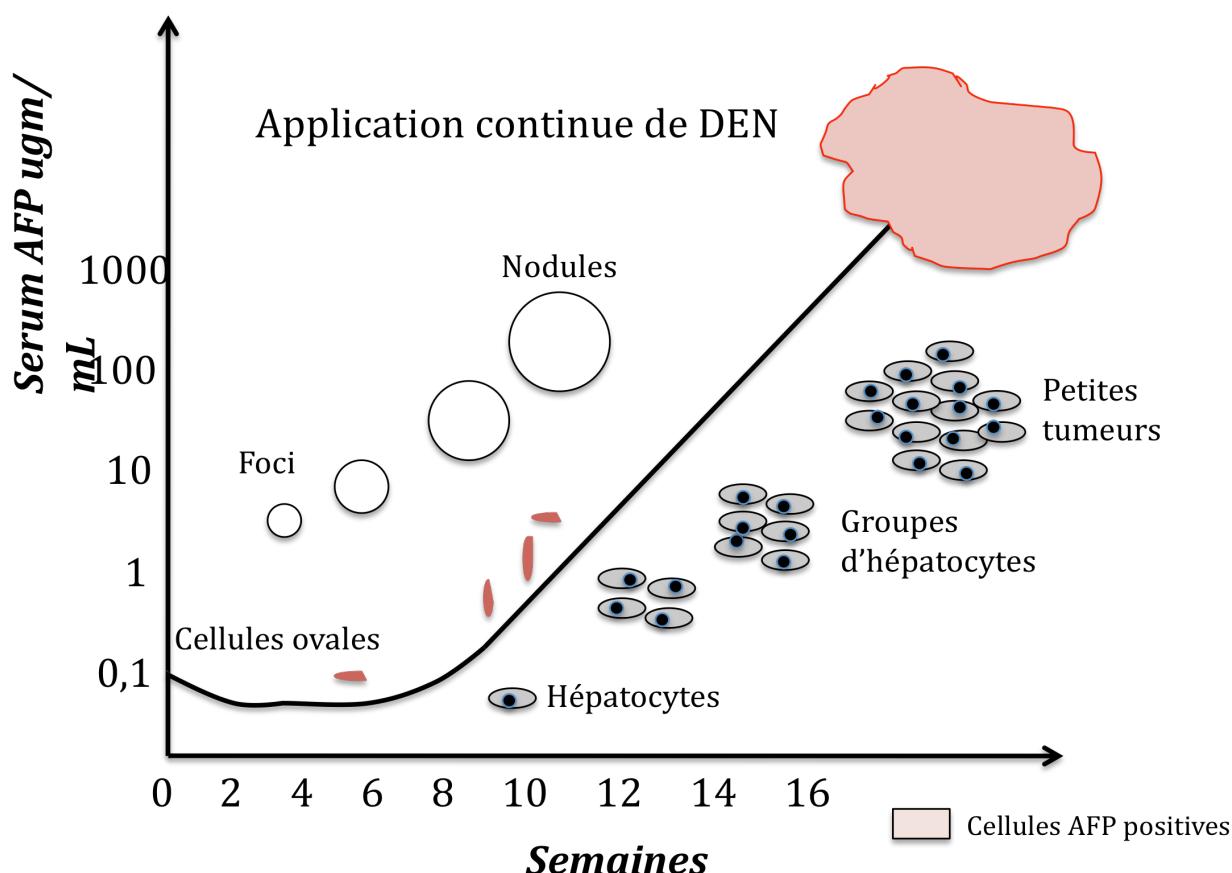
Après les années 1980, l'analyse de la production de l'alpha-foetoprotéine (AFP), un marqueur de développement oncogénique, a été effectuée (SELL, 2010). Cette analyse a conduit à nuancer les premières conclusions sur l'origine du cancer du foie qui reposaient sur un examen histologique.

L'AFP est une protéine découverte par ABELEV (1971). Celui-ci remarqua que l'AFP est présente en très forte concentration dans le sérum des animaux nouveau-nés ; sa production cesse normalement 3 à 5 semaines après la naissance chez le rat. Cependant, il nota aussi que la concentration d'AFP augmente de manière significative lors du développement d'une tumeur hépatique (Figure 3). Puisque l'AFP est fortement produite dans le foie foetal et les foies cancéreux, elle est un marqueur pertinent du développement tumoral précoce chez l'adulte.

L'AFP est exprimée par de petites cellules de la région périportale du foie (cellules ovales notamment) et, à un stade plus tardif, son expression est observée dans les lobules hépatiques, les travées hépatocytaires et les zones adénomateuses du foie. De plus, la concentration d'AFP sérique augmente bien avant la formation des nodules ce qui indique que ce ne sont pas les éléments précurseurs de l'hépatocarcinome.

**Figure 3 :** Évolution des concentrations d'alpha-foetoprotéine (AFP) sérique et changements cellulaires au cours d'une exposition prolongée à un carcinogène, le diéthylnitrosamine (DEN) (à partir de SELL et DUNSFORD, 1989)

La concentration d'AFP sérique augmente dès la 5<sup>ème</sup> semaine au moment de l'apparition des hépatocytes exprimant l'AFP. Ces hépatocytes sont principalement situés au niveau des aires périportales et non au sein des foyers d'hépatocytes ou des nodules. Peu de cellules ovales sont présentes (les cellules ovales sont capables de régénérer les hépatocytes). Le nombre d'hépatocytes AFP-positifs augmente chaque semaine. Les tumeurs dérivées des hépatocytes sont toutes AFP-positives. Les cellules ovales sont potentiellement les cellules souches cancéreuses.



Ces observations remettent en cause la validité de l'hypothèse de dédifférenciation des hépatocytes comme mécanisme à l'origine du cancer du foie et établi dans les années 1970.

## I.2. Poursuite des études : les preuves nées de l'étude des leucémies myéloïdes de l'Homme

L'étude des leucémies myéloïdes a été déterminante dans la discrimination des deux modèles. Nous présentons en premier lieu les lignages cellulaires sanguins physiologiques afin d'expliquer les dysfonctionnements observés au sein des leucémies myéloïdes dans un second temps.

Cet exemple a mis à l'honneur la théorie des cellules souches, maintenant reconnue dans de nombreuses tumeurs.

### I.2.1. Les grands lignages cellulaires physiologiques du sang

#### I.2.1.1. A la base de l'hématopoïèse physiologique : une cellule souche

L'hématopoïèse est un processus physiologique fondamental : il permet la naissance et le renouvellement permanent des cellules sanguines et des cellules de l'immunité. Son site principal est la moelle osseuse hématopoïétique. Une cellule souche est à la base du mécanisme : la cellule souche hématopoïétique.

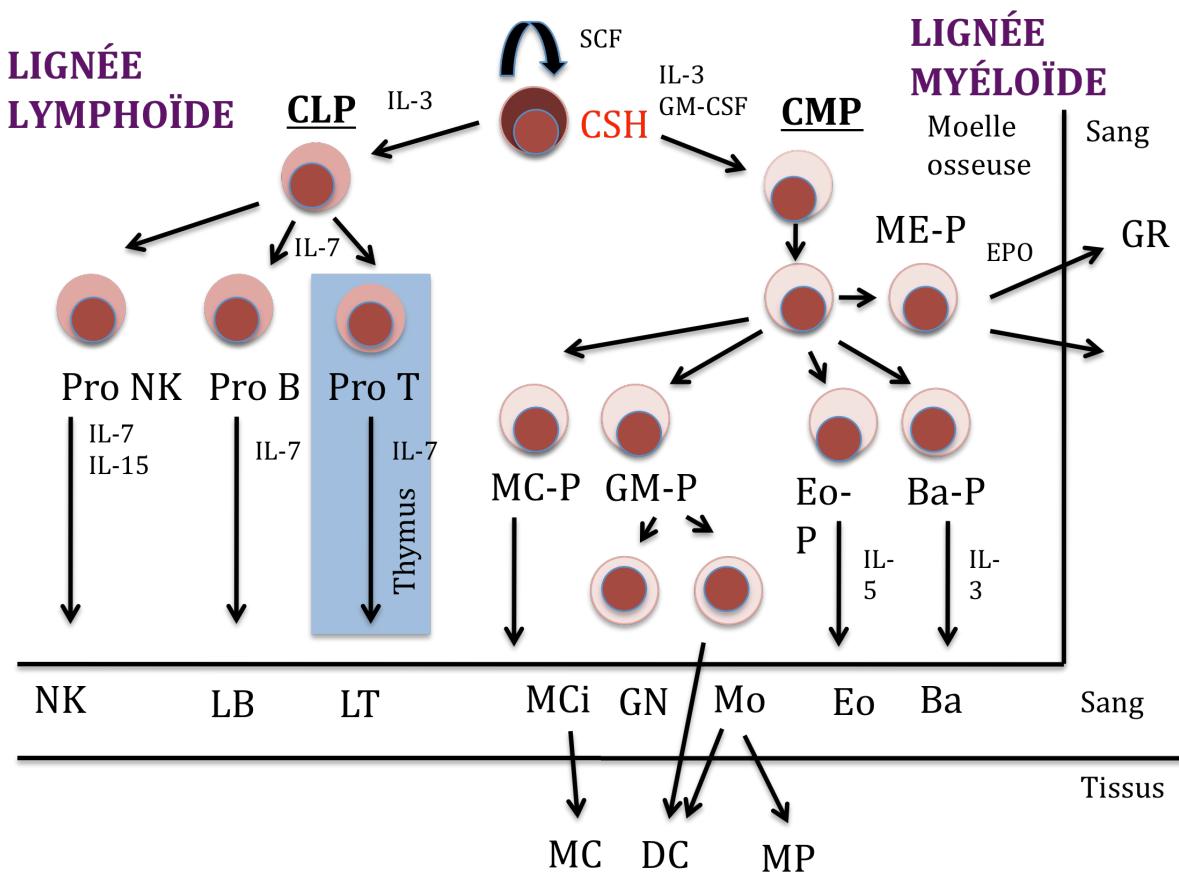
#### I.2.1.2. La cellule souche hématopoïétique donne naissance à plusieurs stades cellulaires : les cellules progénitrices

La cellule souche hématopoïétique (CSH) se différencie en plusieurs cellules progénitrices (informations également en partie II.1.). Ces cellules progénitrices donnent naissance aux grandes lignées cellulaires du sang :

- Le **progénéiteur commun lymphoïde** (CLP) donne naissance à la lignée lymphoïde.  
Les CLP se différencient en progénéteurs de lymphocytes B (pro-B), de lymphocytes T (pro-T) et de cellules *Natural Killer* (pro-NK).
- Le **progénéiteur commun myéloïde** (CMP) donne naissance à la lignée myéloïde des autres leucocytes mais aussi aux lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire.  
Les CMP se différencient en progénéteurs de granulocytes/monocytes (GM-P), de mastocytes (MC-P), d'éosinophiles (Eo-P), de basophiles (Ba-P) et de mégacaryocytes/érythrocytes (ME-P). Ces progénéteurs sont aussi appelés *Colony Forming Unit* (CFU) ; par exemple, CFU-Eo désigne les précurseurs des granulocytes éosinophiles.

La Figure 4 schématisse les deux lignages, lymphoïde et myéloïde.

**Figure 4 :** Schéma général de l'hématopoïèse



Légende :

- Ba :** Granulocytes basophiles
- CLP :** Progéniteur lymphoïde commun
- CMP :** Progéniteur myéloïde commun
- CSF :** Facteur stimulant les colonies
- CSH :** Cellule souche hématopoïétique
- DC :** Cellule dendritique
- Eo :** Granulocyte éosinophile
- EP :** Progéniteur érythroïde
- EPO :** Erythropoïétine
- GM :** Granulocyte macrophage
- GN :** Granulocyte neutrophile
- GR :** Globule rouge
- IL :** Interleukine
- LB :** Lymphocyte B
- LT :** Lymphocyte T
- MC :** Mastocyte
- MCi :** Mastocyte immature
- ME-P :** Progéniteur des mégacaryocytes
- Mo :** Monocyte
- MP :** Macrophage
- NK :** Cellule *Natural Killer*
- P ou Pro :** Progéniteur

## I.2.2. Quelques données sur les leucémies myéloïdes

Les leucémies atteignent les processus physiologiques normaux de l'hématopoïèse.

Le terme de leucémie n'est pas sans susciter quelques confusions. Historiquement créé pour désigner l'aspect blanchâtre lactescent du sang d'un malade, il signifie actuellement que des cellules cancéreuses hématopoïétiques circulent dans le sang, indépendamment du nombre de ces cellules circulantes (CRESPEAU, 2006).

Nous retenons la définition suivante : **les leucémies sont des affections néoplasiques malignes qui prennent naissance dans la moelle osseuse hématopoïétique qu'elles envahissent** ; la prolifération cellulaire médullaire est accompagnée du passage de cellules cancéreuses dans le sang et souvent de l'envahissement d'autres organes comme la rate et les ganglions lymphatiques (ESPINOSA, CHILLEY, 2006).

Les leucémies myéloïdes affectent le lignage myéloïde. Dans la leucémie myéloïde chronique, les cellules leucémiques ont le plus souvent subi une altération du matériel génétique, une translocation réciproque notée t(9-22) entre les chromosomes 9 et 22, qui donne un chromosome 9 long et un chromosome 22 court, également appelé chromosome Philadelphie ou chromosome Ph1 (NOWELL et HUNGERFORD, 1961 ; WALKER et HARDY, 1976). Cette translocation conduit sur le chromosome 22 à une fusion du gène *Breakpoint Cluster Region* (BCR) avec le proto-oncogène *Abelson murine Leukemia* (ABL). Le nouveau gène résultant de cette fusion, noté BCR/ABL produit alors une protéine de fusion anormale et qui a une activité tyrosine kinase. La protéine BCR/ABL favorise la prolifération des cellules et les protège de l'apoptose ; ce mécanisme est responsable de la leucémie.

### I.2.2.1. Les leucémies myéloïdes chroniques

Les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) sont caractérisées par la prolifération excessive de cellules sanguines appartenant au lignage myéloïde notamment la lignée granulocytaire (voir Figure 4 *supra*) et ceci avec une évolution plutôt lente.

### I.2.2.2. Les leucémies myéloïdes aiguës

D'une autre manière, les leucémies myéloïdes peuvent être aiguës. Le caractère « aigu » de la leucémie est défini par un potentiel évolutif rapide des symptômes et des signes biologiques de la maladie (en quelques semaines). Malgré l'uniformité apparente des cellules leucémiques de patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (LAM), il existe une très forte hétérogénéité parmi les cellules indifférenciées leucémiques ou blastes leucémiques essentiellement en fonction de leur stade de maturation. On identifie ainsi sept types de LAM en s'appuyant sur des critères cytologiques et des caractéristiques enzymatiques.

### I.2.3. L'origine monoclonale du cancer

*Même si de nombreuses preuves de cellules souches leucémiques ont été accumulées depuis le milieu des années 1960, la théorie a dû se construire en identifiant si le cancer est monoclonal ou polyclonal puis en recherchant l'identité de(s) la cellule(s) impliquée(s).*

### I.2.3.1. Sujets et méthodes

FIALKOW *et al.* (1967, 1977) ont étudié la Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PD), enzyme spécifique codée au locus *Gd* sur le chromosome X, chez des femmes atteintes de leucémie myéloïde chronique hétérozygotes au locus *Gd*.

Ils ont analysé les variants électrophorétiques exprimés dans les fibroblastes, les granulocytes (GN) et les globules rouges (GR) des trois femmes. La migration électrophorétique permettait de distinguer les deux variants, GdA et GdB, de la G-6-PD.

### I.2.3.2. Résultats et discussions

#### I.2.3.2.1. Résultats

Après électrophorèse, les deux variants alléliques GdA et GdB étaient présents dans les extraits cellulaires de fibroblastes des 3 patientes confirmant leur hétérozygotie au locus *Gd*.

**En revanche, la migration sur gel d'électrophorèse d'extraits cellulaires d'érythrocytes (GR) et de granulocytes (GN) révéla un seul variant allélique, GdA ou GdB.**

#### I.2.3.2.2. Discussion

Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour expliquer ce résultat :

- Le cancer a une origine monoclonale.
- Le processus leucémique altère l'expression d'un variant allélique de la G-6-PD B ; ce phénomène est rare.
- La transformation tumorale se produit dans de très nombreuses cellules exprimant le variant GdA et l'expression du variant GdB est masquée par l'abondance du variant GdA (FIALKOW *et al.*, 1967).

**L'explication parcimonieuse est l'origine monoclonale des leucémies myéloïdes chroniques.** D'autres études s'intéressant au chromosome Philadelphie aboutirent à la même conclusion sur l'origine monoclonale du cancer (WALKER et HARDY, 1976 ; JANOSSY *et al.*, 1976).

### I.2.4. Identité de la cellule à l'origine d'un cancer : une cellule souche

L'origine clonale étant démontrée, l'interrogation sur le type cellulaire impliqué reste entière. Tout peut être envisagé en première intention : une cellule différenciée, une cellule souche ou encore un progéniteur ? (Figure 4)

Les réponses à cette question résultent de recherches sur les LMC. *A priori*, il est légitime de penser que la cellule initiatrice était un précurseur déterminé des granulocytes puisque leur nombre était augmenté dans les leucémies (FIALKOW, 1977).

Le Tableau 2 nous donne le pourcentage de l'enzyme G-6-PD de type A et de type B étudié pour chaque patiente et pour plusieurs cellules.

**Tableau 2** : Pourcentage des enzymes GdA et GdB sur huit patientes leucémiques (FIALKOW, 1977)

En gras et souligné : une même cellule d'origine

En bleu : les biopsies sont bien polyclonales

En rouge : 1 seul allèle est impliqué, monoclonal pour les granulocytes, les globules rouges, les plaquettes et les cellules mononucléées

La cellule à l'origine d'une leucémie est commune aux globules rouges et aux granulocytes. Cette cellule est leucémique.

Patiente	Peau	Pourcentage de l'enzyme de type A et de type B (%A, %B)			Moelle osseuse
		Fibroblastes	Granulocytes	Globules rouges	
					Cellules nucléées
Numéro 1	50 ; 50	100 ; 0	100 ; 0	N.E.	N.E.
Numéro 2	25 ; 75	100 ; 0	100 ; 0	N.E.	N.E.
Numéro 3	50 ; 50	100 ; 0	100 ; 0	N.E.	N.E.
Numéro 4	67 ; 33	0 ; 100	0 ; 100	N.E.	0 ; 100
Numéro 5	50 ; 50	0 ; 100	0 ; 100	0 ; 100	0 ; 100
Numéro 6	25 ; 75	0 ; 100	0 ; 100	0 ; 100	0 ; 100
Numéro 7	33 ; 67	0 ; 100	0 ; 100	0 ; 100	0 ; 100
Numéro 8	33 ; 67	100 ; 0	100 ; 0	100 ; 0	100 ; 0

NE : Non étudié

Les LMC ont pour origine une cellule commune aux lignées granulocytaire, érythrocytaire, plaquettaires et des monocytes/macrophages (FIALKOW, 1977). Il s'agit d'une cellule souche (CS) ou d'un progéniteur précoce (CMP). Toutes les lignées ne sont pas atteintes de la même manière : la différenciation et la prolifération des granulocytes sont surtout affectées alors que les plaquettes se différencient normalement.

De la même manière, BONNET et DICK (1997) ont montré ultérieurement que les LAM sont organisées de façon hiérarchique et qu'elles ont comme origine une cellule hématopoïétique primitive, cible de la transformation leucémique.

**Le cancer a une origine monoclonale. La cellule initiatrice de cancer est très haute dans la hiérarchie cellulaire : un progéniteur précoce ou une cellule souche. Le modèle hiérarchique devient à cette époque prépondérant.**

## I.3. Approfondissement des études grâce au modèle animal

L'approfondissement des études sur les leucémies, tout comme les investigations en cancérologie, se font grâce à l'étude de modèles animaux. Avant de fournir les données relatives aux études réalisées sur des modèles animaux, revenons sur différents types de modèles d'étude communément utilisés.

### I.3.1. Modèle animal utilisé pour les découvertes sur les cellules souches cancéreuses : les souris immunodéficientes ou qui développent spontanément des tumeurs

L'utilisation des modèles animaux est fondamentale en recherche anticancéreuse : les études se font sur des **animaux immunodéficients** ainsi que sur des **animaux prédisposés au développement spontané de tumeurs**.

Les souris sont des modèles expérimentaux pertinents en cancérologie. Ce petit mammifère, très prolifique et d'élevage facile a une durée de gestation courte (19 jours) ; son génome est connu depuis 2002. Il est aisément et rapidement obtenu des lignées consanguines de cet animal. De plus, le génome de la Souris présente une homologie forte avec celui de l'Homme. Les analyses génétiques sont accessibles et un très grand nombre de génotypes mutants est connu (spontanés ou induits).

*Quelques exemples de modèles pertinents, parmi les plus importants, sont développés par la suite.*

#### I.3.1.1. Les caractéristiques de quelques souris immunodéficientes

Une immunodéficience se caractérise par une absence ou un dysfonctionnement d'un ou plusieurs mécanismes immunitaires. Cette déficience aboutit à une susceptibilité accrue aux infections microbiennes et à l'apparition de tumeurs. Certains pathogènes opportunistes normalement éliminés par un système immunitaire sain, peuvent alors proliférer facilement (ESPINOSA et CHILLET, 2006).

**Plusieurs lignées de souris immunodéficientes sont aujourd'hui utilisées en cancérologie.** Les locus qui affectent les réponses immunitaires comprennent notamment *nu* (*nude*), *SCID* (*severe combined immunodeficiency*) et *Xid* (*X-linked immunodeficiency*). Ces mutants murins ont des propriétés immunologiques distinctes et permettent des études complémentaires et spécifiques. Les bases d'immunologie doivent être connues pour comprendre les particularités des souris décrites par la suite.

##### I.3.1.1.1. Souris nude

La mutation *nude* est une mutation récessive spontanée découverte en 1962 (FLANAGAN, 1962). Cette mutation a été cartographiée sur le chromosome 11. Elle affecte le gène *Foxn1* codant un facteur de transcription. Les homozygotes *Foxn1<sup>nu/nu</sup>* sont dépourvus de poil dès la naissance et ne possèdent pas de thymus. L'absence de thymus a des conséquences nombreuses sur le système immunitaire des adultes incluant une déplétion des lymphocytes T, mais aussi une diminution du nombre des lymphocytes B. La viabilité et la fertilité des homozygotes sont compromises mais les souris *nude* peuvent être maintenues dans un environnement exempt de pathogènes. Les souris *nude* sont fréquemment utilisées comme sentinelles de l'état sanitaire d'une animalerie.

Ces souris acceptent très facilement les greffes ; néanmoins, ce ne sont pas les modèles les plus couramment utilisés pour étoffer la théorie des cellules souches cancéreuses.

### I.3.1.1.2. Souris Xid

Les souris Xid (pour *X-linked immune deficiency*) portent une mutation découverte en 1975 (MARTIN et MARTIN, 1975). La mutation a été cartographiée sur le chromosome X. Elle affecte le gène *Btk* codant la tyrosine kinase cytoplasmique BTK, la tyrosine kinase de Bruton.

Les souris Xid présentent une réduction du nombre de lymphocytes B périphériques d'environ 50% par rapport aux individus de génotype sauvage. Elles ont également des niveaux réduits d'immunoglobulines M et G3 et une réponse immune déficiente aux antigènes de type II ne dépendant pas du thymus.

Ces souris sont marginalement utilisées pour la théorie des cellules souches cancéreuses.

### I.3.1.1.3. Souris BNX

Les souris BNX présentent des mutations à chacun des trois locus : *nude* (*Foxn1*), *beige* (*Lyst*) et *Xid* (*Btk*) (ANDRIOLE *et al.*, 1985). Elles sont obtenues par croisements entre des mutants nude, beige et Xid. Ces souris ont des cellules NK et des macrophages fonctionnels. Elles présentent encore une réponse immune et les animaux BNX ont des affections cliniques légères. Elles sont très utiles pour les xénogreffes.

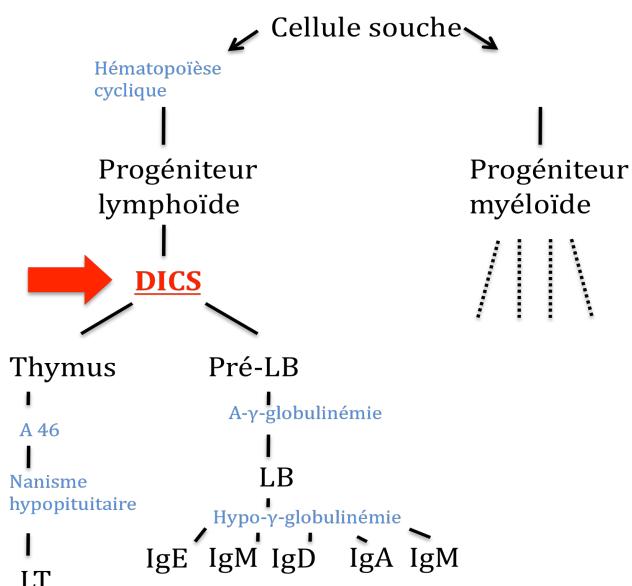
### I.3.1.1.4. Souris SCID (ou DICS)

La mutation SCID (*severe combined immunodeficiency*) ou DICS (immunodéficience combinée sévère), a été découverte en 1983 (BOSMA *et al.*, 1983). Cette mutation autosomique récessive, localisée sur le chromosome 16, affecte la protéine kinase PRKDC. Les souris homozygotes *Prkdc<sup>Scid/Scid</sup>* présentent des déficiences graves dans la différenciation des cellules souches en lymphocytes B et T matures, mais n'ont aucune répercussion sur la différenciation de la moelle osseuse (Figure 5).

**Figure 5 :** Etape affectée chez les souris SCID/DICS.

La mutation SCID est un déficit immunitaire primaire. Le syndrome d'immunodéficience combinée sévère (SCID/DICS) atteint les cellules B et T.

Le stock des souris portant la mutation SCID est à l'origine de nombreux modèles de souris humanisées. Nous n'en citerons que quelques uns : les souris NOD/SCID, les souris SCID-Hu, les souris NOD/SCID/ $\beta$ -2-microglobuline, et les souris NOG.



Les **souris NOD/SCID** sont les modèles animaux les plus utilisés dans la recherche sur les cellules souches cancéreuses. Chez les souris NOD/SCID, le phénotype diabétique non obèse associé au fonds génétique de la lignée consanguine NOD (*non obese diabetic*) sélectionnée dans les années 1980, est combiné à la mutation du gène *Prkdc* portée par les souris SCID. En d'autres termes, les souris NOD/SCID portent la mutation *Prkdc<sup>Scid</sup>* à l'état homozygote dans un fonds génétique NOD.

VAN DER LOO *et al.* (1998) ont souligné que les souris NOD/SCID acceptent les greffes de petits nombres de cellules et donc constituent d'excellentes souris réceptrices pour les xénogreffes.

Le développement du **modèle SCID-hu** Thy/Liv est la première tentative d'humanisation de souris de laboratoire. Il s'agit d'un système hétérochimérique où des souris homozygotes pour la mutation SCID reçoivent dans la capsule rénale un greffon composé de tissu hépatique et de cellules de thymus foetal humain (MC CUNE *et al.*, 1988). Les tissus thymiques et hépatiques greffés fusionnent pour former un organe unique (Thy/Liv) qui produit pendant plusieurs mois des cellules hématopoïétiques humaines. Ainsi, les souris SCID ont-elles permis d'étudier très précisément l'hématopoïèse embryonnaire et adulte de l'Homme. Elles ont notamment permis de s'intéresser à la fonction et à la différenciation hématolymphoïde.

Le modèle NOD/SCID a été amélioré à la fin des années 1990 par l'ajout dans le fonds génétique NOD, d'une mutation au locus de la  $\beta 2$ -microglobuline. Les **souris NOD/SCID  $\beta 2$ -microglobuline<sup>null</sup>** présentent une immunité innée très limitée (CHRISTIANSON *et al.*, 1997).

Enfin, les **souris NOG** sont des souris de la lignée consanguine NOD portant la mutation SCID, ainsi qu'une mutation perte de fonction dans le gène codant la chaîne  $\gamma$  commune du récepteur à l'interleukine 2 (NOD/SCID/*IL2R $\gamma^-$* ) (ITO *et al.*, 2008). Les souris NOG sont utilisées comme individus receveurs de xénogreffe. Leur capacité d'accepter une greffe est encore supérieure à celle des souris NOD/SCID. En effet, chez les souris NOG, la lignée *Natural Killer* (NK) est absente, comme le sont les lignées lymphoïdes B et T. Ce déficit immunitaire permet une meilleure reconstitution du système hématopoïétique après une greffe de cellules souches hématopoïétiques humaines.

### I.3.1.2. Le choix du modèle des souris immunodéficientes

Nous venons de présenter une liste non exhaustive de lignées de souris immunodéficientes, plus ou moins utilisées en cancérologie.

Les souris immunodéficientes acceptent des xénogreffes de cellules dérivées de tumeurs humaines très variées. Les tumeurs qui se développent chez la souris réceptrice présentent généralement les caractéristiques des tumeurs humaines d'origine. C'est le cas notamment des leucémies (LAPIDOT *et al.*, 1994). Les souris immunodéficientes sont de véritables modèles *in vivo* pour l'étude des tumeurs humaines.

**Pour identifier les cellules à l'origine du cancer, les souris NOD/SCID et nude sont notamment utilisées. Il s'agit de très bons modèles de xénogreffe dont la sensibilité est encore améliorée de nos jours (UNCKUN, 1996 ; ITO *et al.*, 2008).**

### I.3.1.3. Les souris qui développent spontanément des tumeurs

Les lignées de souris développant spontanément des tumeurs sont très nombreuses et se classent en fonction de la localisation associée (œil, glande mammaire, pancréas, leucémie *etc.*). On les choisit en fonction de l'étude envisagée.

Par exemple, 70 à 80% des souris de la lignée AKR/J développent spontanément des lymphomes T thymiques avant l'âge de 18 mois (BRUCE et VAN DER GAAG, 1963).

**Ces souris présentant une prédisposition au développement de tumeurs sont très utilisées dans la recherche sur les cellules souches cancéreuses.**

## I.3.2. L'utilisation des modèles animaux en pratique : données sur les capacités des cellules cancéreuses à proliférer *in vivo*

### I.3.2.1. Rappels et généralités

Une seule cellule est à l'origine d'un cancer : la cellule initiatrice. Cette cellule, occupant une position élevée dans la hiérarchie cellulaire, est une cellule souche ou un progéniteur. La démonstration sur cultures cellulaires humaines a été approfondie par des données sur le vivant.

### I.3.2.2. Identification de la cellule souche leucémique *in vivo* : établissement du modèle hiérarchique

BRUCE et VAN DER GAAG (1963) ont démontré que cent cellules d'un lymphome T prélevées sur une souris AKR/J atteinte de ce type de tumeur et greffées sur une souris AKR/J saine, c'est-à-dire non atteinte d'un lymphome T, permettaient la formation d'une colonie dans la rate. De plus, le nombre de colonies qui se développaient dans la rate était proportionnel au nombre de cellules cancéreuses injectées. Des études supplémentaires, utilisant des modèles murins immunodéficients, ont montré que seules quelques cellules particulières ont des capacités de tumorigénèse *in vivo* (LAPIDOT *et al.*, 1994 ; BONNET et DICK, 1997).

L'étude de cellules du sang périphérique et de la moelle osseuse de patients leucémiques, leur greffe à des souris NOD/SCID et leur analyse en cytométrie de flux ont permis à LAPIDOT *et al.* (1994) d'identifier pour la première fois une cellule à l'origine de leucémies. Cette cellule représentait 1/250000 des cellules tumorales. Elle exprimait le marqueur CD34 (marqueur des cellules souches), mais n'exprimait pas le marqueur CD38 (marqueur des cellules hématopoïétiques différencierées).

BONNET et DICK (1997) ont ensuite montré que les cellules CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> purifiées de patients leucémiques présentaient les propriétés des cellules souches : la capacité de s'autorenouveler, de proliférer et de se différencier. Les leucémies sont organisées sous une forme hiérarchique ayant au sommet une cellule initiatrice de leucémie (SL-IC, pour *leukemia-initiating cell*).

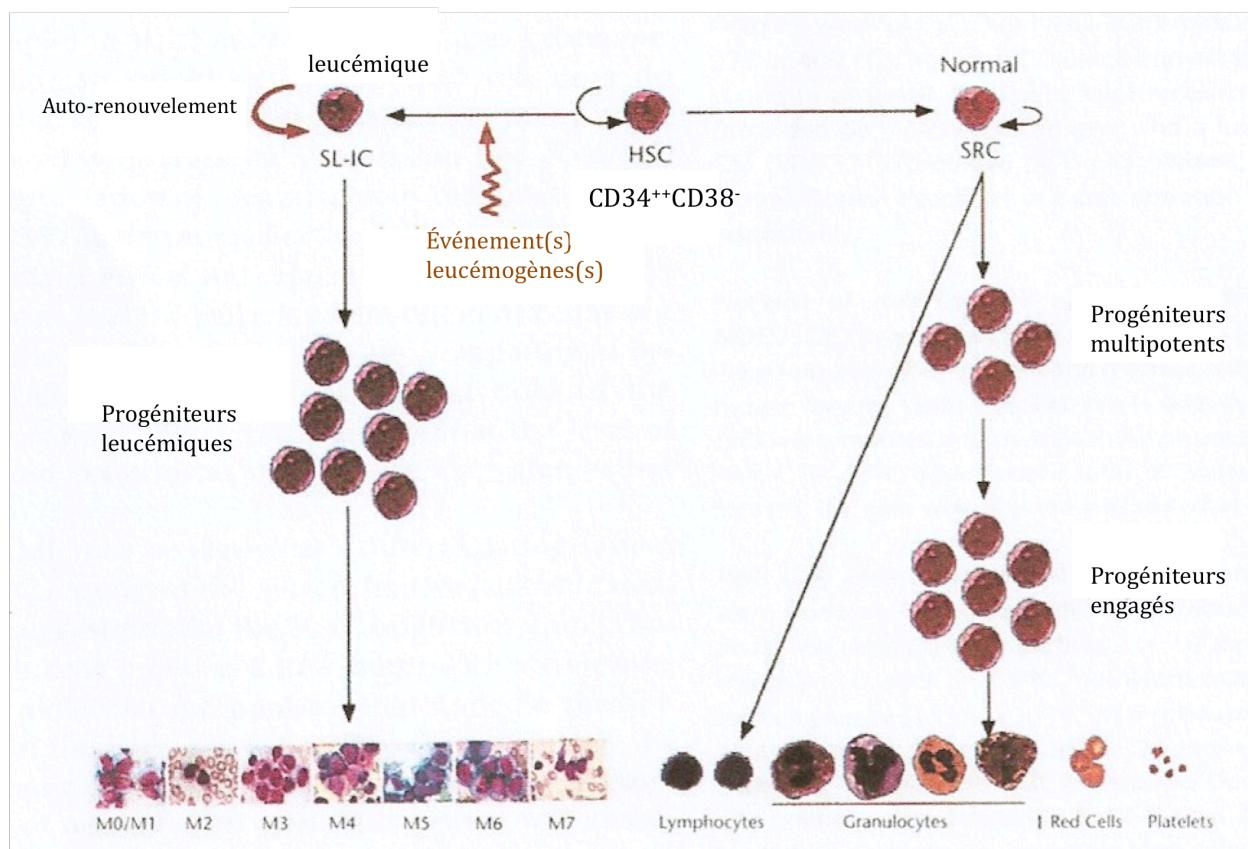
Les Figures 6 et 7 présentent le modèle hiérarchique proposé pour les leucémies.

**Figure 6 :** Modèle proposé par BONNET et DICK (1997) comparant la cellule souche normale et la cellule souche leucémique

Ce modèle compare l'organisation des systèmes hématopoïétiques sains et leucémiques. Ce modèle a été proposé à partir des expériences faites sur des souris NOD/SCID.

Bien que certains éléments manquent, ce modèle suggère qu'un événement leucémogène survient au niveau d'une cellule primitive (mutation, modifications épigénétiques, etc.). Cette cellule voit sa capacité d'auto-renouvellement augmentée tandis que certains lignages ne se développent plus normalement. La cellule initiatrice de la leucémie (SL-IC) produit des progéniteurs leucémiques ; lesquels produisent différents blastes leucémiques.

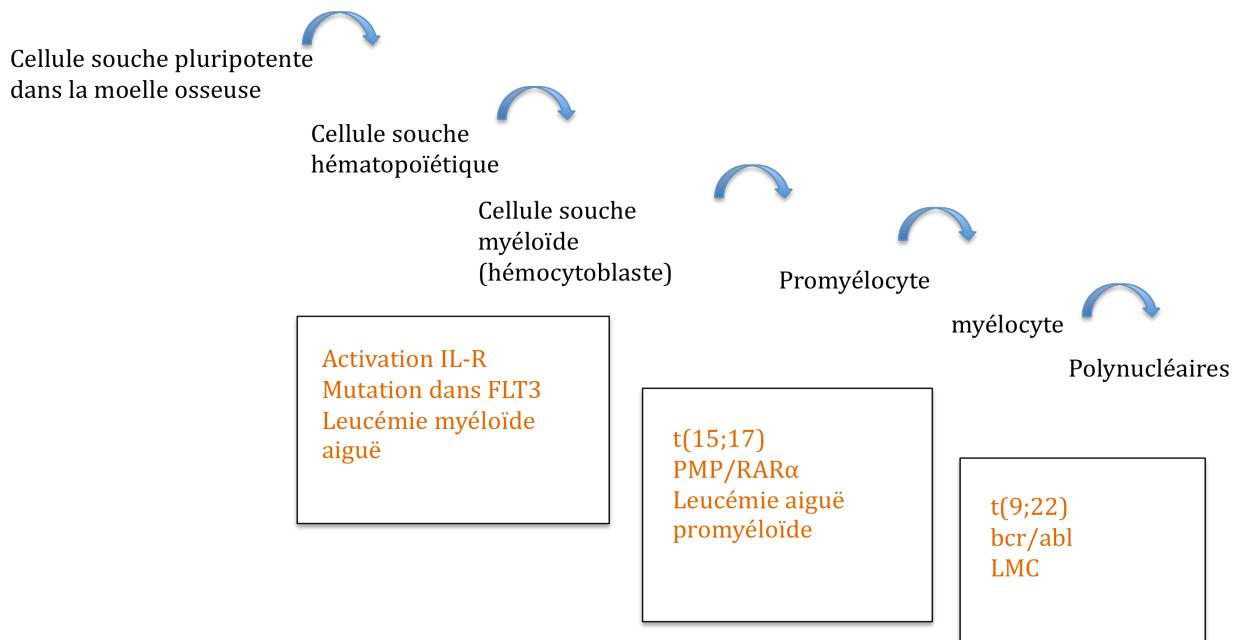
Ce modèle implique que la leucémie myéloïde est organisée sous une forme hiérarchique présentant de nombreuses similitudes avec le système hématopoïétique normal.



De plus, les différentes leucémies (type M1, type M2, type M3, *etc.*) peuvent être expliquées par le stade d'arrêt de maturation (Figure 7).

**Figure 7** : Modèle hiérarchique du cancer dans les leucémies établi par SELL (2010) à partir du postulat de Pierce

La Figure montre les stades d'arrêt de maturation dans les leucémies. L'expression des produits de translocation est corrélée au stade de maturation des cellules des différentes séries myéloïdes : la translocation  $t(9 ; 22)$  (BCR/ABL) est associée à un arrêt au stade myélocyte observé dans des LMC. La translocation  $t(15 ; 17)$  (PML/RAR $\alpha$ ) est associée à un arrêt au stade promyélocyte observé dans des leucémies promyéloïdes. Enfin, un grand nombre de mutations du récepteur à l'interleukine 3 associées à une translocation  $t(8 ; 21)$  sont responsables d'un arrêt de la maturation au stade de la cellule souche myéloïde ; elles sont observées dans différents types de leucémies myéloïdes aiguës.



Toutes les cellules tumorales n'ont pas la même capacité de donner naissance à une tumeur : seule une petite fraction cellulaire au sein des leucémies est en mesure de former une tumeur. Ce sont des cellules souches leucémiques.

Les leucémies, tumeurs liquides, suivent un modèle hiérarchique. Ce sont ces tumeurs qui ont véritablement permis de documenter l'existence de cellules souches cancéreuses par la réalisation d'études *in vivo*.

## I.4. Des leucémies aux tumeurs solides

D'après le *Cancer Research Institute*, « une tumeur solide est une masse anormale de tissu qui ne contient usuellement pas de kystes ou d'air ». Les tumeurs solides peuvent être bénignes ou malignes. Les tumeurs solides représentent plus de 90% de tous les cancers ce qui explique l'enjeu fondamental des recherches les concernant. Les différents types de tumeurs solides sont nommés en fonction du type de cellules touchées. Les tumeurs solides sont des sarcomes si elles sont développées à partir de cellules d'origine mésenchymateuse ou des carcinomes si développées à partir d'un épithélium. Les leucémies ne forment pas en général de tumeurs solides ; ce sont des tumeurs dites « liquides ».

D'après des études récentes, de nombreuses tumeurs solides auraient pour origine une cellule souche cancéreuse. C'est le cas du cancer du sein (AL-HAJJ *et al.*, 2003), du cerveau (SINGH *et al.*, 2003 ; SINGH *et al.*, 2004), du pancréas (SUZUKI, 2004 ; LI *et al.*, 2007 ; LEE *et al.*, 2008), de la prostate et de la vessie (COLLINS *et al.*, 2005 ; PATRAWALA, 2006), de la peau (FANG *et al.*, 2005), des thyroïdes (QUIROS, 2005), des ovaires (SZOTEK *et al.*, 2006), du côlon (RICCI-VITIANI *et al.*, 2006), de l'intestin et de l'estomac (BARKER *et al.*, 2009 ; VRIES, 2010), du poumon (ERAMO *et al.*, 2007 ; NEMOTO, 2011), de la tête et du cou (PRINCE *et al.*, 2007), du foie (SELL, 2010) du mélanome (FANG *et al.*, 2005), du rhabdomysome (SEIGEL, 2006), ainsi que de plusieurs types de tumeurs sanguines exceptionnellement solides.

### I.4.1. Les tumeurs du sein chez la femme et les tumeurs mammaires chez les animaux

Le cancer du sein est une des tumeurs solides les plus fréquentes. C'est aussi une des tumeurs les plus étudiées à l'heure actuelle.

#### I.4.1.1. Le cancer du sein a pour origine une cellule souche cancéreuse

En 2003, un groupe de chercheurs (AL-HAJJ *et al.*, 2003) a montré que les tumeurs mammaires dérivent de cellules souches somatiques adultes. Afin de comprendre les mécanismes régissant l'hétérogénéité des tumeurs solides, AL HAJJ *et al.* (2003) ont utilisé des modèles murins immunodéficients : des souris femelles NOD/SCID de huit semaines d'âge.

Pour distinguer les cellules entre elles, les auteurs ont utilisé la cytométrie en flux, dispositif permettant de trier les cellules en fonction de l'expression différentielle de marqueurs de surface. Les anticorps utilisés étaient dirigés contre les antigènes CD44, CD24, B38.1, l'antigène spécifique épithelial (ESA, pour *epithelial-specific antigen*) et l'antigène H2K de classe I. Ils ont ensuite injecté ces cellules à des souris NOD/SCID.

De leurs expériences, on retient que :

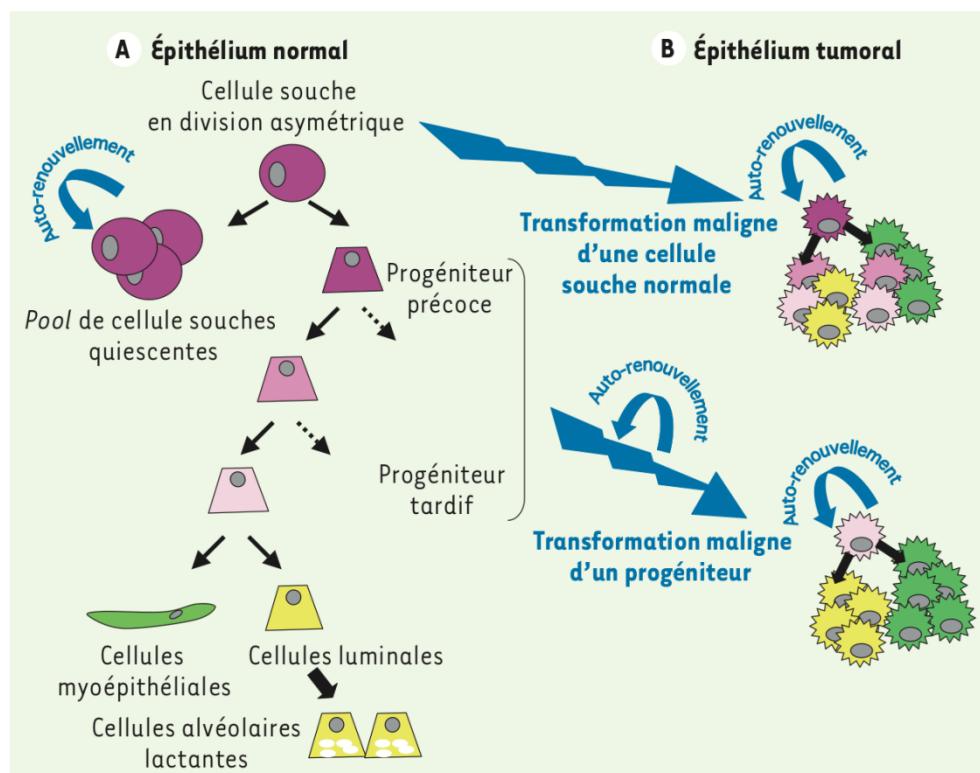
- D'après à la cytométrie de flux, toutes les cellules de la tumeur n'ont pas le même pouvoir tumorigène. Les cellules initiatrices de cancer du sein sont ESA<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>.
- Ces cellules sont capables de donner naissance à une tumeur et elles permettent de reproduire l'hétérogénéité de la tumeur de départ.
- Ces cellules initiatrices de cancer sont en petit nombre dans la tumeur d'où elles proviennent.

**Les tumeurs mammaires contiennent une petite population de cellules particulières, les cellules initiatrices de cancer ou cellules souches cancéreuses, qui ont la capacité de former des tumeurs chez des souris immunodéficientes. La Figure 8 présente un modèle hiérarchique pour le cancer du sein chez la femme et les tumeurs mammaires chez l'animal.**

**Figure 8** : Modèle hiérarchique du cancer du sein chez la femme et des tumeurs mammaires chez l'animal : différenciation de l'épithélium mammaire normal et tumoral (GINESTIER *et al.*, 2007)

**A.** La sous-population des cellules souches normales (CSN) est globalement dans un état quiescent. Une CSN se divise de façon asymétrique afin de donner un progéniteur précoce, engagé dans une voie de différenciation, et une cellule souche analogue à la cellule d'origine (voir partie II pour plus d'informations). Le progéniteur précoce se divise pour donner des progéniteurs tardifs qui se différencient en cellules spécialisées de l'épithélium mammaire (cellules luminales, cellules myoépithéliales et cellules alvéolaires produisant du lait).

**B.** Les cellules cibles de la transformation maligne peuvent être des cellules souches, ou des progéniteurs. Les cellules souches transformées, encore appelées cellules souches cancéreuses (CSC), conservent les propriétés des CSN (auto-renouvellement, capacité de prolifération, et différenciation en lignages multiples). Si les CSC ont pour origine une cellule progénitrice, la propriété d'auto-renouvellement est acquise à nouveau lors de la transformation maligne.



#### I.4.1.2. Les connaissances actuelles sur le cancer du sein

Suite à différentes études, on associe en 2012 le phénotype suivant à la cellule à l'origine du cancer du sein :  $CD44^+CD24^{-/\text{faible}}\text{ Lin}^-$ . Moins de 1 000 cellules initiatrices de tumeur suffisent à développer un cancer.

La masse tumorale est aussi positive pour les marqueurs :

- SSEA3/4,
- Oct4,
- Phosphatase alcaline,
- Aldéhyde déshydrogénase, ENU%ERATION virgule
- Télomérase (TAI *et al.*, 2005 ; GINESTIER *et al.*, 2007 ; CHANG, 2008 ; GASPARINI *et al.*, 2010).

## I.4.2. Identification de cellules souches cancéreuses dans d'autres tumeurs solides

En utilisant des techniques proches de celles utilisées pour les leucémies et sous l'impulsion des découvertes sur le cancer du sein, des CSC ont été recherchées et trouvées dans d'autres cancers solides. Les techniques d'isolement et d'identification sont les mêmes, mais l'identité de la cellule initiatrice de cancer est propre au tissu tumoral.

Quelques exemples, parmi les cancers les plus connus et les mieux caractérisés, sont donnés par la suite.

### I.4.2.1. Le cancer du cerveau

Les tumeurs du cerveau représentent la principale cause de cancer mortel chez l'enfant. Ces tumeurs sont extrêmement difficiles à soigner notamment à cause des résistances thérapeutiques. La recherche de la cellule à l'origine de ces tumeurs a été faite parallèlement à la découverte de cellules souches du cancer du sein.

Le cerveau contient des cellules nerveuses ou neurones, qui ne sont que rarement le siège d'un processus tumoral. Il contient aussi des cellules interstitielles dites gliales (comprenant les oligodendrocytes, les astrocytes et des cellules épendymaires) qui sont, quant à elles, fréquemment à l'origine de tumeurs nommées les gliomes. Parmi les gliomes, on retrouve notamment les glioblastomes (type le plus fréquent, correspondant à un astrocytome de grade 4), les oligodendrogliomes si les oligodendrocytes sont atteints, les astrocytomes si les astrocytes sont affectés, les épendymomes si les cellules épendymaires sont touchées.

SINGH *et al.* (2003) ont identifié la cellule à l'origine de différentes tumeurs primitives du cerveau chez l'enfant. Cette cellule, très rare, présente les propriétés de prolifération, d'autorenouvellement et de différenciation des cellules souches. Purifiée grâce au marqueur de surface CD133 et nommée « cellule souche cancéreuse du cerveau » de par ses propriétés intrinsèques, elle est mise en évidence dans différents types de tumeurs du système nerveux (méduloblastome, astrocytome juvénile pilocytique, astrocytome, gangliogliome, épendymome). Les cellules souches cancéreuses à l'origine de cancer du cerveau sont très faciles à isoler car elles ont des caractéristiques de croissance similaire à celles de cellules souches neurales : elles prolifèrent en culture comme un agrégat cellulaire non adhérent nommé « sphères » ou « sphéroïdes ». Elle est donc commune aux patients présentant le même type ou sous-type tumoral.

**À l'instar des leucémies et du cancer du sein, l'existence d'une cellule souche cancéreuse du cerveau a été documentée par l'injection de cellules CD133<sup>+</sup> dans des souris immunodéprimées à l'origine de différents types de cancer du cerveau (SINGH *et al.*, 2003 ; SINGH *et al.*, 2004).**

### I.4.2.2. Le cancer du pancréas

SUZUKI *et al.* (2004) et LI *et al.* (2007) ont identifié une sous-population de cellules capables de tumorigénèse au sein d'adénocarcinomes pancréatiques. Ils ont utilisé des modèles animaux immunodéprimés en greffant à des souris immunodéprimées des biopsies d'adénocarcinomes pancréatiques humains. Des cellules cancéreuses hautement tumorigènes ont été identifiées en recherchant l'expression de marqueurs membranaires de surface : CD44, CD24, et ESA, marqueurs aussi utilisés dans l'étude du cancer du sein. Ces cellules sont considérées comme des cellules CSC pancréatiques.

Ces cellules surexpriment des gènes-clés pour le développement embryonnaire, en particulier *Sonic hedgehog* et *BMI-1* qui sont nécessaires à l'auto-renouvellement des cellules souches normales (LEE, 2008).

#### I.4.2.3. Le cancer de la prostate

COLLINS *et al.* (2005) ont identifié et caractérisé une population de CSC provenant de tumeurs prostatiques humaines, ayant la capacité d'auto-renouvellement. Ces cellules, identifiées grâce aux mêmes marqueurs que les cellules souches prostatiques normales (CD44), sont en très petit nombre.

PATRAWALA *et al.* (2006) confirmèrent, par des xénogreffes sur modèle animal qu'au sein de cancers de la prostate, les cellules CD44<sup>+</sup> sont hautement tumorigènes et capables de métastases en comparaison à des cellules CD44<sup>-</sup>. Ces cellules sont *a priori* des cellules souches prostatiques cancéreuses.

#### I.4.2.4. Le cancer de la peau

Au sein des mélanomes, FANG *et al.* (2005) ont mis en évidence, grâce à des expériences *in vitro* et à des transplantations *in vivo*, une sous-population cellulaire ayant les propriétés de CSC : auto-renouvellement, prolifération et différenciation en lignages multiples (mélanocytes, adipocytes, chondrocytes et ostéocytes). Ils ont réalisé leurs études sur dix-sept mélanomes métastatiques provenant notamment de nœuds lymphatiques.

#### I.4.2.5. Le cancer du côlon

Les carcinomes coliques constituent en matière de mortalité, le deuxième cancer de l'homme. RICCI-VITIANI *et al.* (2006) ont démontré que des cellules cancéreuses coliques CD133<sup>+</sup> injectées à des souris immunodéficientes sont capables de former une tumeur. Ces cellules possèdent toutes les propriétés de cellules souches cancéreuses de tumeur colorectale.

Cette cellule souche cancéreuse est également à l'origine de l'ensemble des tumeurs intestinales.

#### I.4.2.6. Les cancers de l'estomac et de l'intestin

Des cellules souches cancéreuses ont été identifiées dans les cancers de l'estomac et de l'intestin (BARKER, 2009 ; VRIES, 2010).

Les cellules souches intestinales identifiées sont les mêmes cellules que celles à l'origine du cancer du côlon. Le cancer de l'estomac et celui des intestins suivent à la fois le modèle stochastique et le modèle hiérarchique, qui ne seraient pas incompatibles mais représenteraient seulement deux visions différentes d'un même mécanisme.

#### I.4.2.7. Le cancer du poumon

Le cancer du poumon est la cause la plus fréquente de décès dû à un cancer aussi bien chez l'homme que chez la femme.

ERAMO *et al.* (2007) ont identifié une rare population cellulaire, exprimant le marqueur membranaire CD133<sup>+</sup> capable de former des tumeurs après avoir été greffée sur des souris immunodéficientes. Ces cellules CD133<sup>+</sup> qui ont été identifiées dans des cancers humains du poumon à petites cellules et dans des cancers du poumon non à petites cellules, présentent toutes les caractéristiques des cellules souches cancéreuses pulmonaires.

NEMOTO et al. (2011) ont démontré l'existence de cellules souches cancéreuses provenant d'adénocarcinomes pulmonaires primitifs canins. Il s'agit d'une des premières expériences où l'animal n'est plus modèle expérimental pour des recherches humaines mais où il est patient à part entière. Ceci élargit la réflexion du concept des cellules souches cancéreuses à nos animaux domestiques et ouvre la voie d'options thérapeutiques communes à l'Homme et l'Animal.

#### I.4.2.8. Les cancers de la tête et du cou

PRINCE et al. (2007) ont démontré que les carcinomes de la tête et du cou comprennent des cellules souches cancéreuses. Ces CSC appartiennent à une sous-population de cellules CD44<sup>+</sup> et sont capables d'auto-renouvellement et de différenciation ; elles permettent après avoir été injectées à une souris immunodéficiente de reconstituer l'hétérogénéité de la tumeur de départ.

#### I.4.2.9. Le cancer du foie

Le cancer du foie est au 5<sup>ème</sup> rang en termes de prévalence à travers le monde ; le carcinome hépatocellulaire représente 90% des cancers du foie.

Le cancer du foie a été un cancer étudié très précocement dont on pensait initialement qu'il suivait un modèle stochastique (SELL et PIERCE, 1994). On sait, aujourd'hui, qu'il existe des cellules souches cancéreuses dans les cancers du foie. Ces cellules ont été retrouvées dans des lignées cellulaires dérivées de carcinomes hépatocellulaires, puis dans des échantillons de tumeurs de l'Homme (YANG et al., 2008).

Au sein du carcinome hépatocellulaire, il existe des cellules couches cancéreuses, les cellules ovales (SELL, 2010).

### I.4.3. Synthèse : tumeurs solides

Il n'y a pas de différence fondamentale entre une leucémie et une tumeur solide, si ce n'est que les cellules leucémiques sont circulantes. Des cellules souches cancéreuses sont retrouvées dans les leucémies mais aussi dans de très nombreux cancers solides, que ceux-ci soient dérivés de cellules épithéliales (adénocarcinome pulmonaire, carcinome mammaire, etc.) ou de cellules mésenchymateuses. Etant donné le nombre important de cancers, tous les cancers n'ont pas fait l'objet d'études. Néanmoins, l'existence des cellules souches cancéreuses semble avérée.

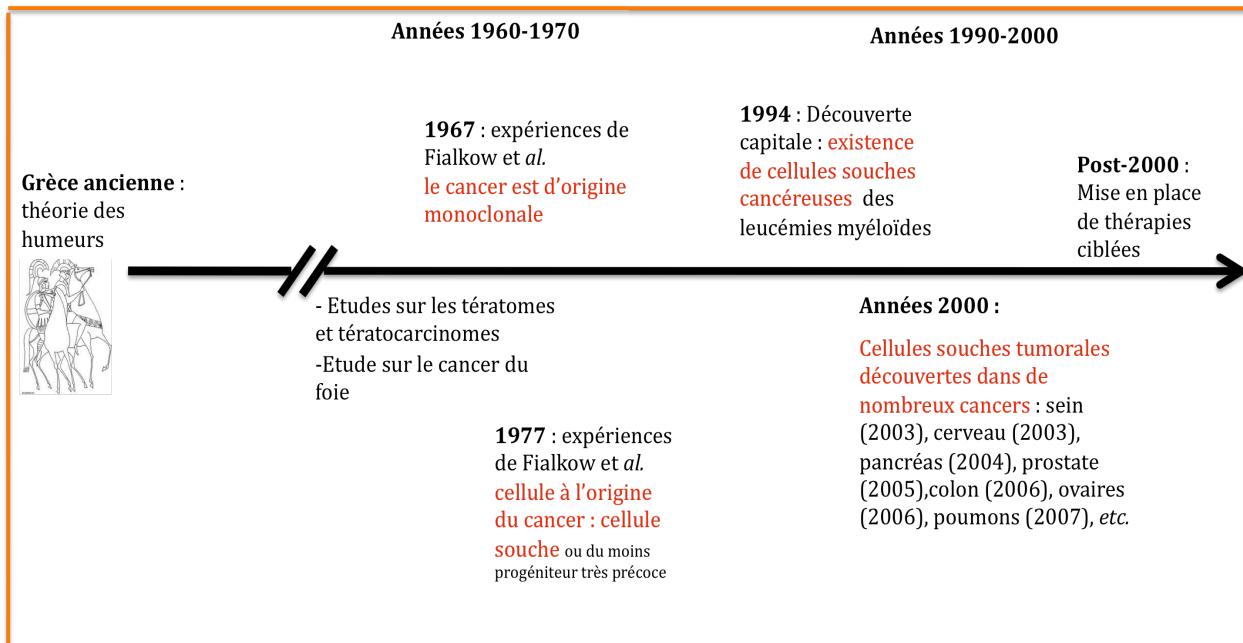
Les méthodes permettant d'isoler les cellules souches cancéreuses utilisent deux principes distincts, selon qu'elles se fondent sur des propriétés intrinsèques des cellules souches, communes quelle que soit l'affection que l'on considère, ou sur l'expression de marqueurs de surface spécifiques, comportant souvent une spécificité d'organe et d'espèce (partie II). Il n'y a pas de marqueur universel des CSC mais des marqueurs propres au tissu tumoral atteint. Combinés à ces méthodes, des tests prouvant la tumorigénéité des fractions de cellules isolées permettent de confirmer la présence de cellules souches cancéreuses.

Durant la carcinogenèse, les cellules souches malignes proviennent de cellules souches de tissus normaux. La plupart de la masse tumorale est constituée de cellules qui ont arrêté de se différencier, mais ne meurent pas. L'« histotype » de la tumeur reflète le stade d'arrêt de la maturation de la majorité des cellules tumorales.

**La Figure 9 synthétise les étapes de la découverte de l'origine cellulaire du cancer.**

## **Figure 9** : Evolution de la théorie de l'origine du cancer en fonction des découvertes scientifiques

L'origine du cancer a depuis longtemps était source de questionnement et de théories. Ce n'est que depuis quelques dizaines d'années que l'origine a été découverte : les cellules souches cancéreuses.



## I.5. Une hypothèse encore controversée

Malgré une légitimité des études expérimentales réalisées depuis plusieurs années, des scientifiques s'interrogent sur l'existence réelle de cellules souches cancéreuses mettant en avant le manque de recul et certaines inexactitudes (HAFNER et COULOMBEL, 2009).

### I.5.1. Une hypothèse peu documentée

L'hypothèse des cellules souches cancéreuses est critiquée dans des publications scientifiques et dans des revues populaires (CHUSTECKA, 2008).

La critique principale concerne la pertinence des modèles animaux utilisés pour des investigations humaines. Les expériences utilisées pour identifier les cellules souches cancéreuses putatives ne reflèteraient pas la réalité car les cellules cancéreuses humaines n'ont pas, de manière naturelle, besoin de survivre chez des souris. Les modèles animaux ne reflètent donc pas toute la biologie du cancer humain. On peut imaginer qu'il y aurait une réduction des potentialités des cellules cancéreuses humaines dans les xénogreffes. Seules quelques cellules humaines conserveraient leurs potentialités lors des greffes chez des souris et seraient capables de former un cancer. Penser que seule une petite fraction des cellules des tumeurs humaines seraient capables de former une tumeur chez l'homme serait une illusion, un artefact expérimental.

La preuve de l'existence de cellules souches cancéreuses devrait ainsi venir de l'efficacité de thérapeutiques anti-cellules souches cancéreuses. L'efficacité de ces thérapeutiques offrirait une preuve irréfutable, mais elles ne sont encore qu'expérimentales. Les critiques à l'encontre de l'hypothèse des CSC soulignent la relative nouveauté de cette théorie et un manque de recul.

## I.5.2. Une théorie incomplète sur certains aspects

Des scientifiques déplorent des inexactitudes dans la théorie initiale. En 2008, des chercheurs ont mis en cause l'idée selon laquelle les cellules souches cancéreuses seraient en très petit nombre dans les tumeurs. En effet, ils observaient que dans le mélanome un pourcentage élevé des cellules sont tumorigènes, 25% environ des cellules de mélanomes sont capables de former une tumeur chez un animal immunodéficient (QUINTANA *et al.*, 2008).

Le mélanome prennent naissance dans des tissus mésenchymateux ou épithéliaux. Il est très fréquent au sein de la population humaine, et chez nos carnivores domestiques.

Nous présentons ci-dessous cette expérience aux conclusions très importantes pour le débat sur les cellules souches cancéreuses.

### I.5.2.1. Démarche expérimentale

#### I.5.2.1.1. Hypothèse

Les CSC à l'origine des mélanomes devraient être rares dans les tumeurs, comme cela a été observé dans les autres cancers : l'hypothèse était qu'environ une cellule sur un million serait capable de former une tumeur 8 semaines après une greffe à une souris NOD/SCID.

#### I.5.2.1.2. Méthode, matériel et résultats

Afin de tester cette hypothèse, les auteurs ont greffé en sous-cutané sur des souris NOD/SCID entre  $10^2$  et  $10^7$  cellules de mélanome fraîchement dissociées provenant de patients humains (QUINTANA *et al.*, 2008).

Après huit semaines, quatre souris NOD/SCID sur sept ont développé un mélanome. Les tumeurs devenaient palpables après  $11,4+/-3,8$  semaines, ou  $14,3+/-7,6$  semaines pour les tumeurs qui provenaient de l'injection de moins de 10.000 cellules. La première observation est que lorsque l'on regarde le pourcentage de tumeurs 8 semaines après l'injection (ce que font habituellement les chercheurs du domaine, pour des raisons pratiques), on sous-estime la fréquence des cellules capables d'initier le développement d'un mélanome. La fréquence moyenne des cellules qui forment une tumeur dans un délai de 32 semaines, est de 1 pour 11.000.

Les chercheurs ont de plus observé que les cellules se greffaient mieux lorsque les souris receveuses étaient des NOD/SCID/IL2 $\gamma^{-/-}$ , dépourvues d'activité *Natural Killer* (NK).

Ils ont enfin mesuré l'efficacité d'une injection de cellules et de Matrigel dans des souris NOD/SCID et dans des souris NOD/SCID/IL2R $\gamma^{-/-}$ . Le résultat était clair : la fréquence d'obtention de mélanomes était plus élevée lorsque les cellules de mélanome humain étaient injectées avec du Matrigel dans des souris NOD/SCID/IL2R $\gamma^{-/-}$ . Surtout, une cellule sur neuf de la tumeur de départ était capable de former un mélanome dans ces conditions. En d'autres termes, la fréquence des cellules tumorigéniques mesurée dans ces conditions était 5000 fois plus élevée que par la méthode « classique ».

### I.5.2.2. Discussion

La discordance de ces résultats avec les résultats antérieurs, et avec la rareté supposée des cellules souches cancéreuses, provient de la modification du protocole expérimental de greffe xénogénique *in vivo*. Les modifications introduites par QUINTANA *et al.* concernent trois paramètres majeurs :

- Un allongement du temps d'observation,
- l'utilisation de souris ayant un déficit immunitaire plus sévère,

- une meilleure survie des cellules tumorales greffées par l'ajout de Matrigel, un substrat qui mime l'environnement tumoral naturel.

Ces résultats invitent à s'interroger sur la limite des techniques, protocoles et modèles expérimentaux classiques utilisés. Ces expériences ont aussi montré l'influence du microenvironnement tumoral sur les résultats. Nous reviendrons sur ce dernier point dans la partie II.

Enfin, le mélanome est un type tumoral particulier, d'origine embryologiquement épithéliale mais ayant opté pour un devenir type mésenchymateux. On peut s'interroger pour savoir si le mélanome n'est pas une exception à l'hypothèse de la rareté des cellules souches cancéreuses plutôt qu'un résultat contredisant la théorie *in extenso*.

## I.6. Conclusion de la première partie

**Malgré les quelques controverses, la théorie des cellules souches cancéreuses n'est pas remise en question par l'ensemble de la communauté scientifique.**

Tout d'abord isolées des leucémies myéloïdes aiguës et du carcinome mammaire, les cellules souches cancéreuses ou cellules initiatrices de tumeur, existent dans de nombreux cancers. Les cellules souches cancéreuses constituent une petite partie de la population des cellules tumorales et sont nécessaires et suffisantes pour former une tumeur.

**Le modèle hiérarchique explique l'hétérogénéité des tumeurs, ainsi que leur progression : l'hétérogénéité résulte d'une différenciation aberrante des cellules tumorales.**

Les caractéristiques majeures des cellules initiatrices de cancer sont l'auto-renouvellement et la capacité de donner naissance à une progéniture hétérogène. De plus, les cellules souches cancéreuses sont potentiellement à l'origine d'une tumeur secondaire après plusieurs années de rémission clinique suite à une tumeur primaire. Ces éléments sont expliqués dans les parties II et III. L'enjeu majeur est de trouver des propriétés des cellules souches cancéreuses différentes de celles des cellules souches normales pour les cibler spécifiquement (partie III).

## **II. Les caractéristiques de la cellule à l'origine du cancer**

*Cette partie s'appesantit sur les caractéristiques de la cellule à l'origine du cancer en insistant sur ses propriétés, sur l'importance des facteurs environnementaux et plus largement de la niche dans la cancérogenèse. Nous utiliserons l'exemple des leucémies et celui du cancer du sein.*

### **II.1. Des caractéristiques communes avec les cellules souches mais aussi des différences : premiers concepts**

#### **II.1.1. Qu'est ce qu'une cellule souche normale ?**

Il s'agit ici d'un rappel non exhaustif permettant de mieux comprendre la biologie des cellules souches cancéreuses (CSC). Pour plus d'informations, nous renvoyons à la thèse de BISMUTH (2008).

##### **II.1.1.1. Définition et organisation de la hiérarchie cellulaire normale**

###### *II.1.1.1.1. Définition*

Une cellule souche est une cellule indifférenciée, qui s'auto-renouvelle et peut donner naissance à un ou plusieurs types de cellules différenciées (potentiel de différenciation multilignée) pendant un temps très long, voire illimité (BISMUTH, 2008).

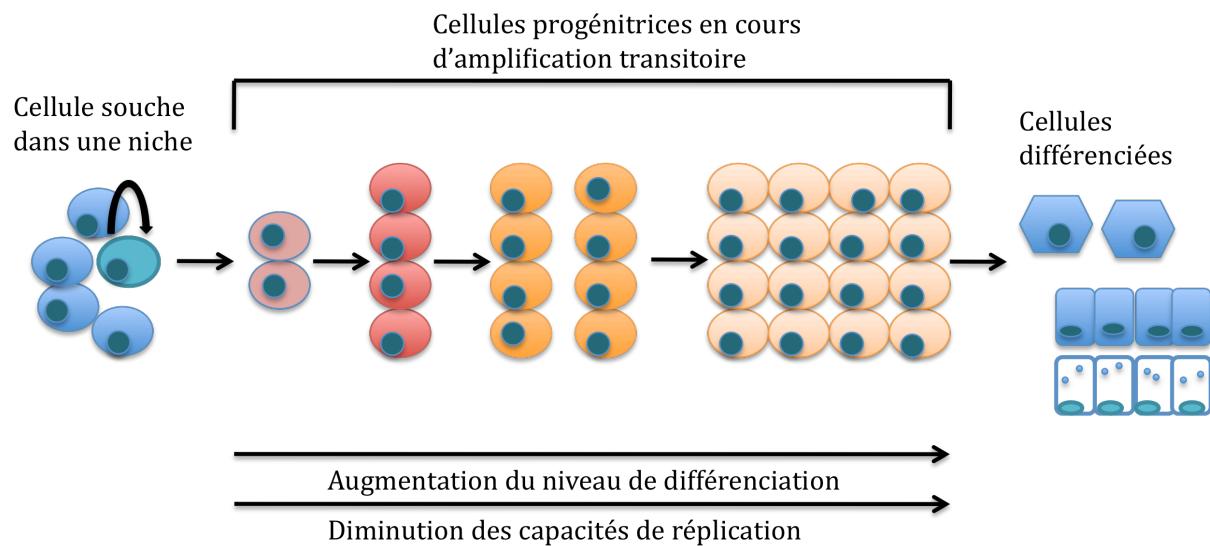
###### *II.1.1.1.2. La cellule souche, base d'une organisation hiérarchique*

Une homéostasie existe chez un individu sain afin de remplacer les cellules différencierées sénescentes et les pertes tissulaires consécutives à une blessure. Cet équilibre implique obligatoirement plusieurs étapes cellulaires : au début, les cellules ont une forte capacité de proliférer ; peu à peu, leurs capacités de multiplication diminuent et elles s'engagent dans une voie de différenciation, comme le montrent la Figure 10. Il existe donc une hiérarchie cellulaire.

La cellule la plus importante de cette hiérarchie est la cellule souche. Indifférenciée, cette cellule se divise de manière peu fréquente. Cette cellule a la capacité à elle-même de reconstituer l'ensemble des phénotypes constituant la descendance.

Entre cette cellule et les cellules différencierées, il existe des cellules engagées dans une voie de différenciation ayant des capacités prolifératives élevées et un potentiel de différenciation restreint. On les appelle des cellules d'amplification transitoire, qui deviennent ensuite des cellules matures, différencierées qui constituent la population spécialisée du tissu (GARGETT, 2007).

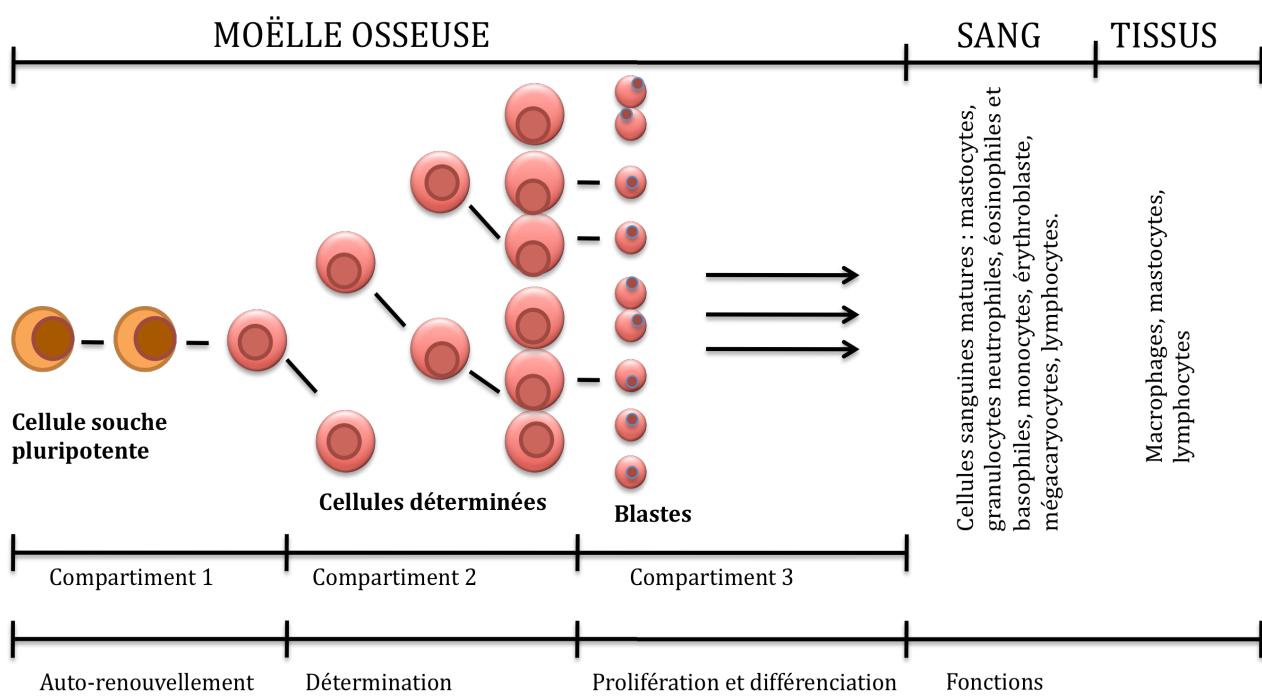
**Figure 10** : Le concept de cellule souche



Par exemple, au cours de l'hématopoïèse, la base de la hiérarchie cellulaire est la cellule souche hématopoïétique. Dans la moelle osseuse, la cellule souche donne naissance à une nouvelle cellule souche et à une cellule déterminée. Cette dernière prolifère et se différencie, puis sort de la moelle osseuse hématopoïétique pour gagner le sang et les tissus périphériques. Les cellules d'amplification transitoire sont les blastes et enfin, les cellules différencieront sont les monocytes, les globules rouges, les lymphocytes *etc.* (voir Figure 4 de la partie I). Cet exemple est illustré par la Figure 11.

Dans l'exemple des tissus mammaires déjà présenté (Figure 8), la différenciation des cellules souches normales donne naissance à toutes les cellules épithéliales matures de la glande mammaire.

**Figure 11** : modèle de l'hématopoïèse : un système hiérarchique



### *II.1.1.1.3. Différents types de cellules souches*

Il existe deux types de cellules souches (CS) : les cellules souches adultes (cellule souche hématopoïétique, cellule souche mésenchymateuse *etc.*) et les cellules souches embryonnaires. Ce document traite largement des cellules souches adultes. Les cellules souches embryonnaires sont évoquées dans la partie relative aux tératocarcinomes (I.1.).

### **II.1.1.2. Caractéristiques principales de la cellule souche adulte**

Sept traits sont caractéristiques des cellules souches (MILLER *et al.*, 1993 ; MILLER *et al.*, 2005) :

- Les CS constituent une petite sous-population d'un tissu donné (entre 0,0001 et 0,1 %).
- D'un point de vue ultrastructural, les CS ne sont pas spécialisées. Elles montrent un rapport nucléo-cytoplasmique élevé et très peu d'organelles.
- Les CS peuvent être pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en toutes les cellules d'un organisme.
- Le cycle des CS est long. Néanmoins, elles peuvent proliférer beaucoup plus rapidement en fonction de certains stimuli.
- Les CS ont des capacités prolifératives qui sont bien supérieures à la durée de vie d'un individu.
- Puisque les CS se divisent lentement et représentent un faible pourcentage de la population cellulaire totale, un groupe de cellules intermédiaires, les cellules d'amplification transitoire existent. Ces cellules ont des capacités prolifératives élevées et donneront les populations cellulaires différenciées.
- Le microenvironnement joue un rôle fondamental dans leur homéostasie ainsi que dans la différenciation de leurs descendants.

### **II.1.1.3. Fonction, division et régulation**

#### *II.1.1.3.1. Fonction*

La fonction des cellules souches est de deux ordres. Tout d'abord, la CS permet l'auto-renouvellement (c'est-à-dire le maintien d'une population de CS). Ensuite, elle permet de créer tous les lignages cellulaires d'un tissu aussi longtemps que nécessaire.

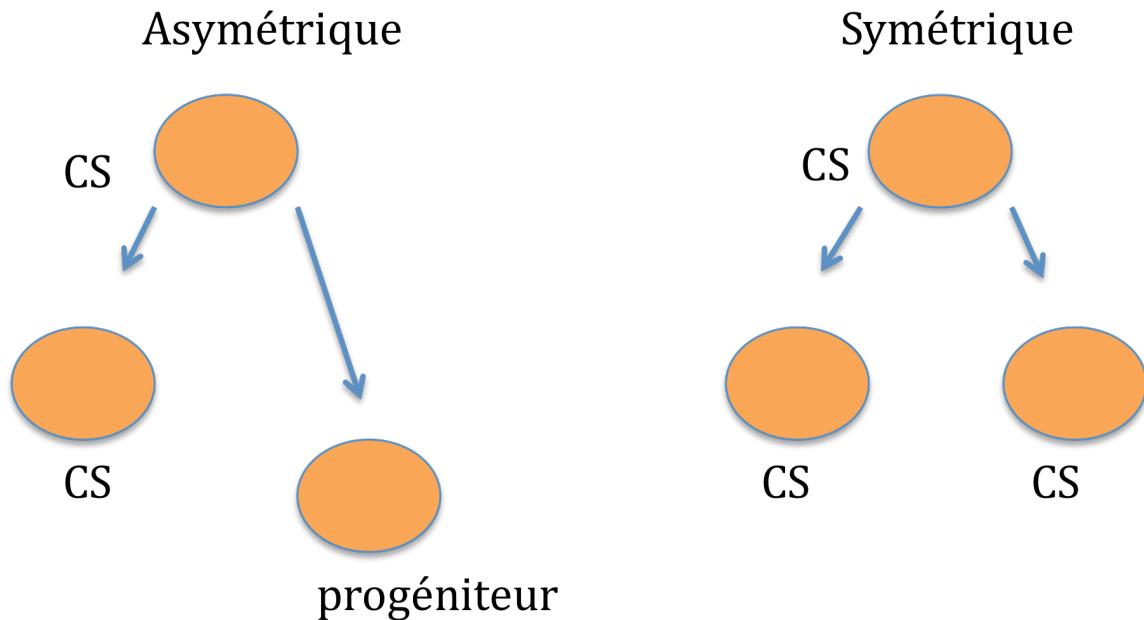
#### *II.1.1.3.2. Modes de division*

Les cellules souches peuvent se diviser de deux manières ; tout d'abord, par division asymétrique mais aussi par division symétrique.

La division asymétrique produit une cellule souche fille et une cellule fille déterminée à se différencier. Cette division asymétrique est très commune chez les organismes unicellulaires et les invertébrés. Elle existe aussi chez les mammifères. Au sein de l'ovaire de Drosophile, la cellule souche fille reste associée à certaines cellules somatiques tandis que la cellule fille déterminée sort de la niche et se différencie en un ovocyte mature (GILBOA et LEHMANN, 2004). La division peut aussi être symétrique. Dans ce cas, la cellule souche produit deux cellules filles identiques entre elles et chacune ressemblant à la cellule mère. La Figure 12 présente les deux modes de réplication.

Ces deux stratégies sont mécaniquement très différentes mais les deux impliquent *feedbacks* et interactions intercellulaires (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005).

**Figure 12** : Les deux modes de division des cellules souches



#### II.1.1.3.3. Régulation de la cellule souche

La régulation peut être intrinsèque : dans ce cas, la CS est elle-même programmée. Elle peut aussi être extrinsèque : dans ce cas, la régulation de la CS se fait en réponse à un stimulus extérieur ou un signal médié par l'environnement de proximité (WATT *et al.*, 2000). Bien souvent, les deux types de régulation coexistent conjointement.

Ces signaux expliquent le maintien d'un état quiescent, les divisions cellulaires rares, un état indifférencié mais aussi des décisions concernant le type de division, symétrique ou asymétrique.

### II.1.2. Une cellule responsable de la tumorigénérité : la cellule souche cancéreuse

#### II.1.2.1. Des similitudes avec la cellule souche normale

Les cellules souches cancéreuses (CSC) s'apparentent aux cellules souches normales (CSN). Elles présentent la majorité des caractéristiques présentées ci-dessus : auto-renouvellement, potentiel de prolifération et de différenciation. De plus, comme les CSN, les CSC constituent une fraction très minoritaire de la masse tumorale (moins de 0,001%) (LAPIDOT *et al.*, 1994).

La plupart des autres potentialités attribuées aux CSN sont conservées au sein des CSC. Ces propriétés incluent l'expression d'une activité télomérase, l'activation de voies de signalisation anti-apoptotiques, la possibilité d'entrer en phase de quiescence, l'augmentation de l'activité des transporteurs membranaires, de meilleures capacités de migration cellulaire, de survie en l'absence d'adhésion à un substrat, et de résistance à l'hypoxie (GINESTIER *et al.*, 2007).

Ces propriétés expliquent, en partie, l'extrême agressivité des CSC. Elles offrent la possibilité de former des métastases et de résister aux traitements anti-tumoraux (chimiothérapie, radiothérapie) (voir partie III).

## II.1.2.2. Les spécificités de la cellule souche cancéreuse

Les CSC présentent aussi des caractéristiques propres qui les distinguent des CS saines. Ce sont des propriétés le plus souvent acquises à la suite d'altérations génétiques.

Les CSC diffèrent ainsi par des critères inhérents à la transformation cancéreuse comme la prolifération anarchique guidée par des dysfonctionnements du programme d'auto-renouvellement ainsi qu'une différenciation anormale souvent partielle. De plus, l'activité télomérase, bien que présente, est souvent modifiée. Au moins quatre des sept traits suivants sont nécessaires pour obtenir une transformation tumorale (HANABAN et WEINBERG, 2000) :

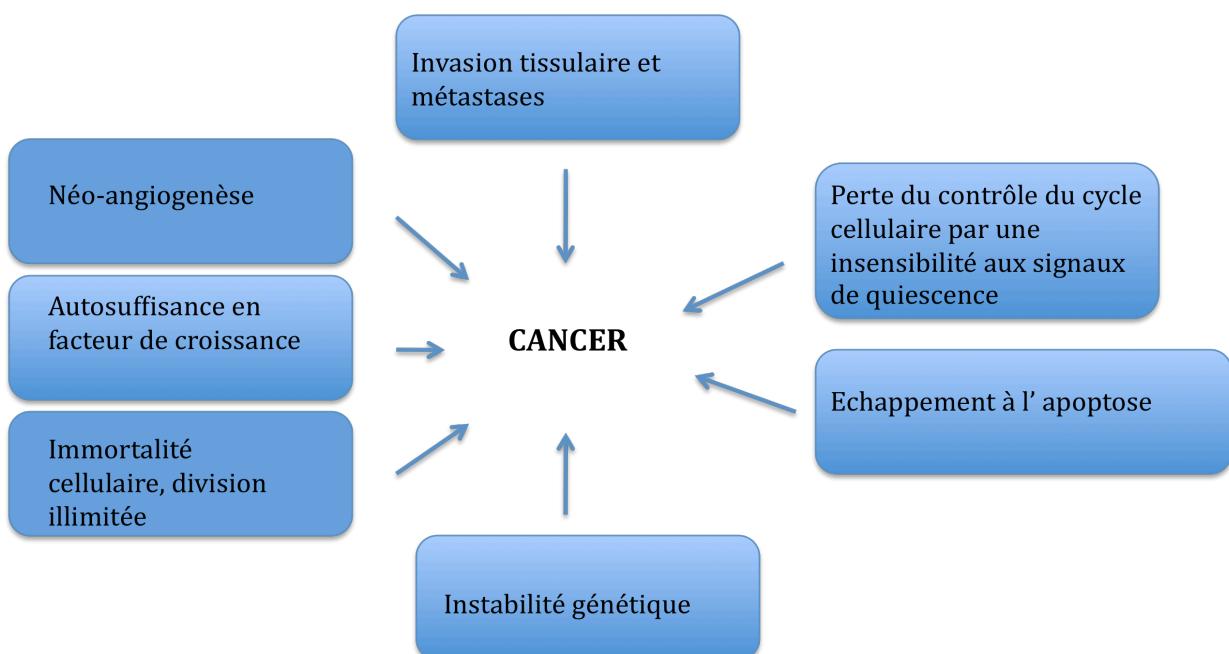
1. L'autosuffisance en facteurs de croissance,
2. L'insensibilité aux facteurs inhibiteurs de croissance,
3. L'échappement à l'apoptose,
4. Le potentiel de réplication illimité,
5. Le maintien de l'angiogenèse,
6. L'invasion tissulaire et métastase,
7. L'instabilité du génome

Liste à laquelle il faut adjoindre, comme responsable de l'instabilité génétique, l'altération des capacités de réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Dans chaque cas, des altérations génétiques du type « gain de fonction » (oncogènes) ou du type « perte de fonction » (gènes suppresseurs de tumeurs) peuvent être rencontrées.

La Figure 13 montre de manière visuelle ces éléments.

**Figure 13** : Les 7 éléments-clés de l'oncogenèse selon HANABAN et WEINBERG (2000)

Chaque mécanisme sous-entend l'expression de chacun des autres. Par exemple, l'instabilité génétique permet à la cellule cancéreuse d'explorer avec succès les voies les plus diverses pour subsister, proliférer et envahir les tissus voisins et éloignés.



## II.1.3. Comment obtient-on une cellule souche cancéreuse ?

La CSC étant très proche de la CSN, il est légitime de penser que la première résulte d'une modification de la seconde. Si tout n'est pas encore élucidé sur les mécanismes de cette filiation, certaines idées surgissent (MILLER *et al.*, 2005).

Les fonctions, modes de division et les signaux de régulation sont modifiés de façon pathologique dans les cellules souches cancéreuses.

### II.1.3.1. Modèles reconnus en 2012

#### II.1.3.1.1. Les tumeurs proviennent fréquemment de la transformation de cellules souches normales

La plupart du temps, les tumeurs proviennent de la transformation de CSN ; les CSC restent alors très proches des CSN. Les CS adultes constituent dans ce cas la population cellulaire qui accumule des mutations. De nombreuses expériences documentent cette hypothèse (LAPIDOT *et al.*, 1994 ; BONNET et DICK, 1997 ; COLLINS *et al.*, 2005 ; NEMOTO *et al.*, 2011).

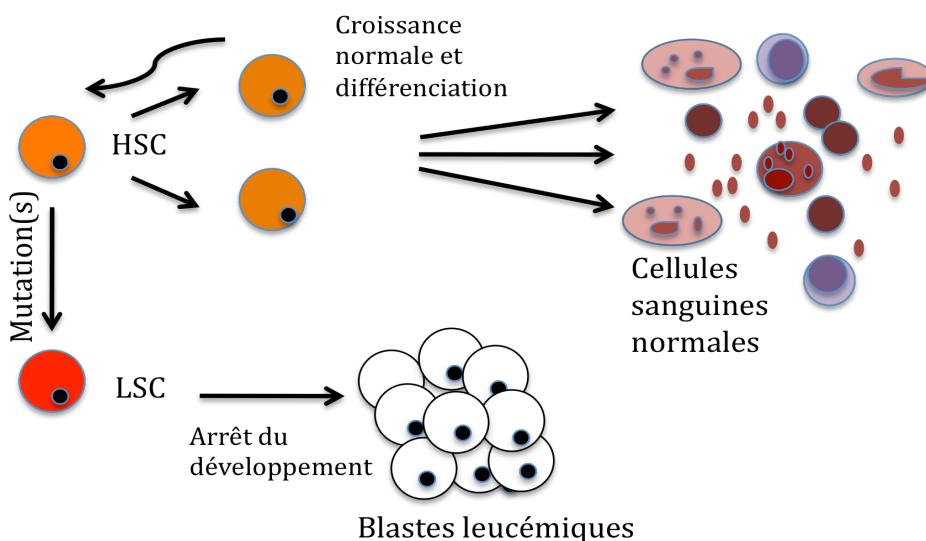
À titre d'illustration, les cellules souches leucémiques proviennent vraisemblablement de la transformation de cellules souches hématopoïétiques normales (voir Figures 6 et 14). Elles conservent la plupart des caractéristiques des cellules souches hématopoïétiques normales. Environ 95% des patients atteints de leucémie myéloïde chronique possèdent le chromosome Philadelphie, qui sert de trait cytogénétique caractéristique de la maladie. Cette caractéristique est retrouvée dans les cellules lymphoïdes B, les mégacaryocytes, les érythroblastes et les cellules myéloïdes chez une très grande majorité des patients leucémiques. Ce résultat suggère que la translocation originelle a eu lieu au sein de la cellule souche hématopoïétique dans les leucémies lymphoïdes à chromosome Philadelphie positif (FIALKOW *et al.*, 1977 ; SAWYERS, 1999).

**Figure 14** : Exemple des leucémies : transformation de la cellule souche hématopoïétique en cellule souche leucémique (d'après JORDAN, 2004)

Les cellules souches normales hématopoïétiques (HSC pour *hematopoietic stem cell*) subissent des mutations donnant des cellules souches cancéreuses (LSC pour *leukemic stem cell*).

Ces LSC entament leur différenciation, s'arrêtent puis accumulent des mutations. De telles cellules généralement nommées blastes leucémiques, sont biologiquement différentes des CSC.

De la même manière, dans le cancer du sein, les CSC proviennent directement de CSN de l'épithélium mammaire qui sont seules le siège d'altérations génétiques tumorales (GINESTIER *et al.*, 2007).



### II.1.3.1.2. Des cancers peuvent être issus d'une cellule progénitrice au devenir restreint

Quelques exemples ont également montré que le cancer pouvait aussi se développer à partir d'une cellule progénitrice, restreinte dans son potentiel de différenciation. Des mutations se produisent dans les cellules souches mais les événements responsables de la transformation ont lieu plus tardivement, au stade des progéniteurs précoce.

Dans le système hématopoïétique, par exemple, des progéniteurs précoce, descendants immédiats des CSN, peuvent être les cibles d'altérations oncogéniques et se comporter comme des CSC en ré-exprimant un programme d'auto-renouvellement (KRIVTSOV *et al.*, 2006). Deux observations cliniques suggèrent cette reconversion maligne plus tardive :

- Dans les leucémies aiguës promyélocytaires (de type M3), la partie cellulaire la plus différenciée porte une fusion du gène *PML* (*promyelocytic leukemia*) et du gène codant le récepteur  $\alpha$  à l'acide rétinoïque. Ces cellules ont un phénotype  $CD34^- CD38^+$  et non  $CD34^+ CD38^-$ , le phénotype de la CS hématopoïétique.
- De plus, les cellules souches leucémiques ont des marqueurs membranaires similaires à ceux des CSN. L'expression du marqueur Thy-1 et du récepteur  $\alpha$  de l'interleukine 3 (IL3) est pourtant différente (MILLER *et al.*, 2005).

### II.1.3.1.3. Comment s'effectue la progression tumorale ?

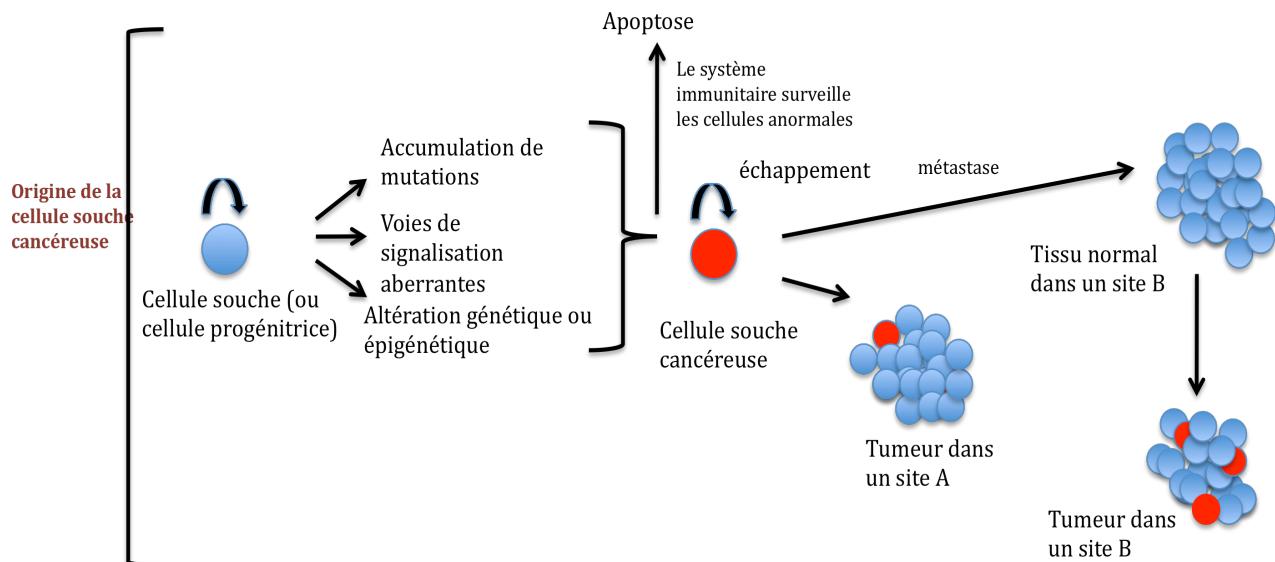
Le développement des CSC commence par l'acquisition de mutations dans des CSN, processus nommé « progression pré-tumorale » ou « pré-cancéreuse » (voir Figure 15). La progression « pré-cancéreuse » des CS donne naissance à des champs d'expansion clonale et la cancérisation débute. Le cancer précoce aboutit au cancer « franc » qui continue sa progression en donnant de nouveaux sous-clones. Le cancer est de plus en plus agressif et empreint d'hétérogénéité.

La plasticité des CS est retrouvée au sein des cancers. Celle-ci peut être maintenue et amplifiée par des facteurs de l'environnement de proximité (voir partie II.2).

**Figure 15** : Origine et caractéristiques de la cellule souche cancéreuse (MILLER *et al.*, 2005)

Deux possibilités peuvent expliquer les mécanismes de l'origine du cancer : 1. Une cellule souche devient directement une CSC lorsqu'une mutation importante se produit au niveau de gènes-clés en relation avec l'auto-renouvellement (*Bmi-1* par exemple) ; ou, 2. Un progéniteur engagé dans une voie de différenciation peut être transformé par mutation(s). Dans le plus grand nombre de cas, il est néanmoins éliminé par le système immunitaire.

La cellule cancéreuse est responsable de la formation de tumeur. Cette CSC peut sortir de son site initial tumoral et s'ancrer au niveau d'un autre site.



#### *II.1.3.1.4. Des voies de signalisation communes régulent l'auto-renouvellement des cellules souches normales et cancéreuses*

Des voies de signalisation communes régulent les capacités d'auto-renouvellement des CSN et des CSC. Une mutation dans un des éléments des voies impliquées dans l'homéostasie des CSN peut causer la formation d'un cancer.

Les scientifiques ont identifié des signatures moléculaires assez récurrentes au sein des CSC. Des mutations accumulées dans ces cellules peuvent activer de façon inappropriée les voies de l'auto-renouvellement comme les voies BMI-1, Notch, Wnt/β-caténine, ou encore Sonic hedgehog (ADOLPHE *et al.*, 2004). Nous développons quelques-unes des voies altérées lors du cancer.

##### ***II.1.3.1.4.1. BMI-1***

BMI-1 (*BMI-1 polycomb ring finger oncogene*) est une protéine régulatrice majeure pour l'auto-renouvellement des CS normales et cancéreuses. Le locus *INK4a* est un composant essentiel de ce mécanisme d'auto-renouvellement.

Une dérégulation de cette voie peut mener au cancer. Un déficit d'expression du proto-oncogène *BMI-1* dans les CSC a été rapporté (LESSARD et SAUVAGEAU, 2003).

##### ***II.1.3.1.4.2. Notch***

La voie de signalisation Notch est impliquée dans la communication intercellulaire. Elle intervient notamment dans la détermination entre division asymétrique et différenciation (FIUZA et ARIAS, 2007). De plus, la signalisation par Notch pourrait jouer un rôle dans l'autorenouvellement des cellules souches et notamment cancéreuses.

##### ***II.1.3.1.4.3. Wnt/β-caténine***

Wnt et la β-caténine sont des glycoprotéines d'environ 350 acides aminés, riches en cystéines. Elles sont impliquées dans des voies incluant la détermination des CS et le maintien de l'homéostasie à l'état adulte et ce, dès l'embryogenèse. Dans le système hématopoïétique, la β-caténine est impliquée dans la survie, l'adhérence et la prolifération des cellules leucémiques (CHUNG *et al.*, 2002).

Une surexpression constitutive de la voie de signalisation Wnt est observée dans de très nombreux cancers hématologiques et non hématologiques (TAIPALE et BEACHY, 2001 ; REYA *et al.*, 2001 ; REYA et CLEVERS, 2005).

##### ***II.1.3.1.4.4. Sonic hedgehog***

La voie de signalisation Sonic Hedgehog est impliquée dans la survie, la croissance et la prolifération des cellules souches. Une surexpression constitutive est observée dans de nombreux cancers. Cette surexpression est, le plus souvent, consécutive à une mutation gain de fonction (TAIPALE et BEACHY, 2001 ; ADOLPHE *et al.*, 2004).

##### ***II.1.3.1.4.5. Jun-B***

*Jun-B* est un proto-oncogène, régulateur du nombre de cellules souches. Sa surexpression conduit à un désordre de type myéloprolifératif (JORDAN et GUZMAN, 2009).

#### *II.1.3.1.4.6. Des voies de signalisation impliquées dans la survie de cellules souches cancéreuses*

Concernant la survie des CSC, différentes études suggèrent que les voies de signalisation NF-κB et de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3 kinase) jouent un rôle important. Une activation constitutive de la voie de signalisation NF-κB dans les cellules de leucémie myéloïde aiguë a été observée. De plus, les médicaments qui inhibent la voie NF-κB induisent l'apoptose des cellules souches leucémiques mais pas des CSN (GUZMAN *et al.*, 2001).

#### **II.1.3.2. Conclusions sur les mécanismes cellulaires à l'origine de la tumeur**

**La cellule souche cancéreuse provient, le plus souvent, de la transformation d'une cellule souche normale (notamment dans les leucémies) ; dans certaines tumeurs, la cellule souche cancéreuse provient d'un progéniteur précoce (Figure 15). La capacité d'autorenouvellement (intrinsèque ou acquise) est un élément-clé dans l'initiation de l'oncogenèse ; l'expansion des CSC permet de former le pool initial de la tumeur.**

Les propriétés de la CSC dépendent à la fois du type de cellule transformée, du type d'altérations génétiques subies et des interactions avec l'environnement de proximité. Ces mécanismes aident à comprendre la pathogenèse tumorale ainsi que les nouvelles approches thérapeutiques envisageables (ZHAO *et al.*, 2008).

#### **II.1.4. Estimation de la fréquence des cellules souches cancéreuses**

L'injection de dilutions en série de cellules mononucléées provenant de patients humains atteints de leucémie myéloïde aiguë (LAM) à au moins quatre souris par dilution a permis de montrer que la **fréquence des cellules souches cancéreuses est très faible** dans les leucémies, variant de 0,02% à 0,0001%. Ce pourcentage des cellules ayant la capacité de se greffer dans la moelle osseuse de souris NOD/SCID ne varie pas en fonction de la catégorie de LAM (M1, M2, etc.), de l'âge ou du sexe des patients (LAPIDOT *et al.*, 1994 ; BONNET et DICK, 1997).

Néanmoins, le pourcentage de cellules capables de se greffer sur un animal immunodéficient dépend du grade ou agressivité de la tumeur : le pourcentage augmente avec le grade (BARABE *et al.*, 2007).

Nous avons vu que, dans les mélanomes, jusqu'à 25% des cellules sont capables de former une tumeur sur l'animal (QUINTANA *et al.*, 2008).

## **II.2. Cellule et microenvironnement de proximité : la niche**

### **II.2.1. Identification de la niche**

Les cellules souches normales expriment pleinement leur potentiel lorsqu'elles se trouvent dans des conditions environnementales appropriées.

#### **II.2.1.1. Découvertes**

L'étude de l'hématopoïèse normale a permis de développer le concept de « niche ». La « niche » des cellules souches hématopoïétiques a été, pour la première fois, évoquée par Schofield en 1978 (SCHOFIELD, 1978 ; MILLER *et al.*, 2005). Des systèmes *in vitro* assurant la prolifération, la différenciation et la survie de populations cellulaires progénitrices différentes ont montré leur dépendance à des facteurs secrétés par d'autres types cellulaires de l'organisme (QUESENBERRY et BECKER, 1998).

#### **II.2.1.2. Définition**

La niche correspond au microenvironnement des cellules souches. Il s'agit de leur « habitat ». La niche participe à la survie et à la protection des cellules souches. Ce site anatomique détermine le potentiel de « normalité » ou de « tumorigénicité ».

#### **II.2.1.3. La niche : composition et rôles**

##### *II.2.1.3.1. Composition*

La niche contient une population de cellules souches en étroite association avec un lit vasculaire comprenant des cellules dérivées du mésenchyme et des molécules de la matrice extracellulaire.

La composition exacte de ce microenvironnement est inconnue. Elle fait l'objet d'études. Les niches regroupent *a priori* :

- Des cellules stromales qui assurent l'architecture de la niche et qui sont en interaction avec les cellules en cours de maturation,
- des cytokines chimioattractantes (ou chimiokines) qui attirent et retiennent un type cellulaire particulier,
- des facteurs de croissance et des cytokines qui promeuvent la différenciation (BMP (*Bone morphogenetic protein*), Wnt, etc.).

Ainsi au cours de son parcours, chaque cellule d'une lignée donnée passe de niche en niche, où elle franchit à chaque étape un stade de différenciation supplémentaire.

##### *II.2.1.3.2. Rôles*

La niche conditionne le devenir de la cellule souche pour le maintien, l'entrée en prolifération, la différenciation et l'apoptose.

## II.2.2. Une niche pour les cellules souches cancéreuses

Les CSC n'agissent pas seules : une coopération étroite et complexe existe avec les cellules de leur environnement. Ces cellules environnantes, non tumorales, forment le stroma associé à la tumeur. Le stroma joue un rôle régulateur en initiant et en maintenant le processus du développement de nombreuses tumeurs (SNEDDON et WERB, 2007).

Nous avons montré dans la partie I.1. que la masse cellulaire interne du blastocyste, composée de cellules non tumorales, est capable de donner naissance à des tératocarcinomes lorsque les cellules qui la composent sont placées dans un environnement ectopique, comme la capsule rénale. Cette observation démontre le rôle déterminant de l'environnement dans la formation des tumeurs.

Ainsi, dans le processus de癌érogenèse, les atteintes intrinsèques, génétiques et les signaux extrinsèques provenant du microenvironnement interagissent.

### II.2.2.1. Le postulat

L'existence d'une niche pour les CSC a été proposée. Cette niche permettrait, comme pour la cellule souche normale, de conserver la capacité d'auto-renouvellement.

### II.2.2.2. Une réalité

Le concept de niche s'applique également aux cellules souches cancéreuses. Ce microenvironnement des CSC a de nombreuses similitudes avec la niche des CSN. Ce lieu de protection est difficile d'accès pour les substances anti-cancéreuses. CALABRESE *et al.* (2007) ont montré que les CSC du cerveau sont localisées dans une niche vasculaire qui secrète des facteurs spécifiques favorisant la croissance cellulaire au long terme ainsi que l'auto-renouvellement des cellules.

### II.2.2.3. La niche des cellules souches cancéreuses : l'importance de l'hypoxie

Une région hypoxique est caractérisée par un apport en oxygène faible. Le développement d'une tolérance à l'hypoxie est associé à un mauvais pronostic pour le patient.

Durant le développement tumoral, l'expansion rapide du cancer crée un microenvironnement hypoxique. Des périodes de réoxygénération consécutives à l'hypoxie promeuvent ensuite la progression tumorale.

La niche des CSC est capable de maintenir des conditions d'hypoxie favorables au développement tumoral. Puisque l'hypoxie est considérée comme un des facteurs majeurs de la niche qui promeut la croissance des tumeurs, LOUIE *et al.* (2010) ont fait l'hypothèse que des cycles d'hypoxie/réoxygénération pourraient jouer un rôle dans l'enrichissement en cellules souches cancéreuses mammaires et fournir un avantage sélectif à la tumeur.

Ils ont utilisé deux lignées cellulaires dérivées de cancer du sein métastatique humain (MDA-MB 231 et BCM2) afin d'optimiser les conditions hypoxiques. Après un cycle d'hypoxie (à 1% d' $O_2$  pendant 7 jours) suivi d'une réoxygénération (d'une durée comprise entre 1 et 3 semaines), une petite population cellulaire survivait à l'hypoxie et pouvait proliférer après réoxygénération. LOUIE *et al.* ont soumis la sous-population survivante à de nouveaux cycles et l'ont analysée par cytométrie de flux. Au premier cycle, 10% des cultures adhérentes sont devenues non adhérentes. Après un nouveau cycle, ce pourcentage est monté à 30% pour atteindre un maximum de 70% au troisième cycle. Autrement dit, le pourcentage de cellules agressives augmente avec le nombre de cycles. La sous-population obtenue présentait le phénotype  $CD44^+CD44^-ESA^+$ , comparable à celui des CSC mammaires.

**Les conditions du l'environnement, de la niche, sont importantes pour la cellule souche cancéreuse. L'hypoxie est un élément de survie de ces cellules. On peut isoler des cellules cancéreuses mammaires hautement métastatiques en utilisant des conditions appropriées de milieu (alternance de cycles d'hypoxie et de réoxygénéation).**

Ces résultats valident l'intérêt des nouveaux systèmes de culture associant hypoxie et réoxygénération. La régulation des CSC dans les lignées cellulaires de cancer du sein par des facteurs de la niche du microenvironnement tumoral est souvent examinée par cette méthode d'enrichissement.

#### **II.2.2.4. La niche responsable de la plasticité fonctionnelle des cellules souches**

Les populations de cellules souches (CS) montrent des capacités remarquables de plasticité suite à des transplantations. En effet, de nombreuses populations de cellules souches transplantées peuvent se reprogrammer. Ceci a deux implications majeures. Tout d'abord, le fait de transplanter une cellule souche au sein d'un autre tissu montre la coopération étroite de la cellule souche avec sa niche ; certaines niches sont favorables à un renouvellement à haute fréquence tandis que dans d'autres niches, les CS sont maintenues à l'état quiescent. Ensuite, on peut imaginer que la niche entretient la plasticité fonctionnelle des CS. Lors d'un processus tumoral, le dommage cellulaire initial est amplifié et entretenu par des signaux provenant de la niche (WATT et HOGAN, 2000).

La protection qu'offre la niche à la cellule souche est le support de cette plasticité fonctionnelle.

#### **II.2.2.5. La niche ou la cellule souche cancéreuse : qui détermine l'autre**

*Est ce que les tumeurs se développent indépendamment du microenvironnement tumoral ?*

La réponse n'est pas claire. L'interrelation entre le microenvironnement et les cellules tumorales est un processus dynamique et complexe, impliquant des interactions réciproques dont le point de départ n'est pas établi. Les implications thérapeutiques de la réponse à cette question sont loin d'être négligeables (voir partie III).

#### **II.2.2.6. Modèles proposés d'interaction entre la cellule souche cancéreuse et son environnement**

Plusieurs modèles sont proposés afin d'expliquer les interactions entre les CSC et la niche.

Un premier modèle suggère que les CSC n'auraient pas besoin d'une niche différente de la niche normale et seraient capables de subsister dans la niche de cellules souches normales. Un autre modèle envisage une niche cancéreuse distincte de la niche normale. Dans ce cas, les CSC dépendraient de la pré-existence d'une niche favorable à leur expansion. Les CSC pourraient aussi fournir des signaux incitant à la formation d'une autre niche quiescente de proximité (par une sorte de piratage) ; cette niche leur enverrait ensuite des signaux indispensables à leur survie. Enfin, on peut aussi imaginer qu'une niche cancéreuse activée favoriserait l'amplification de cellules souches cancéreuses qui pré-existeraient en de très faibles proportions (WATT et HOGAN, 2000 ; SNEDDON et WERB, 2007).

Les interactions des cellules souches avec la niche sont peu connues et donc très hypothétiques. Cette question a des implications thérapeutiques notoires : faut-il combattre la cellule souche cancéreuse ? Sa niche ? Les deux ?

## **II.3. Isolement des cellules souches normales et cancéreuses : deux exemples de méthodologie**

Les cellules souches forment des populations cellulaires extrêmement délicates à isoler. Les méthodes d'enrichissement ou d'isolement sont variées.

Deux méthodes sont récurrentes. La première consiste à enrichir une population cellulaire en identifiant les cellules de la « *Side population* ». La seconde méthode consiste à utiliser des marqueurs membranaires caractéristiques des cellules souches.

### **II.3.1. La méthode *Side Population* (SP)**

#### **II.3.1.1. Définition**

Les populations SP sont enrichies en cellules primitives et indifférenciées. Il s'agit donc d'une source riche en cellules souches et un outil alternatif utile dans les situations dans lesquelles les marqueurs moléculaires des cellules souches ne sont pas connus.

#### **II.3.1.2. Technique d'isolement des SPs**

L'isolement d'une population SP utilise la technique décrite par GOODELL *et al.* (1996). Le colorant Hoechst 33342, un bis-benzimide, se fixe spécifiquement aux molécules d'ADN et permet d'isoler des populations cellulaires en fonction de leur degré de prolifération (G0/G1). On identifie les cellules SP en cytométrie de flux après une coloration par le Hoechst 33342 car elles forment un groupe de cellules distinct des autres cellules. Elles ne présentent en effet pas la fluorescence caractéristique de ce colorant après avoir été mises en contact avec lui. Utilisant cette stratégie, GOODELL *et al.* ont mis en évidence chez la Souris une population de cellules appelée *Side population* (SP), capable de reconstituer l'hématopoïèse à long terme de souris syngéniques létalement irradiées. Cette population SP est une population cellulaire composée de cellules qui ne retiennent pas le Hoechst 33342 et que l'on identifie aisément sur un profil de cytométrie de flux (FACS pour *Flow Activated Cell Sorter*).

Elles ont notamment été décrites dans le système hématopoïétique dans la moelle osseuse (HERZOG *et al.*, 2003). Bien qu'elles ne représentent qu'une petite partie de la population des cellules de la moelle osseuse, leurs propriétés sont très intéressantes. En effet, la SP est enrichie en cellules souches. Une bonne caractérisation des cellules de la SP permet d'améliorer notre compréhension de la biologie des cellules souches. Les cellules de la SP expriment de hauts niveaux de différents membres de la famille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) comme MDR1 (*Multiple drug resistance*) et BCRP (*breast cancer resistance protein*).

Les transporteurs à ATP-binding cassette (ABC) constituent une vaste famille de protéines dont le rôle est le transport unidirectionnel de part et d'autre de la membrane plasmique de diverses molécules (ions, stérols, macromolécules) par hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie.

Plusieurs sous-familles ont été identifiées : ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG. Les ABC les mieux décrits sont ABCB1 (MDR1, P-gp) chez l'Homme et MDR1a/1b chez la Souris, ainsi que ABCG2 (BCRP, MXR) chez l'Homme et BCRP1 chez la Souris, membres respectifs des sous-familles ABCB et ABCG. (HADNAGY *et al.*, 2006).

L'absence de coloration par le Hoechst 33342 est due à un processus actif impliquant des protéines transmembranaires ABC. Le rejet du Hoechst 33342 par les cellules souches fournirait aussi une explication à certaines résistances thérapeutiques. En effet, les transporteurs, **ABCB1 (MDR1)** et **ABCG2** (BCRP, *breast cancer resistance protein*) exprimés par les cellules des populations SP seraient responsables du rejet spécifique de molécules utilisées comme agents actifs de chimiothérapie.

Des populations SP ont été mises en évidence dans de nombreux tissus normaux : les glandes mammaires, le poumon, le muscle, le cœur, le foie, le cerveau et la peau, chez l'Animal et chez l'Homme. Elles ont aussi été identifiées dans des tumeurs et dans des lignées cellulaires dérivées de cancers : des neuroblastomes, des mélanomes et la lignée gliale des cellules C6 dérivée d'une tumeur gliale du Rat (GINESTIER *et al.*, 2007 ; HADNAGY *et al.*, 2006 ; HIRSCHMANN *et al.*, 2004).

### **II.3.1.3. Limites de l'identification des cellules souches par le Hoechst 33342**

Néanmoins, quelques limites de cette méthode doivent être soulignées. Tout d'abord, les populations SP ne recouvrent pas entièrement la population des cellules souches et donc des approches complémentaires sont nécessaires. Ainsi, des recherches de marqueurs moléculaires des cellules souches sont souvent utiles. Les cellules souches hématopoïétiques sont, par exemple, aussi présentes dans des compartiments autres que les populations SP (HADNAGY *et al.*, 2006). Ensuite, la seconde limite de cette méthode d'identification et de purification de CSC est la toxicité du colorant fluorescent Hoechst 33342. Le Hoechst 33342 est toxique pour de nombreux types cellulaires ; il est donc difficile de comparer les propriétés biologiques de cellules qui ont été mises en présence de cette molécule nocive.

### **II.3.1.4. Un exemple : Isolement d'une SP dans le cancer du sein**

La technique utilisée pour isoler les populations SP du cancer du sein est celle qui est utilisée pour isoler les populations SP à partir d'un tissu sain. Elle repose sur la sur-expression de transporteurs à ATP-binding cassette transmembranaires par les cellules souches cancéreuses ; ces transporteurs (ABCG2/BCRP1) expulsent bien des substances pénétrant dans la cellule, en particulier le colorant Hoechst 33342.

Une population SP a été trouvée dans la lignée cellulaire humaine de cancer du sein MCF-7. La population SP ne représentait que 2% de la population cellulaire totale mais elle était la seule qui, lorsqu'elle était injectée à des souris NOD/SCID, était capable de former une tumeur qui reconstituait l'hétérogénéité observée dans la lignée MCF-7 (KONDO *et al.*, 2004).

### **II.3.1.5. Méthode SP : bilan**

L'analyse SP est utilisée pour purifier les populations de cellules souches. Cette méthode ne nécessite pas de connaître des marqueurs caractéristiques des cellules souches.

**Les transporteurs ABC permettent de révéler les populations SP lorsque la méthode de GOODELL *et al.* (1996) est utilisée. Ils sont intéressants car probablement impliqués dans la résistance médicamenteuse de cellules souches cancéreuses.**

## II.3.2. La méthode des marqueurs membranaires caractéristiques : utilisation du phénotype des cellules souches

### II.3.2.1. Quelques marqueurs caractéristiques de la surface membranaire

L'isolement des populations SP ne nécessite pas de connaître des marqueurs cellulaires spécifiques des cellules souches cancéreuses. Pourtant, il est urgent de caractériser le phénotype des CSC afin de les distinguer des autres cellules de façon fiable. La méthode la plus simple et la plus logique est de les isoler par l'utilisation de marqueurs de surface membranaires spécifiques. Cette méthode, bien que théoriquement aisée, est souvent impossible car ces marqueurs ne sont pas connus.

Comme le montre le Tableau 3, des marqueurs membranaires sont décrits pour les CSC de différents cancers. Ces marqueurs membranaires sont souvent partagés par les CSC du tissu tumoral et les CSN du tissu sain ce qui rend l'isolement exclusif des CSC délicat. Cette proximité phénotypique peut être expliquée par les mécanismes à l'origine de la CSC (partie II.1.3.).

L'identification de marqueurs de surface exprimés par les CSC est utile mais insuffisante pour définir une CSC en l'absence d'un test qui vérifie leurs propriétés telles que l'auto-renouvellement. En effet, aucun marqueur utilisé n'est exprimé exclusivement par les cellules souches.

Par exemple, CD133 est utilisé pour identifier des zones enrichies en CSC, mais il est aussi exprimé par les CSN et par de nombreuses cellules non différenciées ou différencierées de tissus sains et tumoraux (SINGH *et al.*, 2003, CHEN *et al.*, 2012). Ainsi, comme pour n'importe quel essai fonctionnel sur les CSN, les CSC doivent être évaluées pour leur capacité d'auto-renouvellement et aussi par leur capacité à former des tumeurs. Le meilleur test pour remplir ces critères reste les transplantations à des animaux immunodéficients, qui bien qu'imparfaits, sont actuellement le « gold standard » (ZHAO *et al.*, 2008).

Puisqu'un petit nombre de cellules, les cellules souches cancéreuses (CSC), est responsable de la tumorigénèse, rechercher les propriétés des CSC est une priorité majeure. En effet, comprendre leurs caractéristiques est un enjeu pour : 1. élucider les mécanismes moléculaires menant au développement d'une tumeur, et 2. développer des stratégies thérapeutiques visant spécifiquement les populations de CSC.

**Ces marqueurs membranaires offrent des indications sur la capacité de cellules qui les expriment à donner naissance à une tumeur après avoir été greffées. Ils ne définissent pas fonctionnellement les CSC. Pour cette raison, les marqueurs membranaires exprimés par les CSC sont l'objet en 2012 de controverses.**

**Tableau 3** : Marqueurs découverts dans certains cancers

Organe	Type de cancer	Marqueurs des CSN	Marqueurs des CSC	Références
<b>Moelle osseuse</b>	Leucémie myéloïde aigue	CD19+/CD34+/CD38-/CD41- D38-/CD41- /CD90- (Thy1)/CD96+ CD117+(kit) CD123- (IL3-R) Lin-	CD19+/CD34+/CD38-/CD41- CD90+ (Thy1)/CD96+/CD117- (kit)/ CD123+ (IL3-R) Lin-	BONNET et DICKS , 1997 ; HOSEN <i>et al.</i> , 2007 ; JORDAN <i>et al.</i> , 2000 ;
<b>Moelle osseuse</b>	Leucémie myéloïde chronique		Flk1+CD31-CD34-	FANG <i>et al.</i> , 2005 ;
<b>Sein</b>	Cancer mammaire	CD24 <sup>med</sup>	CD24-/CD44 <sup>+/low</sup> /ESA <sup>+</sup> /Lin- CD133+ ALDH	AL-HAJJ <i>et al.</i> , 2003 ; GASPARINI, 2010 ;
<b>Système nerveux</b>	Glioblastome, épendymome, méningoblastome	CD133+/Lin-	CD133+, msi-1, Sox 2, melk, PSP, bmi-1, nestin+	OLIVER, WECHSLER -REYA, 2004 ;
<b>Prostate</b>	Cancer de la prostate (sarcome ou carcinome)	Alpha2beta1hi /CD133+/	Alpha2beta1hi /CD44+/CD133+	COLLINS <i>et al.</i> , 2005 ;
<b>Langue, larynx</b>	Cellules squameuses de la tête et du cou	CD44+Lin-	CD44+Lin-	PRINCE <i>et al.</i> , 2007 ;
<b>Pancréas</b>	Cancer pancréatique	CXCR4+/Nestin+	CD24+CD44+EpCAM+ALDH1 +	KAHLERT <i>et al.</i> , 2011 ; SAGIV <i>et al.</i> , 2008 ;
<b>Côlon</b>	Cancer colorectal	CD133+ / CD44+	CD44+/CD133+/CD166+/EpCA M élevé/CD24+	DALERBA <i>et al.</i> , 2007 ; SAGIV <i>et al.</i> , 2008 ; CHEN <i>et al.</i> , 2012
<b>Foie</b>	Cancer du foie	CD133+, EpCAM+	CD45-CD90+CD133+ EpCAM+	YANG <i>et al.</i> , 2008 ; TERRIS <i>et al.</i> , 2010 ;
<b>Poumon</b>	Cancer du poumon	CD133+	CD44+/CD133+/ESA+	ERAMO <i>et al.</i> , 2007 ; TIRINO, 2009 ;
<b>Estomac</b>	Cancer de l'estomac		CD44+/CD133+ ALDH 1	TAKAISHI <i>et al.</i> , 2009 ;
<b>Peau</b>	Mélanome	CD133+/ CD166+/Nestin+	CD20+/CD27+/CD117+/CD120 + CD133+/ CD166+/Nestin+/ABCB5	BOIKO, 2010 FANG, 2005 ; GASPARINI <i>et al.</i> , 2010 ; SCHATTON, 2008
<b>Ovaire</b>			CD44+/CD24-	GASPARINI <i>et al.</i> , 2010 ;

Légende :

**ALDH1** : Aldéhyde déshydrogénase 1 ; **CD** : Cluster de différenciation ; **ESA** : EpCAM, CD326  
**Lin** : Lignage ; **Melk** : *Maternal embryonic leucine zipper kinase* ; **Msi-1** : *Musachi-1* ; **PSP** : Phosphosérine phosphatase ; **Sox 2** : Un facteur de transcription précoce exprimé au niveau des cellules souches normales et du tube neural en développement

## **II.3.2.2. Exemple d'un marqueur de surface caractéristique commun en médecine humaine au service de la médecine vétérinaire**

Les animaux servent de modèles pour la recherche. Le modèle murin est très largement utilisé dans la recherche biomédicale visant une amélioration de la santé de l'Homme. De façon réciproque, les observations faites sur des patients humains sont souvent utiles à la médecine vétérinaire.

Chez l'Homme, les cellules exprimant des hauts niveaux de CD44 ont été identifiées comme de très probables CSC dans un certain nombre de tumeurs humaines (notamment cancers du sein, de la prostate, et du pancréas). Cette observation a permis d'identifier CD44 comme un marqueur potentiel dans des cancers canins (BLACKING *et al.*, 2011). Dans cette recherche, le chien n'est pas utilisé comme un animal modèle, mais comme un patient à part entière, nous développerons cette expérience ci-dessous.

### *II.3.2.2.1. Méthode*

Les scientifiques ont recherché l'expression du marqueur CD44 dans plusieurs lignées cellulaires issues de cancers canins par cytométrie de flux. Les lignées suivantes ont été utilisées : ostéosarcome D17, mélanome CML10, Gliome J3T, carcinome mammaire REM134, hémangiosarcome SB, lymphome B 3132. Les lignées de carcinome mammaire humain MCF-7 et de carcinome mammaire félin Cat-MT ont également été utilisées comme témoins.

Les cellules exprimant des niveaux faible ou élevé du marqueur CD44 ont été étudiées et leurs caractéristiques précisées : croissance, capacité à former des colonies, sensibilité médicamenteuse et profil de cycle cellulaire.

### *II.3.2.2.2. Résultats*

Les lignées cellulaires des différents cancers canins montrent une fréquence élevée en cellules positives à CD44 (BLACKING *et al.*, 2011).

De plus, l'étude des cellules REM134 CD44<sup>high</sup> a révélé une prolifération plus rapide et une capacité de former des colonies plus élevée que les cellules REM134 CD44<sup>low</sup>. La sensibilité médicamenteuse à la doxorubicine était la même.

Enfin, 70,6% des cellules REM134 CD44<sup>low</sup> étaient en phase G0/G1 du cycle, tandis qu'une large fraction (57,6%) des cellules REM134 CD44<sup>high</sup> étaient en phase G2/M du cycle cellulaire.

### *II.3.2.2.3. Conclusion*

**L'expression du marqueur CD44 est associée à une prolifération accrue des cellules en culture dérivées de différents cancers canins. Les cellules CD44<sup>+</sup> sont également plus fréquemment en phase G2/M du cycle cellulaire.**

CD44 pourrait être utilisé comme marqueur chez le chien, de la même manière que pour certains cancers humains afin d'identifier les CSC. Néanmoins, chez le chien, l'expression du marqueur CD44 est transitoire et fluctuante. Cette caractéristique peut limiter sa pertinence comme marqueur de CSC (BLACKING *et al.*, 2011).

## II.4. Conclusion de la deuxième partie

**La cellule à l'origine du cancer est une cellule souche cancéreuse ou un progéniteur très précoce.**

Durant ces dernières années, les scientifiques ont réalisé que la tumorigenèse n'est pas un acte isolé de cellules néoplasiques mais un processus coopératif dans lequel différents types de cellules non néoplasiques interviennent. Ainsi, les cellules souches sont régulées par des facteurs génétiques (programmes, facteurs intrinsèques), des processus épigénétiques (méthylation de l'ADN, remodelage de la chromatine etc.) et des facteurs environnementaux. Ces cellules résidant dans ou à proximité de la tumeur constituent un microenvironnement protecteur appelé la niche. Les modèles de coopération entre cellules souches cancéreuses et niche ne sont à ce jour qu'hypothétiques.

L'isolement des CSC est difficile mais possible par des techniques d'enrichissement (isolement de populations SP) ou de caractérisation (détection de marqueurs de surface).

*Ces propriétés ont des implications thérapeutiques plus que notoires pour les patients humains et animaux.*

# III. Implications du concept des cellules souches cancéreuses : vers des thérapeutiques plus efficaces

Malgré des progrès conséquents en chimiothérapie et radiothérapie et des taux de mortalité qui diminuent grâce à la prévention et une meilleure prise en charge thérapeutique, le cancer reste encore une maladie mal connue, à haute morbidité et mortalité chez l'Homme comme chez les animaux domestiques.

Les cellules souches cancéreuses se divisent extrêmement lentement. Pour cette raison, elles survivent aux thérapies usuelles.

Pour être pleinement efficaces et éviter de reconstituer une tumeur à plus ou moins longue échéance, il faut tenir compte des données sur l'existence des CSC et revoir notre approche thérapeutique du cancer en trouvant de nouvelles stratégies.

Les animaux servent de modèles pour l'étude des implications thérapeutiques ainsi que pour le développement de nouveaux anti-cancéreux qui prennent en considération l'existence de CSC. Néanmoins, les conséquences thérapeutiques sont les mêmes pour les patients humains et pour les animaux en tant que patients. En médecine vétérinaire, l'utilisation d'éventuelles thérapies ciblées peut être limitée par l'aspect financier.

*Cette partie développe les perspectives et s'attache à une réflexion globale sur les implications thérapeutiques ; les découvertes dans le domaine doivent être encore complétées.*

## **III.1. CSC et conséquences thérapeutiques**

L'existence des cellules souches cancéreuses a d'importantes conséquences thérapeutiques : les CSC sont directement responsables du développement tumoral, elles sont liées à l'apparition des métastases, et expliquent en partie les résistances à la chimiothérapie et à la radiothérapie ainsi que les récidives. Elles influencent aussi directement le pronostic clinique des patients. Difficiles à éradiquer, les CSC font l'objet d'une connaissance de l'étendue de leurs potentialités encore imparfaite.

### **III.1.1. Cellules souches cancéreuses et potentiel métastatique**

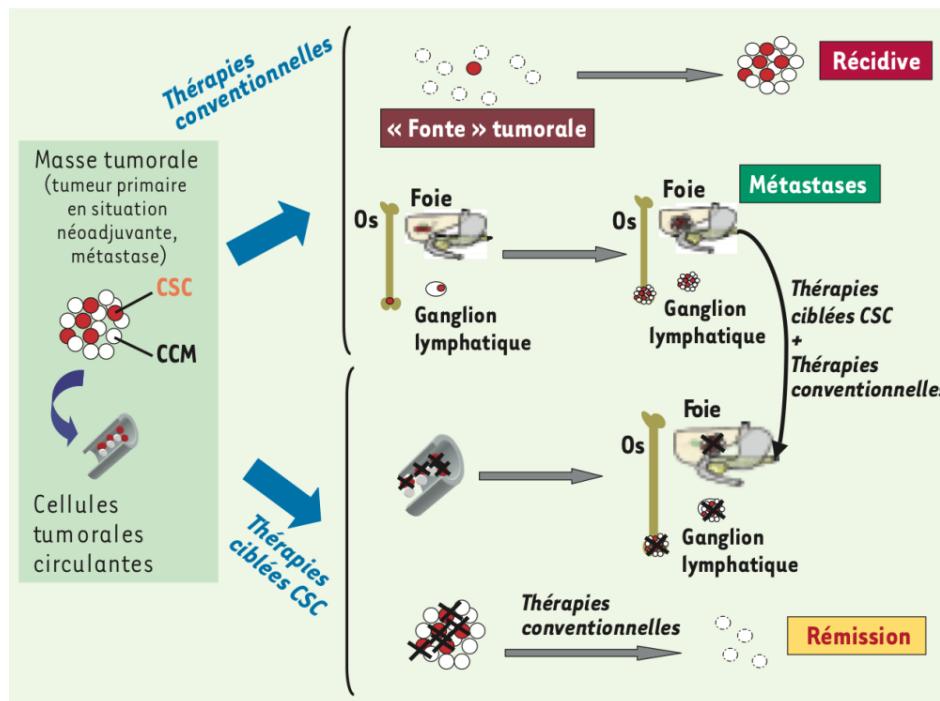
La métastase constitue, sans nul doute, le processus le plus important en oncologie, celui qui est à l'origine de la malignité des cancers et celui qui est le plus mal connu de tous les processus. Les CSC jouent aussi un rôle important dans le potentiel métastatique d'une tumeur. Les études de BALIC *et al.* (2006) ont illustré, en particulier, le potentiel métastatique des CSC mammaires : les CSC ont des propriétés accrues d'invasivité. Ces cellules peuvent être retrouvées dans le sang de patientes atteintes de cancer du sein.

### **III.1.2. Cellules souches cancéreuses et récidive tumorale**

Bien souvent, les cancers récidivent. La théorie des cellules souches explique en grande partie ce problème. La récidive tumorale peut survenir après une phase initiale de réponse thérapeutique avec régression tumorale ou même disparition apparente de la tumeur. Elle est liée au fait que les thérapies utilisées ne ciblent pas les CSC. Ces cellules, même lorsqu'elles persistent en petit nombre, prolifèrent à nouveau pour reconstituer une tumeur et son hétérogénéité phénotypique (Figure 16). La propriété de quiescence expliquée ci-dessous est le facteur majeur de cette rechute cancéreuse.

**Figure 16** : L'hypothèse de la cellule souche cancéreuse face aux thérapies (GINESTIER *et al.*, 2007)

Les thérapies conventionnelles induisent une « fonte » du cancer en ciblant la masse tumorale mais détruisent mal les CSC. Associées aux thérapies conventionnelles, des thérapies spécifiques ciblant les CSC permettraient une rémission complète chez les patients en éliminant l'ensemble des cellules tumorales en situation primaire comme métastatique.



### III.1.3. Cellules souches et traitements usuels

#### III.1.3.1. La chirurgie : un traitement palliatif

La chirurgie a été le premier traitement utilisé contre le cancer, le plus simple et le plus logique : enlever la masse anormale. Cette méthode est aujourd’hui encore la première démarche thérapeutique à envisager avant le traitement « de fond » par les anti-cancéreux.

##### III.1.3.1.1. Un traitement initial important

La chirurgie est une arme très importante pour lutter contre le cancer. Des femmes avec un cancer du sein en phase métastatique ont de meilleures chances de survie quand elles ont subi préalablement une mammectomie (GINESTIER *et al.*, 2007). Une néphrectomie suivie d'une immunothérapie est plus efficace que la seule immunothérapie en termes d'espérance de vie (FLANIGAN *et al.*, 2001).

La résection de la tumeur primitive constitue un cataclysme local qui entraîne une modification de la niche des cellules souches. La chirurgie procure donc de grands bénéfices notamment en terme d'espérance de vie des patients (FLANIGAN *et al.*, 2001) et aussi pour lutter contre l'apparition de métastases. Les modèles actuels de tumorigénèse sont incapables véritablement d'expliquer les bénéfices, même transitoires de la résection d'une tumeur primaire chez des patients atteints.

### *III.1.3.1.2. Un traitement aux effets limités*

Bien souvent, la chirurgie ne présente de bénéfices qu'à court terme. Les tumeurs qui semblent avoir disparu après une chirurgie peuvent réapparaître des mois voire des années après une rémission. Il s'agit de rechutes. Dans ce cas, la tumeur se développe de nouveau au même endroit si l'exérèse n'est pas complète (accident de chirurgie) ou à un autre endroit, lorsque les cellules ont déjà métastasé.

Les CSC seraient responsables de ces rechutes consécutives à une chirurgie. Ces cellules en quiescence se divisent très lentement et il leur est possible de survivre très longtemps. Si l'exérèse est mal faite et qu'il reste des CSC, les CSC reconstitueront la tumeur en lieu et place. Dans le cas des métastases, ce sont les CSC qui en sont responsables (CARMONA-BAYONAS, 2009).

**La chirurgie est un traitement efficace, souvent suffisant si l'exérèse est correctement effectuée mais qui se doit en général d'être complémentaire d'autres traitements. Actuellement, même si la chirurgie est un des premiers gestes réalisés pour freiner le développement tumoral, elle est presque toujours suivie d'une chimiothérapie ou d'une radiothérapie. Les rechutes à terme pourraient s'expliquer par les CSC.**

## **III.1.3.2. Cellules souches cancéreuses et thérapies**

Les thérapies actuelles sont la chimiothérapie et la radiothérapie.

### *III.1.3.2.1. Chimiothérapie : effets et limites*

Avec un essor considérable dans les années 1970, la chimiothérapie consiste en l'usage d'une (monochimiothérapie) ou plusieurs (polychimiothérapie) substance(s) chimique(s) cytotoxique(s). Ces agents anti-cancéreux interfèrent avec la biosynthèse de macromolécules (ADN, ARN, protéines) et inhibent la prolifération cellulaire entraînant la mort cellulaire.

Le concept des CSC a deux conséquences :

- Les CSC ont des mécanismes sophistiqués de résistance aux agents usuels utilisés en chimiothérapie. En effet, les CSC sur-expriment des molécules qui facilitent leur survie par une expulsion active des agents censés les tuer comme les protéines ABC en général et spécifiquement MDR-1 dans l'exemple des tumeurs mammaires.
- La chimiothérapie vise plus spécifiquement les cellules se divisant rapidement ; cette rapidité de division est retrouvée lors du développement anarchique des tumeurs et au sein de cellules saines pourvues de capacités prolifératives élevées. Les CSC se divisant lentement, ne sont pas la cible prioritaire des agents de chimiothérapie. Ainsi, la raison pour laquelle le cancer régresse mais ne disparaît pas, est que les médicaments détruisent les cellules qui se divisent rapidement et constituent la masse tumorale mais ces cellules ne sont pas en fait à l'origine de la tumeur.

**Les cellules souches cancéreuses expliquent pourquoi la chimiothérapie peut avoir des effets limités sur une guérison totale.**

### *III.1.3.2.2. Cellules souches cancéreuses et radiothérapie*

La radiothérapie, technique plus récente que la chimiothérapie, a suscité et suscite encore beaucoup d'espoir : fort taux de survie des patients et effets secondaires plus limités. Traitement médical utilisant des rayonnements ionisants pour détruire les cellules, elle agit de façon loco-régionale en épargnant le tissu sain.

### ***III.1.3.2.2.1. Impact de la radiothérapie sur les cellules souches cancéreuses***

Contrairement à la grande majorité des cellules tumorales, les CSC sont souvent résistantes à la radiothérapie.

#### **III.1.3.2.2.1.1. Deux expériences fondatrices**

La radiorésistance thérapeutique des CSC a été découverte lors d'études sur les cancers du sein (PHILLIPS *et al.*, 2006) et du cerveau (BAO *et al.*, 2006).

PHILLIPS *et al.* (2006) ont étudié le comportement des CSC mammaires vis à vis de la radiothérapie. Ils ont isolé les cellules initiatrices de cancer CD24<sup>-/low</sup>/CD44<sup>+</sup> des lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231. Ils ont observé que 46% des cellules MCF-7 identifiées comme CSC résistaient *in vitro* à l'administration d'une irradiation de 2 Grays alors que 20% seulement des autres cellules étaient résistantes à cette irradiation. Pour les cellules MDA-MB-231, la survie était de 69% pour les cellules identifiées comme CSC contre 50% pour les autres. Les auteurs ont étudié plusieurs causes possibles à même d'expliquer cette radiorésistance. Ils ont montré que la concentration en oxygène et le degré de phosphorylation des histones étaient plus faibles dans les sites anatomiques contenant des CSC.

BAO *et al.* (2006) ont étudié le comportement des CSC du cerveau vis-à-vis de la radiothérapie. En effet, les tumeurs du cerveau notamment le glioblastome, sont des cas d'école et sont tout particulièrement résistants à la radiothérapie.

BAO *et al.* (2006) ont étudié des gliomes (un gliome sur deux est un glioblastome). Les sous-populations exprimant la prominine-1 (CD133<sup>+</sup>) sont enrichies en CSC et ont des capacités à former des tumeurs plus importantes que celle des cellules CD133<sup>-</sup>.

Les expériences de BAO *et al.* (2006) ont montré que :

1. Les radiations détruisaient préférentiellement les cellules CD133<sup>-</sup> et donc après la thérapie, il y avait proportionnellement plus de cellules CD133<sup>+</sup>.
2. Les tumeurs les plus résistantes aux radiations ionisantes étaient enrichies en cellules cancéreuses CD133<sup>+</sup>.

Les scientifiques ont ensuite implanté un pourcentage de cellules tumorales dans le lobe frontal de souris immunodéprimées. Ils ont montré que l'augmentation de la fraction cellulaire en CD133<sup>+</sup> stimulait la croissance tumorale ainsi que la vascularisation de la tumeur.

#### **III.1.3.2.2.1.2. Deux expériences fondatrices : bilan**

Ces deux études suggèrent que la radiorésistance est une propriété générale des cellules souches cancéreuses. Ceci est probablement lié à leur capacité de réparer l'ADN de manière plus efficace que les autres cellules. Cette résistance a une importante conséquence thérapeutique : tant que les cellules souches d'un cancer ne sont pas détruites, le cancer n'est pas guéri. Même si ces cellules souches sont en petit nombre (probablement <1/1000<sup>ème</sup> à 1/100<sup>ème</sup> des cellules présentes dans une tumeur), elles sont difficiles à cibler de façon spécifique.

Dans le cadre des gliomes, les cellules cancéreuses CD133<sup>+</sup> contribuent à la radiorésistance des gliomes et à la repopulation tumorale. L'hypothèse de BAO *et al.* (2006) est que la survie des cellules CD133<sup>+</sup> dépend de protéines qui régulent l'entrée en cycle cellulaire.

Une des perspectives de cette découverte est de cibler les protéines régulatrices des points de contrôle du cycle cellulaire.

### ***III.1.3.2.2. Généralisation***

Les CSC de tous les types tumoraux sont-elle radiorésistantes ? La radiorésistance des CSC observée dans des cultures cellulaires (*in vitro*) et après une xénogreffe chez une souris immunodéficiente (*in vivo*) est-elle aussi une réalité chez les patients humains ? Le pourcentage de CSC présentes dans une tumeur est-il associé au degré de radiosensibilité ? Serait-il possible de développer des agents radio- (ou chimio-) sensibilisants qui ciblent les CSC de manière préférentielle ?

Même si des expériences fournissent des preuves d'une radiorésistance, l'extrapolation n'est pas possible. En effet, le microenvironnement agit, très probablement, positivement ou négativement sur cette capacité de résistance. L'implication réelle des radiations ionisantes sur les CSC devrait être examinée dans un contexte global, sur toutes les tumeurs et idéalement dans des modèles animaux xénogreffés et chez des patients humains.

### ***III.1.3.3. Pourquoi des cellules souches cancéreuses sont-elles résistantes aux traitements communs ?***

Même si tout n'est pas élucidé, quelques hypothèses sont émises. Les cellules souches cancéreuses peuvent résister à la chimiothérapie ou radiothérapie pour plusieurs raisons : modalités de division propres, expression élevée de pompes à efflux, fortes capacités de réparation de l'ADN, et capacité d'entrer en quiescence.

#### *III.1.3.3.1. Modalités de la division cellulaire*

Les CSC se divisent très lentement. La chimiothérapie et la radiothérapie ciblent de préférence les cellules en division rapide et donc peu les cellules souches tumorales qui se divisent peu.

#### *III.1.3.3.2. Une capacité d'entrer en quiescence*

Les CSC ont la capacité d'être en quiescence (entrée en vie ralenti). Elles sont plus souvent quiescentes que les cellules d'amplification transitoire et les cellules plus différenciées. Cette caractéristique les rend moins accessibles aux drogues anti-cancéreuses anti-mitotiques qui visent les cellules se divisant rapidement.

#### *III.1.3.3.3. L'expression exacerbée de pompes à efflux*

Les pompes à efflux sont des mécanismes de transport transmembranaire universellement répandus chez les organismes vivants. Ils ont un rôle-clé dans la physiologie bactérienne et celle des mammifères. Ils servent à préserver l'équilibre physico-chimique du milieu intracellulaire en s'opposant à l'accumulation de substances naturelles ou synthétiques toxiques. Le plus souvent, il y a importation de substances nutritives et exportation de substances toxiques. Leur mode d'expression est inductible ou constitutif.

Pour les CSC, deux possibilités sont envisageables pour expliquer leur résistance. Tout d'abord, des signaux peuvent induire une expression élevée de ces pompes à efflux. Cette expression élevée de pompes à efflux par les CSC a pour conséquence d'exporter les médicaments anti-cancéreux censés les tuer (notamment *via* les transporteurs ABC). Ensuite, des mutations peuvent activer de façon constitutive ces pompes.

### *III.1.3.3.4. Des capacités supérieures de réparation des lésions de l'ADN*

Les CSC peuvent aussi avoir des capacités accrues de réparation de leur matériel génétique. Par exemple, les CSC du cerveau ont des capacités de réparation des dommages causés à l'ADN majorées et ainsi résistent mieux à la radiothérapie et la chimiothérapie (BAO *et al.*, 2006). Dans les leucémies, les malades présentant des CSC ayant des capacités de réparation des dommages à l'ADN particulièrement élevées ont un pronostic vital moins favorable (GENTLES, 2010).

## **III.1.4. Conclusions sur les conséquences thérapeutiques des cellules souches cancéreuses**

**Les CSC sont très difficiles à éradiquer et cela a de nombreuses implications.**

La plupart des propriétés généralement attribuées aux CSN sont conservées chez les CSC. Ces propriétés incluent l'expression de l'activité télomérase, l'activation de voies de signalisation anti-apoptotique, la possibilité d'entrer en quiescence, l'augmentation de l'activité des transporteurs membranaires, des capacités de migration cellulaire, de survie, de résistance à l'hypoxie, et l'absence d'adhérence à un substrat (GINESTIER *et al.*, 2007 ; DEAN *et al.*, 2005). A cela s'ajoutent une expression importante de pompes à efflux et une capacité de réparation de l'ADN exacerbée.

Toutes ces propriétés donnent aux CSC la possibilité de former des métastases et de résister aux traitements anti-tumoraux actuels (chimiothérapie, radiothérapie) (BALIC, 2006). Ceci explique aussi que la chirurgie est une arme limitée aux récidives tumorales fréquentes en tenant compte des CSC.

Les agents de chimiothérapie ciblent en effet surtout les cellules en division rapide : les cellules en cours d'amplification transitoire, mais aussi les progéniteurs surtout tardifs. Le traitement chimiothérapeutique peut montrer une amélioration impressionnante de l'état d'un patient mais, souvent, les rémissions cliniques ne sont que temporaires. De plus, la plupart des cellules souches (et potentiellement les CSC) contiennent des protéines de résistance multiple aux médicaments qui les protègent des agents chimiothérapeutiques et des agressions environnementales. Par exemple, la famille des transporteurs ABC joue un rôle très actif dans la résistance à la chimiothérapie (HADNAGY *et al.*, 2006).

*Si nous ne parvenons pas à concevoir des thérapies ciblant ces cellules capables de se régénérer, les malades continueront à subir des rechutes.*

## III.2. Cibler les cellules souches cancéreuses

Dès lors que la cellule souche cancéreuse est initiatrice de cancer, il est nécessaire de modifier notre approche médicale. Rien ne sert de détruire le cancer sans éradiquer son origine. Il faut se tourner vers des thérapies qui s'attaquent spécifiquement aux CSC en complément de thérapies qui diminuent la masse tumorale. L'avantage de cette thérapie ciblée est double : cible précise et effets secondaires limités.

### III.2.1 Qu'est-ce que la thérapie ciblée ?

Une thérapie ciblant, directement ou non, les CSC semble la voie la plus prometteuse pour lutter contre le cancer, son origine et ses conséquences. On parle de « thérapie ciblée ».

#### III.2.1.1. Définitions

Dans le domaine de l'oncologie, les médecins se sont appropriés le vocabulaire militaire de « cible », terme transcrit récemment en « thérapie ciblée ». Cette notion différencie les agents cytotoxiques non spécifiques (chimiothérapie, radiothérapie) des nouveaux médicaments de la dernière décennie qui privilégient une cible.

On peut définir une **cible comme un « élément que l'on vise de manière spécifique »**. En cancérologie, une cible est potentiellement toute molécule protéique, glucidique ou lipidique d'une cellule. Une cible ne doit pas avoir forcément une fonction importante pour ces cellules.

Néanmoins, toutes ces cibles théoriques n'ont pas les mêmes potentialités thérapeutiques.

#### III.2.1.2. Notion de cible idéale

La notion de « ciblage » concerne d'abord une reconnaissance puis une destruction des cellules tumorales au milieu des cellules saines.

Actuellement, les thérapies dites « ciblées » visent une propriété présente dans l'ensemble des cellules tumorales, qu'elles soient ou non cellules souches cancéreuses. Cette propriété peut, par exemple, être une modification pour une protéine. On espère retrouver cette modification dans toutes les cellules de la tumeur et uniquement dans celles-ci. Néanmoins, les CSC ayant des propriétés accrues de résistance peuvent survivre (HADNAGY *et al.*, 2006).

L'idée est maintenant d'approfondir le concept de thérapie ciblée afin de tenir compte de l'existence des CSC. Il s'agirait, à l'avenir, de cibler spécifiquement les CSC au sein des cellules de la masse tumorale. La cible ne sera donc plus une propriété de la tumeur. L'anomalie qui permet de faire la différence doit être assez spécifique de la CSC pour assurer sa reconnaissance, et, aussi suffisamment déterminante dans le mécanisme tumoral pour que l'atteinte de cette cible puisse détruire la cellule. Satisfaire cette double exigence n'est pas facile. La théorie des CSC offre une approche moins dépendante du cycle cellulaire et des protéines intervenant dans cette régulation.

Les cancers hématologiques et les tumeurs stromales gastrointestinales (GIST) sont, à ce jour, les seuls dans lesquels on a réussi à réunir ces deux conditions. Ceci explique l'efficacité spectaculaire de ces thérapies contre ces cancers (CROOM et PERRY, 2003).

*Schématiquement, les thérapies ciblées, en oncologie, vont soit inhiber des cibles en corrélation avec un processus de survie, soit activer des cibles en lien avec un processus de mort cellulaire.*

### **III.2.1.3. Avantages et inconvénients de la thérapie ciblée en cancérologie des cellules souches**

#### *III.2.1.3.1. Critères déterminants dans l'identification de thérapeutique ciblée*

Différents critères sont déterminants dans l'identification d'une cible thérapeutique optimale. Ces critères participent aux avantages de la thérapie ciblée.

On souligne l'importance des éléments suivants :

- La cible doit être pertinente dans le contexte du cancer.
- La cible doit être validée sur des modèles expérimentaux (modèles transgéniques et xénogreffés).
- L'inhibition de la cible *via* des agents pharmacologiques inhibiteurs de cette cible doit être validée grâce à des expériences.
- Une spécificité vis-à-vis des cellules tumorales et une tolérance vis-à-vis des autres cellules sont nécessaires (nécessité d'un index thérapeutique élevé).
- Une valeur thérapeutique importante.
- Des valeurs potentielles en stratégie multi-modalités (association avec la chimiothérapie, la radiothérapie, les autres thérapies ciblées, la chirurgie *etc.*).

#### *III.2.1.3.2. Difficultés des thérapies ciblées*

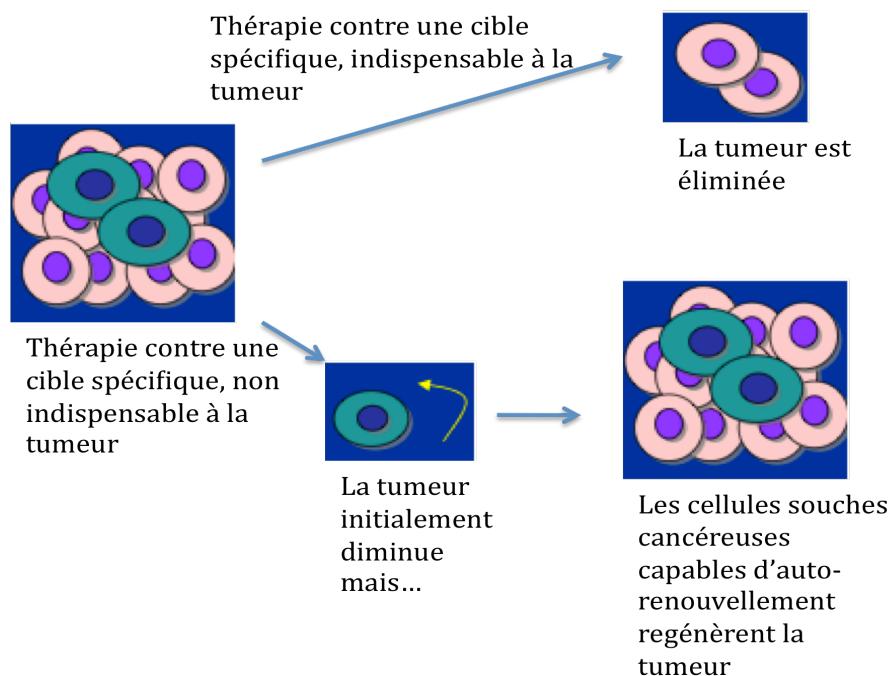
Les inconvénients de la thérapie ciblée sont moindres par rapport aux techniques conventionnelles. Le principal tient à la difficulté de pleinement caractériser les CSC. Ceci résulte de nombreux éléments : facteurs de survie complexes, redondances multiples, rôle ambigu du stroma, plasticité des tumeurs sous la pression de sélection des thérapeutiques, *etc.*

### **III.2.1.4. Garantir la cible pertinente**

En fonction de tous les critères décrits ci-dessus, la recherche d'une cible des plus pertinentes regroupe le plus possible d'éléments optimaux. Dans le cas d'une thérapie mal ciblée, la tumeur régénère à partir des CSC encore présentes (Figure 17) notamment lors de l'utilisation de l'imatinib dans les leucémies de type M3 (MICHOR *et al.*, 2005). La thérapie peut aussi être correctement ciblée mais s'il reste des CSC ayant acquis des propriétés de résistance, la thérapie ciblant l'ensemble de la tumeur ne présente qu'un intérêt limité.

**Figure 17** : La thérapie ciblée

La pertinence de la thérapie ciblée repose sur une cible spécifique. Cette cible doit être importante pour la survie de la tumeur. Inhiber la cible élimine la tumeur. Si la thérapie ne cible pas les CSC, alors, les cellules souches capables d'auto-renouvellement, regénèrent la tumeur.



### III.2.1.5. Extrapolation

Une cible totalement spécifique d'un type tumoral est-elle, pour autant, *idéale*? N'est-il pas plus efficace d'identifier des perturbations communes à de nombreux cancers et contre lesquelles il est possible de fabriquer des médicaments dotés d'un spectre d'action large pour tous les cancers? En d'autres termes, existe-t-il quelques étapes-clés dans le développement tumoral dont le dérèglement soit similaire entre divers cancers?

Ainsi, la voie p53 est altérée dans un très grand nombre de tumeurs. Cette voie est mutée dans environ la moitié des tumeurs de l'Homme. D'autres voies de signalisation comme les voies Hedgehog, Wnt/ $\beta$ -caténine ou NF $\kappa$ B (partie II) pourraient aussi être pertinentes (REYA *et al.*, 2001 ; TAIPALE et BEACHY, 2001 ; CHUNG *et al.*, 2002 ; LESSARD et SAUVAGEAU, 2003 ; ADOLPHE *et al.*, 2004 ; REYA et CLEVERS, 2005).

### **III.2.2. Deux méthodes directes pour cibler les cellules souches cancéreuses**

Deux méthodes peuvent être utilisées : une thérapie de différenciation de la CSC ou une thérapie d'élimination et de prévention (Figure 18).

#### **III.2.2.1. Thérapie de différenciation**

Les cellules souches cancéreuses sont indifférencierées. Certaines stratégies thérapeutiques consistent à forcer leur différenciation qui est bloquée dans certaines tumeurs.

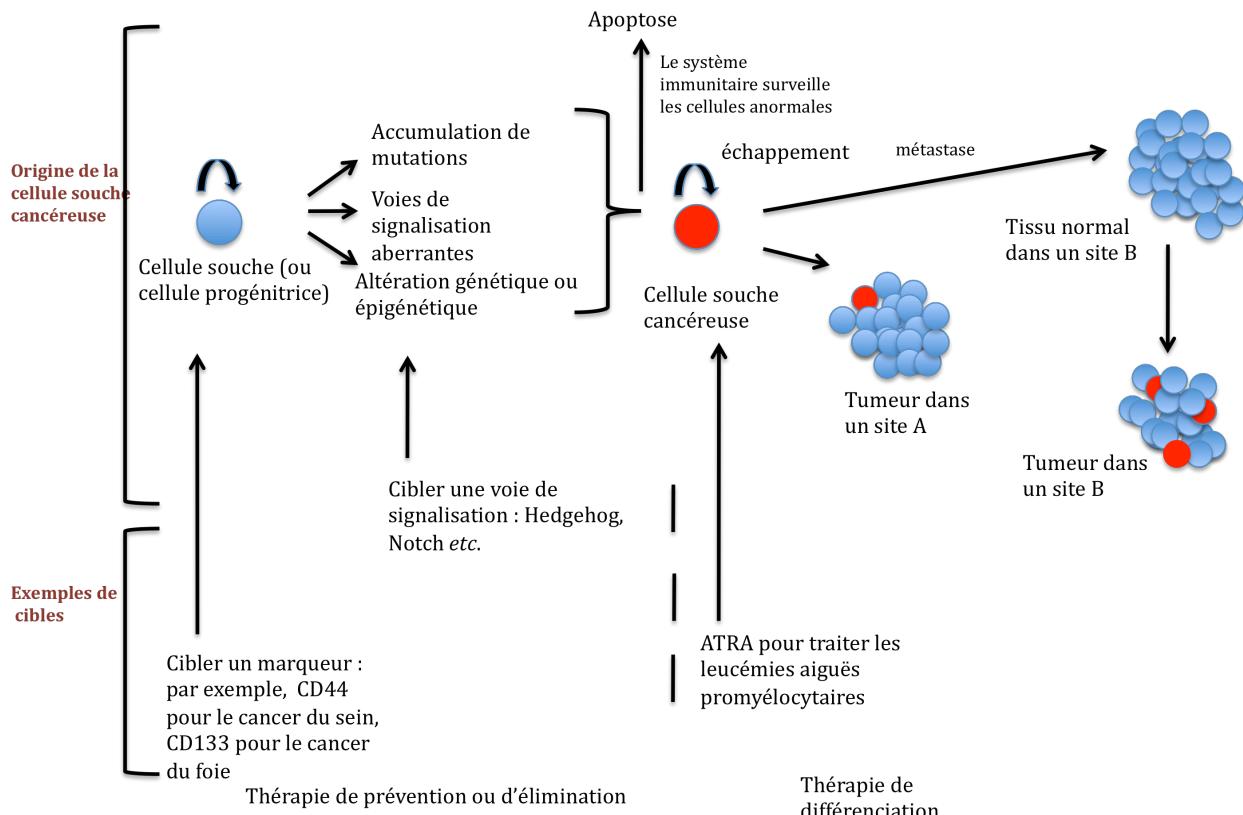
Ce blocage peut concerner une part plus ou moins importante des cellules tumorales, comme c'est le cas dans un type de leucémie myéloïde aiguë (type M3) où les cellules leucémiques non différencierées s'accumulent dans la moelle osseuse. Dans ce cas, par exemple, la différenciation est forcée par l'administration d'acide tout trans-rétinoïque (ATRA, pour *All-trans retinoic acid*), et cette molécule, associée à une chimiothérapie traditionnelle, montre son efficacité en termes de survie sans récidive (TALLMAN *et al.*, 2002), (Figure 18). Cette étape est une « sensibilisation » de la tumeur.

#### **III.2.2.2. Thérapie d'élimination et de prévention**

L'élimination des CSC repose sur les caractéristiques particulières de ces cellules. Ceci inclut la thérapie antigénique qui cible différents éléments du développement des cellules souches et de leur croissance, des thérapies épigénétiques, des agents anti-cancer qui induisent une hypoxie de la tumeur. Soulignons néanmoins des phénomènes de résistance à l'hypoxie dans certains cancers.

**Figure 18** : Exemples de cibles thérapeutiques potentielles en tenant compte de l'hypothèse des cellules souches cancéreuses dans le cas d'une leucémie promyélocyttaire (MILLER *et al.*, 2005)

Quelques exemples de cibles, dans chacun des cas (thérapie de différenciation et une thérapie d'élimination ou de prévention), sont donnés à titre d'exemple pour les leucémies promyélocytaires. Ces deux types de thérapies entrent dans le cadre de la thérapie ciblée.



### III.2.3. Cibler quoi ?

L'intérêt de développer de nouvelles drogues est montré par l'exemple qui suit. Pour les leucémies myéloïdes chroniques, un modèle mathématique a été mis en place afin d'étudier le mécanisme d'action de la drogue imatinib (Glivec<sup>R</sup>). Ce médicament anti-cancéreux a pour cible la kinase BCR-ABL des cellules tumorales. L'imatinib est un bon inhibiteur potentiel de la production de cellules leucémiques potentiellement différencierées mais il est peu efficace sur les populations de cellules non différencierées (MICHOR *et al.*, 2005). Il convient donc, certes de cibler, mais surtout de bien cibler pour que la thérapie soit la plus efficace possible.

Différentes possibilités sont envisageables : on peut cibler directement la CSC selon une des méthodes présentées ci-dessus ou cibler un élément extérieur lié à cette cellule.

Un marqueur spécifique de la CSC peut être visé ; cela s'avère complexe (difficulté d'identification et non connaissance de l'exclusivité de ce marqueur). Un élément des voies de signalisation conduisant à la transformation tumorale peut être visé. La niche, microenvironnement partenaire de la CSC et le réseau angiogénique associé, peuvent être la cible. Enfin, on peut envisager de s'attaquer aux populations SP, populations enrichies *a priori* en cellules primitives et en cellules souches (FERNANDO et HURWITZ, 2003).

### **III.2.3.1. Cibler un marqueur**

Cette stratégie semble la plus logique mais c'est aussi la plus difficile.

#### *III.2.3.1.1. La plus logique*

L'idéal est de trouver des marqueurs qui distinguent les CSC et les CSN. Il suffit alors de cibler ce marqueur de distinction.

Dans les leucémies myéloïdes aiguës, l'administration d'un anticorps monoclonal anti-CD44 a prouvé son efficacité dans la réduction de la population des cellules souches leucémiques et ceci grâce à un modèle de xénogreffes chez la souris NOD/SCID (JIN *et al.*, 2006).

Cette stratégie s'avère aussi efficace dans le cancer du sein. Les cellules tumorales disséminées dans la moelle osseuse (micrométastases) de patientes porteuses d'un cancer du sein ont en grande partie un phénotype de CSC CD44<sup>+</sup>/CD24 (BALIC *et al.*, 2006). Cibler les CSC est une stratégie innovante et constitue une perspective intéressante des thérapies ciblées.

La pertinence clinique de cibler des marqueurs associés aux CSC a été rapportée dans d'autres études : CD24 pour traiter le cancer du côlon et le cancer du pancréas (SAGIV *et al.*, 2008) et CD133 pour les cancers du foie et de l'estomac (SMITH *et al.*, 2008). Les difficultés restent néanmoins importantes.

La première preuve clinique de l'efficacité de cette stratégie est récente. L'administration répétée à un patient humain atteint d'un mélanome à stade avancé d'un anticorps anti-CD20, le rituximab, a apporté la preuve qu'une régression est possible pour des mélanomes réfractaires à la chimiothérapie (SCHLAAK *et al.*, 2012 ).

#### *III.2.3.1.2. La plus difficile*

Cibler un marqueur est très difficile. Pour un certain nombre de cancers, les CSC ont des profils d'expression de marqueurs quasiment identiques à celui des CSN. Par exemple, CD44 est exprimé par les cellules souches mammaires saines et les cellules souches mammaires cancéreuses (AL-HAJJ *et al.*, 2003) ; les cellules souches leucémiques et les cellules souches normales sont toutes deux enrichies en CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> (LAPIDOT *et al.*, 1994). Il est donc très difficile de s'orienter spécifiquement vers des CSC.

Pourtant, les marqueurs de cellules tumorales ne doivent pas être exactement les mêmes que les marqueurs retrouvés sur les cellules normales. Des modèles expérimentaux ont montré que les cellules cancéreuses mammaires de plusieurs modèles murins expriment CD29 à un niveau bien moindre que les cellules souches mammaires normales (SHACKLETON *et al.*, 2006).

Concernant les leucémies, cibler des marqueurs spécifiques de surface comme CD123 (IL3-R $\alpha$ ) semble plus pertinent car cela permet de viser spécifiquement la CSC sans porter atteinte à la CSN. CD33 pourrait aussi être une cible intéressante mais son expression est variable selon les types de leucémie. (GENTLES *et al.*, 2010).

### **III.2.3.2. Cibler des éléments des voies de signalisation**

On peut aussi viser des canaux de communication et des relais de signalisation importants pour la cellule souche tumorale. Par exemple, la voie de signalisation Sonic Hedgehog est largement impliquée dans l'auto-renouvellement des cellules souches. Elle est également activée dans de nombreuses tumeurs.

Dans les tumeurs gliales, l'inhibition de cette voie par interférence ARN (*via* l'injection de vecteurs lentiviraux) ou par un inhibiteur spécifique, la cyclopamine, diminue la croissance et l'auto-renouvellement des tumeurs gliales en comparaison avec un traitement de référence (CLEMENT *et al.*, 2007).

La voie de signalisation Notch est également impliquée dans de nombreuses tumeurs dont les tumeurs mammaires. La voie Notch est une cascade de signalisation qui intervient dans l'auto-renouvellement des cellules souches et bloque leur différenciation. Des inhibiteurs de l'activation des protéines Notch, les inhibiteurs de sécrétases, ont montré leur efficacité pour diminuer la prolifération et promouvoir la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (VUJOVIC *et al.*, 2007).

### **III.2.3.3. Cibler les populations SP**

Les populations SP étant enrichies en cellules primitives et indifférenciées, elles sont considérées comme une source riche et d'accès facile en cellules souches.

L'association d'inhibiteurs des transporteurs ABC et de drogues anticancéreuses a montré une meilleure efficacité thérapeutique que la seule thérapie cytotoxique conventionnelle. La pertinence de cette stratégie est limitée puisqu'il existe des populations SP sans cellules souches, et, des cellules souches qui ne sont pas présentes au sein de populations SP (HADADGY, 2006). De plus, comme les populations SP ne reflètent pas entièrement la cohorte des cellules souches, les cibler détruit aussi des cellules saines.

### **III.2.3.4. Cibler la niche des cellules souches cancéreuses**

Agir sur la cellule souche cancéreuse elle-même de manière directe ou indirecte n'est pas exclusif. On peut aussi agir sur la niche où vivent ces cellules.

#### *III.2.3.4.1. Généralités*

La niche joue un rôle important dans la survie des CSC (partie II). Il est donc pertinent de viser cette niche. La stratégie nécessite de sélectionner un élément qui distingue la niche de la cellule souche tumorale de la niche normale. Cet élément peut être envisagé de bien des façons.

La possibilité de cibler la niche des CSC dépend en grande partie du degré de similarité entre la niche normale et celle des cellules souches cancéreuses. Si les facteurs qui encouragent la survie et la prolifération sont redondants, alors cibler les signaux de la niche cancéreuse pourrait aussi affecter le stock de cellules souches normales et ceci n'est pas le but recherché.

Les réflexions actuelles portent notamment sur l'angiogenèse. Les tissus tumoraux sont généralement caractérisés par une organisation tissulaire chaotique et sont souvent victimes d'un apport vasculaire limité. La niche est, quant à elle, totalement dépendante de la présence d'un apport vasculaire. Puisque la niche protégeant les CSC dépend de l'angiogenèse, une stratégie thérapeutique est de cibler l'endothélium de la niche. Pourtant, ne viserait-on pas aussi la niche normale qui est, elle, bien approvisionnée en apport sanguin ?

Ainsi, des modèles *in vivo* et *ex vivo* sont utiles pour caractériser de manière approfondie la communication cellule/cellule dans la niche cancéreuse et envisager les thérapeutiques les plus appropriées.

A titre d'exemple, un modèle d'intervention est particulièrement bien décrit à l'heure actuelle. Les CSC modifient souvent la physionomie de la niche suite à un excès de production de molécules de signalisation comme le facteur de croissance vasculaire des cellules endothéliales (VEGF, pour *Vascular endothelial growth factor*). Le VEGF a un rôle crucial dans l'angiogenèse, aussi bien en physiologie qu'en pathologie.

### *III.2.3.4.2. Exemple : inhiber l'activité du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), importante pour le maintien de l'intégrité de la niche*

Bloquer l'action du VEGF représente une méthode directe d'inhibition des signaux d'angiogenèse provenant de la niche.

Le bevacizumab (Avastin<sup>R</sup>), anticorps humanisé, se lie au VEGF et réduit sa concentration extracellulaire. Le bevacizumab agit indirectement en inhibant l'action du VEGF en tant que facteur de survie *via* la voie de signalisation PI3K-AKT. L'intérêt du bevacizumab a été montré dans de nombreuses études. Par exemple, dans les carcinomes rectaux, le bevacizumab diminue la perfusion de la tumeur et la densité des microvaisseaux. Douze jours de traitement suffisent pour obtenir une amélioration significative (WILLETT *et al.*, 2004). Le bevacizumab est à utiliser en complément d'une thérapie cytotoxique comme celle basée sur le 5'fluorouracile. La combinaison bevacizumab/5'fluorouracile, a soulevé des espoirs considérables, meilleurs qu'une thérapie traditionnelle. Des applications thérapeutiques à de nombreux types de cancer sont en voie d'exploration (FERNANDO et HURWITZ, 2003).

Un certain nombre d'autres agents comme l'acide 4-acétique 5,6, diméthylxanthénone (DMXAA) et la Combretastatin A-4 phosphate (CA-4P) font l'objet d'études cliniques similaires. Le DMXAA est connu pour induire l'apoptose sélective des cellules endothéliales présentes dans une tumeur bien que le mécanisme d'action ne soit pas élucidé (CHING *et al.*, 2002). La CA-4P agit sur le cytosquelette des cellules tumorales endothéliales et les déforment.

**Ainsi, les agents interrompant les apports vasculaires méritent d'être développés comme traitements complémentaires. L'avenir nous dira la pertinence de cette stratégie.**

## **III.2.4. Conclusion de la thérapie ciblée**

**Avec la chimiothérapie, le cancer dans sa totalité est la cible. L'effet thérapeutique différentiel entre tissu tumoral et tissu sain se fonde sur les capacités prolifératives élevées et le faible niveau de réparation des cellules tumorales par rapport aux cellules normales.**

Actuellement, le but est de détecter le « code barre » d'un cancer : à chaque type de tumeur ses particularités, à chaque type de cellule tumorale sa biologie singulière et ses cibles, à chaque patient sa thérapie ciblée. Ce que l'on cible, dans les thérapies ciblées, c'est l'oncogenèse elle-même et non la prolifération cellulaire. C'est donc la cause de l'anomalie à l'origine d'un cancer, et non plus l'effet qui en résulte, qui est visé.

Il y a de nombreuses possibilités, plus ou moins faciles, plus ou moins délicates, pour s'attaquer aux cellules souches cancéreuses. Schématiquement, en ciblant la CSC, on induit l'apoptose ou on force la différenciation. En ciblant la niche ou une population SP, on espère statistiquement cibler aussi les CSC.

L'avenir est une thérapie qui cible les cellules souches cancéreuses. Cibler les cellules souches cancéreuses est un enjeu majeur dans le traitement des cancers. Il faut ouvrir la voie à des thérapies ciblées sur des propriétés spécifiques des cellules souches : auto-renouvellement, marqueurs de surface spécifiques ou différenciation par exemple.

### **III.3. Les télomérases, biomarqueurs de détection, de pronostic et d'évaluation de l'efficacité thérapeutique**

Parallèlement au développement de nouvelles modalités thérapeutiques, l'utilisation de biomarqueurs appropriés est nécessaire pour détecter les stades précoce de la maladie, suivre une rémission ou une rechute et connaître l'efficacité d'une thérapie. Des biomarqueurs, comme les télomérases, peuvent ainsi être utilisés.

#### **III.3.1. Biomarqueurs : définition et intérêts**

En médecine humaine et vétérinaire, un biomarqueur permet de caractériser une maladie, son stade ou encore l'état de l'organisme. En 1998, les groupes d'étude des Instituts Nationaux de Santé ont défini un biomarqueur comme « une caractéristique qui est objectivement mesurable et évaluabile en tant qu'indicateur de processus biologiques normaux, de processus pathogéniques ou des réponses pharmacologiques suite à une intervention thérapeutique ».

La nécessité de trouver des biomarqueurs dans le domaine du cancer est multiple : détecter les stades précoce de la maladie, détecter une rémission ou une rechute, évaluer un pronostic, et évaluer l'efficacité d'une thérapie. Une détection et une intervention thérapeutique précoce favorisent l'efficacité d'un traitement. La détection du cancer par palpation ou par les techniques d'imagerie (comme la tomodensitométrie, l'IRM et la radiographie) envisagent des diagnostics plus tardifs.

Une étude récente en oncologie vétérinaire souligne le rôle de l'enzyme télomérase ainsi que la longueur des télomères comme biomarqueurs possibles du cancer (PANG et ARGYLE, 2010). Ces traits sont liés aux cellules souches cancéreuses.

#### **III.3.2. Les télomères et la télomérase**

Les télomères sont des complexes nucléoprotéiques que l'on retrouve à chaque extrémité des chromosomes des organismes eucaryotes. Ils « protègent » les chromosomes de leur fusion, de leur recombinaison, ou de la dégradation de l'ADN. Les télomères sont composés d'une répétition de la séquence TTAGGG.

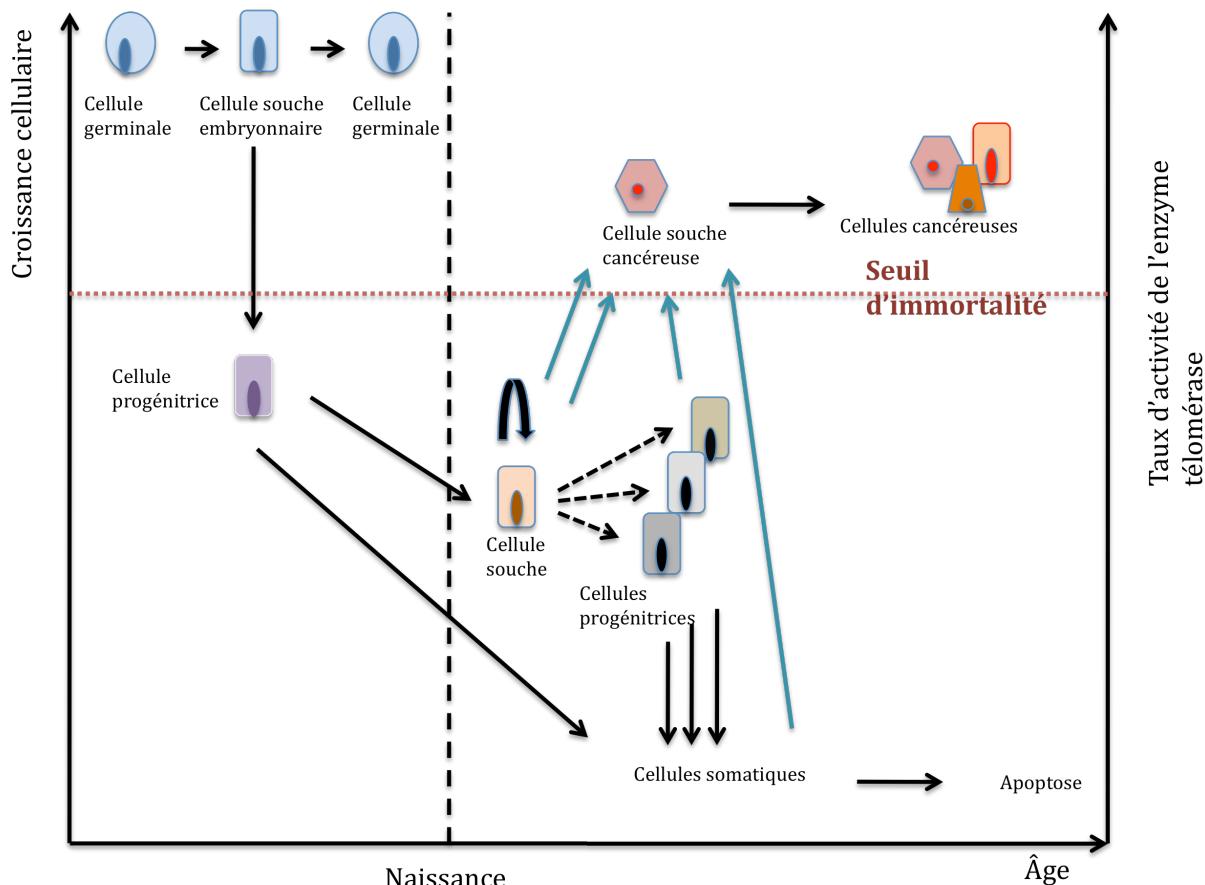
La télomérase est une enzyme qui permet de conserver la longueur des chromosomes en ajoutant une séquence spécifique. Son activité est importante dans les cellules germinales, durant les périodes embryonnaire et foetale. Son activité est moindre dans les cellules somatiques. Dans les cellules cancéreuses, la télomérase a un niveau d'activité très élevé facilitant l'immortalisation et la prolifération cellulaires.

Au fil du temps, les cellules perdent inévitablement leur capacité de proliférer, passent de la jeunesse à la vieillesse dans un état que l'on nomme « sénescence répllicative ». Les cellules sénescantes restent métaboliquement actives mais ne sont pas capables de synthétiser de l'ADN et répondent peu aux facteurs de croissance. Lors de ce vieillissement, les télomères deviennent de plus en plus courts en parallèle d'une diminution de l'activité de la télomérase (voir Figure 19).

**Figure 19** : Illustration de l'activité de la télomérase en relation avec la croissance cellulaire et l'âge (d'après PANG et ARGYLE, 2010)

Les cellules jeunes (CS germinales et les CS embryonnaires) ont des niveaux élevés d'activité de la télomérase. Cette activité diminue au cours du développement.

Les CSC dérivant de CSN sont immortelles avec des capacités exacerbées d'auto-renouvellement et de prolifération ; l'activité de la télomérase y est très forte.



La télomérase a un rôle fondamental au niveau des cellules souches cancéreuses. La télomérase est un facteur important des populations de cellules souches qui pourrait être une cible thérapeutique et un biomarqueur pronostique pertinent. Ce biomarqueur présente l'avantage d'être facile à mettre en évidence (PANG et ARGYLE, 2010).

### III.4. Questions sans réponse

L'existence de cellules souches cancéreuses fait *a priori* consensus au sein de la communauté scientifique.

L'exposé rapporte quelques expériences séminales et vise à donner un panorama global de l'état actuel des connaissances. Néanmoins, ces découvertes sont encore dans leurs balbutiements et de nombreuses questions sont sans réponse. En voici quelques-unes importantes (nous ne parlons pas ici des questions concernant tous les types de mécanismes moléculaires). Les poser formalise déjà les limites auxquelles la science se heurte dans l'avancée de ses connaissances.

### **III.4.1. Lien Médecine humaine/Médecine vétérinaire**

Tout le long du document, aucune distinction n'a été faite entre médecine humaine et médecine vétérinaire. Les deux ont été envisagées comme un tout, des médecines, à la fois proches et complémentaires.

#### **III.4.1.1. L'animal, modèle d'intérêt limité pour une connaissance de la biologie de l'Homme**

La plupart des expériences séminales permettant d'établir la théorie des cellules souches cancéreuses, ainsi que les traitements actuels, sont effectuées sur des modèles animaux. Ces modèles sont beaucoup plus pertinents que les modèles *ex vivo*.

Toutefois, les animaux ne peuvent pas fournir un modèle complet de la maladie humaine. En particulier, chez la souris, dont l'espérance de vie ne dépasse pas deux ans, la rechute tumorale est particulièrement difficile à étudier.

Ce problème n'est pas le seul. On a aussi vu que les marqueurs utilisés chez l'Homme, comme le marqueur CD44, est aussi pertinent chez le Chien mais ce marqueur n'a pas exactement les mêmes fonctions au sein de l'espèce humaine et au sein de l'espèce canine.

Enfin, une des limites dans l'étude des CSC découle des procédures expérimentales. La plupart des souris utilisées sont immunodéprimées ; ainsi, comment peut-on extrapoler des résultats sur des patients ? Il est tout à fait possible que les cellules qualifiées de souches cancéreuses dans ces essais soient aptes à survivre et à s'adapter dans cet environnement murin sans pour autant être des cellules souches *bona fide*. Et inversement...

#### **III.4.1.2. Les cellules souches cancéreuses : des implications similaires pour l'Homme et l'Animal**

Malgré des différences au niveau génétique, moléculaires *etc.*, la théorie des cellules souches cancéreuses a des implications similaires chez l'Homme et l'Animal.

Pourtant, en médecine vétérinaire, les thérapies ciblées sont limitées par l'aspect financier. Les thérapies non spécifiques coûtent déjà chères et sont encore rarement entreprises chez l'animal alors que penser des thérapies spécifiques, encore plus difficiles à mettre en place ?

### **III.4.2. Les questions auxquelles il faudra répondre à l'avenir**

#### **III.4.2.1. Concernant la théorie elle-même**

*Comment identifier les cellules souches cancéreuses et les différencier des cellules souches normales ?*

C'est la question fondamentale, source de tous les fantasmes et espoirs thérapeutiques. Les CSC ont un phénotype très similaire aux CSN. Il faut trouver des marqueurs spécifiques aux cellules souches cancéreuses. Quelques données sont prometteuses (TALLMAN *et al.*, 2002 ; JIN *et al.*, 2006 ; SCHLAAK *et al.*, 2012).

*Ces cellules sont-elles rares ? Dans quelles proportions ?*

Les recherches sur les leucémies ont mis en évidence que la population des cellules souches cancéreuses est de très petite taille. Les mélanomes présentent un nombre de cellules souches cancéreuses beaucoup plus élevé. Le rapport du nombre de cellules souches cancéreuses sur le nombre des cellules constituant la tumeur est-il propre à un type de tumeur? À chaque tumeur? Ou dépend-t-il de la méthode utilisée pour dénombrer les cellules souches cancéreuses? Il existe un consensus pour penser que les cellules souches cancéreuses sont rares.

*Comment différents types de cancer sont-ils produits dans un même organe ?*

Rien n'est clair. Par la conversion maligne de différents types de cellules souches? Par l'acquisition de différentes combinaisons de mutations génétiques au sein du même type de cellules souches? La deuxième hypothèse semble la plus plausible.

*Comment interagissent les cellules souches cancéreuses et la niche?*

Beaucoup de questions restent en suspens concernant le rôle exact de la niche. Quels signaux existent-ils entre l'environnement et la cellule cancéreuse causant la transition d'un épithélium à un tissu mésenchymateux? La niche des cellules souches cancéreuses est-elle capable de reprogrammer les cellules normales en cellules cancéreuses ayant les propriétés d'une cellule souche? Ce qui est sûr, c'est que la niche joue un rôle important et les Grecs n'avaient pas entièrement tort en évoquant une théorie des humeurs (finalement, une théorie de l'environnement).

### III.4.2.2. Concernant les thérapeutiques

*Pourquoi les chimiothérapies traditionnelles n'éradiquent-elles pas à terme les cellules souches cancéreuses?*

Même si les chimiothérapies traditionnelles visent, en priorité, les cellules se divisant rapidement et qu'éliminer les cellules se divisant lentement, comme les cellules souches cancéreuses, est statistiquement moins fréquent, un mystère persiste.

En effet, lorsqu'un tissu est blessé, les cellules souches en réponse à cette perte tissulaire, vont commencer à se diviser plus intensément. Elles augmentent donc leur vitesse de division à chaque application de chimiothérapie. Ainsi, des applications répétées devraient inévitablement diminuer aussi le stock de cellules souches qui sont sorties de leur état de quiescence. Des réponses hypothétiques existent et notamment que la destruction fonctionne mais qu'il existe des résistances acquises.

# CONCLUSION

Les récentes avancées dans le domaine de l'oncologie ont démontré l'existence d'une sous-population de cellules tumorales, les cellules souches cancéreuses, comme ayant un rôle central dans la naissance, la propagation et la résistance des tumeurs ; ces cellules se divisent très lentement.

Les cellules souches cancéreuses ont été virtuellement identifiées dans tous les types de tumeurs humaines et dans quelques tumeurs en médecine vétérinaire. Il s'agit d'une population cellulaire en petit nombre, qui, seule, est capable d'auto-renouvellement et peut expliquer la genèse d'une tumeur.

L'hétérogénéité observée dans les tumeurs est expliquée comme étant le résultat d'un gradient de différenciation.

Les thérapies conventionnelles traitent toutes les cellules tumorales de la même façon. Avec ces thérapies, la tumeur régresse effectivement, mais les cellules initiatrices de cancer ne sont pas toujours atteintes. En effet, elles sont très généralement chimiorésistantes et radiorésistantes et nous assistons quasi immanquablement à une récidive à plus ou moins longue échéance. Le défi des prochaines années est de mettre au point des traitements capables d'éliminer les cellules souches cancéreuses sans affecter les cellules souches normales de l'organisme.

Le ciblage des cellules souches cancéreuses devrait permettre de limiter la croissance de la tumeur et de prévenir les métastases. La compréhension des phénomènes contrôlant la biologie des cellules souches cancéreuses pourrait avoir des conséquences importantes sur le pronostic clinique. La perspective de thérapies ciblant spécifiquement ces cellules souches cancéreuses offre de nouveaux espoirs dans le traitement anti-cancéreux (des essais ont été concluants pour lutter contre le mélanome). Il faudra donc combiner des thérapies ciblant la masse tumorale pour la faire "fondre" à des thérapies qui ciblent les cellules à l'origine du cancer, c'est-à-dire les cellules souches cancéreuses.

Malgré la jeunesse de la théorie et les questions restant à élucider, l'existence des CSC fait l'objet d'un consensus. Cette théorie offre de nouveaux espoirs pour vaincre la maladie.



# BIBLIOGRAPHIE

- ABELEV G.I. (1971). Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv Cancer Res*, **14**, 295-358.
- ADOLPHE C., NARANG M., ELLIS T., WICKING C., KAUR P., WAINWRIGHT B. (2004). An *in vivo* comparative study of sonic, desert and Indian hedgehog pathway activity regulates epidermal stem cell homeostasis. *Development*, **131**, 5009-5019.
- AL-HAJJ M., WICHA M.S., BENITO-HERNANDEZ A., MORRISON S.J. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 3983-3988.
- ANDRIOLE G.L., MULE J.J., HANSEN C.T., LINEHAN W.M., ROSENBERG S.A. (1985). Evidence that lymphokine-activated killer cells and natural killer cells are distinct based on an analysis of congenitally immunodeficient mice. *J Immunol*, **135**(5), 2911-2913.
- BAO S., WU Q., Mc LENDON R.E., HPO Y., SHI Q., HJELMEELAND A.B. *et al.* (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, **444**, 756-760.
- BALIC M., LIN H., YOUNG L., HAWES D., GIUKIANO A., McNAMARA G., *et al.* (2006). Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res*, **12**, 5615-5121.
- BARABE F., KENNEDY J.A., HOPE K.J., DICK J.E. (2007). Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science*, **316**, 600-611.
- BARKER N., RIDGWAY R.A., VAN ES J.H., VAN DE WETERING M., BEGTHEL H., VAN DEER BORN M. *et al.* (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*, **457**, 608-611.
- BISMUTH C. (2008). Les cellules souches chez l'adulte : Applications possibles en médecine vétérinaire. Thèse Méd. Vét., Alfort, n° 103.
- BLACKING T.M., WATERFALL M., ARGYLE D.J. (2011). CD44 is associated with proliferation, rather than a specific cancer stem cell population, in cultured cancer cells. *Veterinary Immunol Immunopath*, **141**, 46-57.
- BOIKO A.D., RAZORENOVA O.V., VAN DE RIJN M., SWETTER S.M., JOHSON D.L., LY D.P. *et al.* (2010). Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature*, **466**, 133-137.
- BONNET D., DICK J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, **3**, 730-737.
- BOSMA G.C., CUSTER R.P., BOSMA M.J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, **301**, 527-530.
- BRUCE W.R., VAN DER GAAG H. (1963). A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation *in vivo*. *Nature*, **199**, 79-80.
- CALABRESE C., POPPLETON H., KOCAK M., HOGG T.L., FULLER C., HAMNER B. *et al.* (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, **11**(1), 69-82.

CARMONA-BAYONAS A. (2009). Surgery and stem cell niches : An Achille's heel of metastatic cancer. *Bioscience Hypotheses*, **2**, 345-349.

CATALANO V., GAGGIANESI M., SPINA V., IOVINO F., DIELI F., STASSI G. *et al.* (2011). Colorectal Cancer Stem Cells and Cell Death. *Cancers*, **3**, 1929-1946.

CHANG L.L., LEE C.H., LEE P., LIN J., HSU C.W., HUNG J.T. (2008). Expression of Globo H and SSEA3 in breast cancer stem cells and the involvement of fucosyl transferases 1 and 2 in Globo H synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**(33), 11667-11672.

CHEN J., GUO T., ZHANG L., QIN L.X., SINGER S., MAKI R.G. *et al.* (2012). CD133 and CD44 are universally overexpressed in GIST and do not represent cancer stem cell markers. *Genes, Chromosomes and cancer*, **51**(2), 186-195.

CHING L.M., SWAIN S., BAGULEY B.C. (2004). Relationship between tumour endothelial cell apoptosis and tumour blood flow shutdown following treatment with the antivascular agent DMXAA in mice. *Br J Cancer*, **90**(4), 906-910.

CHRITIANSON S.W., GREINER D.L., HESSELTON R.A., LEIF J.H., WAGAR E.J., SCHWEIZER *et al.* (1997). Enhanced human CD4+ T cell engraftment in beta $\beta$ -microglobulin-deficient NOD-scid mice. *J. Immunol*, **158**, 3578-3586.

CHUNG E. J., HWANG S.G., NGUYEN P.M., LEE S., KIM J.S., KIM J.W. *et al.* (2002). Regulation of leukemic cell adhesion, proliferation, and survival by beta catenin. *Blood*, **100**, 982-990.

CHUSTECKA Z. (2008). Cancer stem-cell model may need to be reassessed. *Nature*, **456**, 593-596.

CLEMENT V, SANCHEZ P, DE TRIBOLET N., RADOVANOVIC I., RUIZ I ALTABA A. (2007). Hedgehog-gli1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol*, **17**, 165-172.

COLLINS A.T., BERRY P.A., HYDE C., STOWER M.J., MAITLAND N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, **65**, 10946-10951.

CRESPEAU F.L. (2006) *Hématopathologie Générale Les hématopathies malignes animales : syndrome myéloprolifératifs*. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique d'Histologie, Embryologie et Anatomie Pathologique vétérinaire. p.124.

CROOM K.F., PERRY C.M. (2003). Imatinib mesylate : in the treatment of gastrointestinal stromal tumours. *Drugs*, **63**(5), 513-522.

DALERBA P., DYLLA S.J., PARK I.K., LIU R., WANG X., CHO R.W. *et al.* (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 10158-10163.

DAMJANOV I., SOLTER D. (1976). Animal model : embryo-derived teratomas and teratocarcinomas in mice. *Am J Pathol*, **83**(1), 241-244.

DAMJANOV I. (2005). The road from teratocarcinoma to human embryonic stem cells. *Stem Cell Rev Rep*, **1**, 273-276.

DEAN M., FOJO T., BATES S. (2005). Tumour stem cell and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, **5**, 275-284.

ERAMO A., LOTTI F., PILOZZI E., BIFFONI M., DI VIRGILIO A., CONTICELLO C. *et al.* (2007). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*, **15**, 504-514.

ESPINOSA E., CHILLETT P. (2006). Immunologie, Ellipses, sciences de la vie et de la terre.

FANG B., ZHENG C., LIAO L., HAN Q., SUN Z., JIANG X., *et al.* (2005). Identification of human chronic myelogenous leukemia progenitor cells with hemangioblastic characteristics. *Blood*, **105**(7), 2733-2740.

FANG D., NGUYEN T.K., LEISHEAR K., FINKO R., KULP A.N., HOTZ S. *et al.* (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*, **65**, 9328-9337.

FERNANDO N.H., HURWITZ H.I. (2003). Inhibition of vascular endothelial growth factor in the treatment of colorectal cancer. *Semin. Oncol*, **30** (3 Suppl 6), 39-50.

FIALKOW P.J., GARTLER M.S., YOSHIDA A. (1967). Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, **58**, 1468-1471.

FIALKOW P.J., JACOBSON R.J., PAPAYANNOPOULO M.D. (1977). Chronic myelocytic leukemia : clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am. J. Med.* **63**, 125-130.

FIUZA U.M., ARIAS A.M. (2007). Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol*, **194**, 459-474.

FLANAGAN, S.P. (1966). 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res*, **8**, 295-309.

FLANIGAN M.D., ROBERT C., SYDNEY E., SALMON M.D., BRENT A., BLUMENSTEIN *et al.* (2001). Nephrectomy followed by interferon Alfa-2b compared with interferon Alfa-2b alone for metastatic Renal-cell cancer. *N Engl J Med*, **345**, 1655-1659.

GARGETT CE (2007). Uterine stem cells: what is the evidence? *Hum. Reprod. Update*, **13**(1), 87-101.

GASPARINI P., BERTOLINI G., BINDA M., MAGNIFICO A., ALBANO L. TORTORETO M. *et al.* (2010). Molecular cytogenetic characterization of stem-like cancer cells isolated from established cell lines. *Cancer lett*, **296**, 206-215.

GENTLES A.J., PLEVritis S.K., MAJETI R., ALIZADEH A.A. (2010). Association of a leukemic stem cell gene signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA*, **304**(24), 2706-2715.

GILBOA L., LEHMANN R. (2004). How different is Venus from Mars ? The genetics of germ-line stem cells in Drosophila females and males. *Development*, **131**, 4895-4905.

GINESTIER C., KORKAYA H., DONTU G., BIRNBAUM D., WICHA M.S., CHARAFE-JAUFFRET E. (2007). La cellule souche cancéreuse, un pilote aux commandes du cancer du sein. *Médecine/Sciences*, **23**, 1133-1139.

GINESTIER C., HUR M.H., CHARAFFE-JAUFFRET E., MONVILLE F., DUTCHER J., BROWN M. *et al.* (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, **1**, 555-567.

GOODELL M.A., BROSE K., PARADIS G., CONNER A.S., MULLIGAN R.C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, **183**(4), 1797-1806.

GRIMWADE D., ENVER T. (2004). Acute promyelocytic leukemia : where does it stem from ? *Leukemia*, **18**, 375-384.

GUZMAN M.L., NEERING S.J., UPCHURCH D., GRIMES B., HOWARD D.S., RIZZIERI D.A. et al. (2001). Nuclear factor-KB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*, **98**, 2301-2307.

HADNAGY A., GABOURY L., BEAULIEU R., BALICKI D. (2006). SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp Cell Res*, **312**, 3701-3710.

HANABAN D., WEINBERG R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.

HAFNER S., COULOMBEL L. (2009). L'oligarchie contestée des cellules souches cancéreuses. *Médecine/Sciences*, **25**, 227-228.

HERZOG E.L., CHAI L., KRAUSE D.S. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, **102**, 3483-3493.

HIRSCHMAN J.C., FOSTER A.E., WULF G.G., NUCHTERN J.G., JAX T.W., GOBEL U., et al. (2004). A distinct « side population » of cells with drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(39), 14228-14233.

HOSEN N., PARK C.Y., TATSUMI N., OJI Y., SUGIYAMA H., GRALATSKI M. et al. (2007). CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11008-11013.

ITO M., KOBAYASHI K., NAKAHATA T. (2008). NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models. *Curr Top Microbiol Immunol*, **324**, 53-76.

JIN L., HOPE K.J., ZHAI Q., SMADIA-JOFFE F., DICK J.E. (2006). Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*, **12**(10), 1167-1174.

JANOSSY G., GREAVES M.F., REVESZ T., LIDTER T.A., ROBERTS M., DURRANT J., et al. (1976). Blast crisis of chronic myeloid leukaemia (CML). II. Cell surface marker analysis of "lymphoid" and myeloid cases. *Br J Haematol*, **34**(2), 179-192.

JORDAN C.T., UPCHURCH D., SZILVASSY S.J., GUZMAN M.L., HOWARD D.S., PETTIGREW A.L. et al. (2000). The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogeneous leukemia stem cells. *Leukemia*, **14**, 1777-1784.

JORDAN C.T. (2004). Cancer stem cell biology : from leukemia to solid tumors. *Curr Opin cell Biol*, **16**, 708-712.

JORDAN C.T., GUZMAN M.L. (2009). Lessons learned from the study of JunB new insights for normal and leukemia stem cell biology. *Cancer Cell*, **15**(4), 252-254.

KAHLERT C., BERGMANN F., BECK J., WELSCH T., MOGLER C., HERPER E. et al. (2011). Low expression of aldéhyde deshydrogenase 1A1 (ALDH1AA) is a prognostic marker for poor survival pancreatic cancer. *BMC Cancer*, **11**, 275.

KONDO T., SEGUCHI T., TAGA T. (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 781-786.

KRIVTSOV A.V., TWOMEY D., FENG Z., STUBBS M.C., WANG Y., FABER J. et al. (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*, **442**(7104), 818-822.

LAPIDOT T., SIRARD C., VORMOOR J., MURDOCH B., HOANG T., CACERES-CORTES J. et al. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, **367**, 645-648.

LEE C.J., DOSCH J., SIMEONE D.M. (2008). Pancreatic cancer stem cells. *J Clin Oncol*, **26**(17), 2806-2812.

LESSARD J., SAUVAGEAU G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukemic stem cells. *Nature*, **423**, 255-260.

LI C., HEIDT D.G., DALERBA P., BURANT C.F., ZHANG L., ADSAV V. et al. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, **67**, 1030-1037.

LOUIE E., NIK S., CHEN J., SCHMIDT M., SONG B., PACSON C., et al. (2010). Identification of a stem-like cell population by exposing metastatic breast cancer cell lines to repetitive cycles of hypoxia and reoxygenation. *Breast Cancer Res.*, **12**(6), R94.

MARTIN G.R., EVANS M.J. (1975). *Cell*, **2**, 163-172.

MARTIN S.E., MARTIN W.J. (1975). X chromosome-linked defect of CBA/HN mice in production of tumor-reacting naturally occurring IgM antibodies. *J Immunol*, **115**, 502-507.

MC CUNE J.M., NAMIKAWA R., KANESHIMA H. et al. (1988). The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*, **241**, 1632-1639.

MICHOR F., HUGHES T.P., IWASA Y., BANDFORD S., SHAH N., SAWYERS C.L., et al. (2005). Dynamics of chronic myeloid leukaemia. *Nature*, **438**, 1267-1270.

MILLER S.J., LAVKER R.M., SUN T.T. (1993). Keratinocyte stem cells of cornea, skin end hair follicle : common and distinguishing features. *Sem Develop Biol*. **4**, 217-240.

MILLER S.J., LAVKER R.M., SUN T.T. (2005). Interpreting epithelial cancer biology in the context of stem cells : Tumor properties and therapeutic implications. *Biochim Biophys*, **1756**, 25-52.

MINTZ B., ILLMANSEE K. (1975). Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **72**, 3583-3589 21. 22.

NEMOTO Y., MARUO T., SATO T., DEGUCHI T., ITO T., SUGIYAMA H., et al. (2011). Identification of cancer stem cells derived from a canine lung adenocarcinoma cell line. *Vet Pathol*, **48**(5):1029-1034.

NOWELL P.C. et HUNGERFORD D.A. (1961). Chromosome studies in human leukemia. II. Chronic granulocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst*, **27**, 1013-1035.

OLIVER T.G., WECHSLER-REYA R.J. (2004). Getting at the root and stem of brain tumors. *Neuron*, **42**, 885-888.

PANG L.Y., ARGYLE D. (2010). Cancer stem cells and telomerase as potential biomarkers in veterinary oncology. *Vet J*, **185**, 15–22.

PAPAIOANNOU V.E., McBURNEY M.W., GARDNER R.L., EVANS R.L. (1975). Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature*, **258**, 70–73.

PATRAWALA L., CALHOUN T., SCHNEIDER-BROUSSARD R., LI H., BHATIA B., TANG S. *et al.* (2006). Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene*, **25**, 1696–1708.

PHILLIPS T.M., MC BRIDE W.H., PAJONK F. (2006). The response of CD24<sup>-/low</sup>/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J. Natl. Cancer*, **98**, 1777–1785.

PRINCE M., SIVANANDAN R., KACZOROWSKI A., WOLF G.T., KAPLAN M.J., DALERBA P. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cells properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**(3), 973–978.

QUESENBERRY P.J., BECKER P.S. (1998). Stem cell homing : rolling, crawling and nesting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 15155.

QUINTANA E., SHACKLETON M., SABEL M.S., FULLEN D.R., JOHNSON T.M., MORRISON S.J. (2008). Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, **256**, 593–598.

QUIROS R.M., DING H.G., GATTUSO P., PRINZ R.A., XU X. (2005). Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. *Cancer*, **103**(11), 2261–2268.

RECAMIER J.C.A. (1829). Recherches sur le Traitement du Cancer : par la Compression Méthodique Simple ou Combinée, et sur l’Histoire Générale de la Même Maladie. **Paris, Gabon**, p648.

REMAK R. (1854). Ein Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der krebshafter Geschwulste. *Deut Klin*, **6**, 70–174.

REYA T., MORRISON S.J., WEISSMAN I.L. (2001). Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature*, **414**, 105–111.

REYA T., CLEVERS H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, **434**, 843–850.

RICCI-VITIANI L., LOMBARDI D.G., PILOZZI E., BIFFONI M., TODARO M., PESCHLE C. *et al.* (2006). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, **445**, 111–115.

SAGIV E., STARR A., ROZOFSKI U., KHOSRAVI R., ALTEVOGT P., WANG T. *et al.* (2008). Targeting CD24 for treatment of colorectal and pancreatic cancer by monoclonal antibodies or small interfering RNA. *Cancer Res*, **68**(8), 2803–2812.

SAWYERS C.L. (1999). Chronic myeloid leukemia. *N Engl. J Med*, **340**, 1330–1340.

SCHATTON T., MURPHY G.F., FRANK N.Y., YAMAURA K., WAAGA-GASER A.M., GASSER M. *et al.* (2008). Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, **451**, 133–137.

SCHLAAK M., SCHMIDT P., BANGARD C., KURSCHAT P., MAUCH C., ABKEN H. (2012). Regression of metastatic melanoma by targeting cancer stem cells. *Oncotarget*, **3**(1), 22-30.

SCHOFIELD R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, **4**, 7-25.

SEIGEL G.M., CAMPBELL L.M., NARAYAN M., GONZALEZ-FERNANDEZF. (2005), Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma, *Mol Vis*, **11**, 729-737.

SELL S., DUNSFORD H.A. (1989). Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *AM J of Pathol*, **134**(6).

SELL S., PIERCE G.B. (1994). Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest*, **70**(1), 6-22.

SELL S. (2010). On the Stem Cell Origin of Cancer. *AM J Pathol*, **176**(6), 2584-2594.

SHACKLETON M., VAILLANT F., SIMPSON K.J., STINGL J., SMYTH G.K., AASSELIN-LABAT M.L. et al. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, **439**, 84-88.

SINGH S.K., CLARK I.D., TERASAKI M., BONN V.E., HAWKINS C., SQUIRE J. et al. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, **63**(18), 5821-5828.

SINGH S.K., HAWKINS C., CLARKE I.D., SQUIRE J.A., BAYANI J., HIDE T. et al. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, **432**, 396-401.

SMITH L.M., NESTEROVA A., RYAN M.C., DUNIHO S., JONAS M., ANDERSON M. et al. (2008). CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. *Brit J Cancer*, **99**(1), 100-109.

SNEDDON J.B., WERB Z. (2007). Location, location, location : the cancer stem cell niche. *Cell Stem cell*, **6**(1), 607-611.

SUZUKI A., NAKAUCHI H., TANIGUCHI H. (2004). Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes*, **53**, 2143-2152.

SZOTEK P.P., PIERETTI-VANMARCKE R., MASIAKKOS P.T., DINULESCU D.M., CONNOLLY D., FOSTER R. et al. (2006). Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Sci USA*, **103**(30), 11154-11159.

TAI M.H., CHANG C.C., KIUPEL M., WEBSTER J.D., OLSON L.K., TROSKO J.E. (2005). Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **26**(2), 495-502.

TAIPALE J., BEACHY P.A. (2001). The hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, **411**, 349-354.

TAKAISHI S., OKOMURA T., TU S., WANG S.S., SHIBATA W., VIGNESHWARAN R. *et al.* (2009). Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*, **27**, 1006-1020.

TALLMAN M.S., NABBAN C., FEUSNER J.H., ROWE J.M. (2002). Acute promyelocytic leukemia : evolving therapeutic strategies. *Blood*, **99**, 759-67.

TERRIS B., CAVARD C., PERRET C. (2010). EpCAM, a new marker for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* **52**(2) 280-281.

TIRINO V., CAMERLINGO R., FRANCO R., MALANGA D., LA ROCCA A., VIGLIETTO G., *et al.* (2009). The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer, *Eur J Cardiothorac Surg*, **36**(3), 446-453.

ULLOA-MONTOYA F., VERFAILLIE C., HU W-S (2005). Culture systems for pluripotent stem cells. *J. Biosci. Bioeng.*, **100**(1), 12-27.

UNCKUN F.M. (1996). Severe combined immunodeficient mouse models of human leukemia. *Blood*, **88**(4), 1135-1141.

VAN DER LOO J.C., HANENBERG H., COOPER R.J., LUO F.Y., LAZARIDIS E.N., WILLIAMS D.M. (1998). Non obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency (NOD/SCID) Mouse as a Model System to Study the Engraftment and Mobilization of Human Peripheral Blood Stem Cell. *Blood*, **92** (7) 2556-2570.

VRIES R.G., HUCH M., CLEVERS H. (2010). Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol Oncol*, **4**(5), 373-384.

WALKER L.M., HARDY J.D. (1976). Philadelphia chromosome in acute leukemia: case report. *Cancer*, **38**(4), 1619-1624.

WATT F.M., HOGAN B.L.M. (2000). Out of Eden : stem cells and their niches. *Science*, **287**, 1427-1430.

WILLETT C.G., BOUCHER Y., DI TOMASO E., DUDA D.G., MUNN L.L., TONG R.T. *et al.* (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nature*, **10**(2), 145-147.

YANG Z.F., NGAI P., HO D.W., YU W.C., NG M.N., LAU C.K., *et al.* (2008). Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology*, **47**(3), 919-928.

ZHAO R.C., ZHU Y.S., SHI Y. (2008). New hope for cancer treatment : exploring the distinction between normal adult stem cells and cancer stem cells. *Pharmacol Therapeut*, **119**, 74-82.





# **LES CELLULES SOUCHES CANCÉREUSES, ORIGINES DU CANCER ? HYPOTHÈSES, CARACTÉRISTIQUES ET IMPLICATIONS EN MÉDECINE HUMAINE ET VÉTÉRINAIRE**

**NOM et prénom :** JACOLOT Marie

## **Résumé :**

Le cancer est une maladie extrêmement fréquente chez l'Homme et l'Animal. Il est devenu dans l'espèce humaine un enjeu de santé publique.

Une masse tumorale est caractérisée par son hétérogénéité cellulaire, une complexité dont l'origine a été pendant longtemps inconnue.

Des études récentes ont montré que seule une petite fraction des cellules d'une masse tumorale, les cellules initiatrices de cancer ou cellules souches cancéreuses, est à l'origine du processus tumoral. Ces cellules sont capables de s'auto-renouveler, de proliférer et de se différencier selon des voies multiples. Les cellules souches cancéreuses vivent dans un microenvironnement particulier, la niche, qui leur permet de développer leurs pleines potentialités. Les cellules souches cancéreuses ont été découvertes dans les leucémies. Plus récemment, elles ont été identifiées dans de très nombreuses tumeurs solides dont le carcinome mammaire, le glioblastome, le cancer colorectal.

La découverte des cellules souches cancéreuses révolutionne notre approche thérapeutique des cancers et nous engage à préparer de nouveaux traitements pour lutter contre cette maladie dévastatrice.

Ce document synthétise les éléments bibliographiques sur la question disponibles à ce jour.

## **Mots clés :**

**CELLULE SOUCHE CANCÉREUSE / LEUCÉMIE / CANCER / MODÈLE ANIMAL /  
IMMUNODÉFICIENCE / THÉRAPEUTIQUE / THÉRAPIE CIBLÉE / RÉSISTANCE /  
MÉTASTASE / RÉCIDIVE / CHIMIOTHÉRAPIE / RADIOTHÉRAPIE / MÉDECINE  
HUMAINE / MÉDECINE VÉTÉRINAIRE / HOMME / SOURIS**

## **Jury :**

Président : Pr.

Directeur : Pr. Jean Jacques PANTHIER

Assesseur : Dr Fanny PILOT-STORCK

# **CANCER STEM CELLS : INITIATING-CELLS OF CANCER ? HYPOTHESIS, PROPERTIES AND THERAPEUTIC IMPLICATIONS IN HUMAN AND VETERINARY MEDICINE**

**SURNAME and given name :** JACOLOT Marie

## **Summary:**

Cancer is a particularly common disease both in humans and animals. In human medicine, it has become a major public health challenge.

Recent studies have demonstrated that only a subset of cancer cells, named cancer-initiating cells or cancer stem cells, is responsible for tumor creation. These cells own specific properties such as self-renewal, proliferation and multi-lineage differentiation capacities. In addition, cancer-initiating cells live in a specific microenvironment, the niche, which contributes to their survival.

Cancer-initiating cells were discovered by exploring leukemia and then, brought to light in many solid tumors including mammary carcinoma, glioblastoma and colorectal cancer.

The discovery of these cells revolutionizes the therapeutic approach to cancers and urges us to develop new treatments against this devastating disease.

This document summarizes available bibliographic elements concerning this issue.

## **Keywords :**

**CANCER STEM CELL / LEUKEMIA / CANCER / ANIMAL MODEL / IMMUNODEFICIENCY / THERAPEUTICS / TARGETED THERAPY / RESISTANCE / METASTASIS / RELAPSE / CHIMIOTHERAPY / RADIOTHERAPY / HUMAN MEDICINE / VETERINARY MEDICINE / HUMAN / MOUSE**

## **Jury:**

President : Pr.

Director : Pr. Jean Jacques PANTHIER

Assessor : Dr Fanny PILOT-STORCK