Les cellules souches cancéreuses : définition et techniques d'isolement

Christophe Ginestier

La recherche contre le cancer a connu ces vingt dernières années des progrès significatifs dans la compréhension de la maladie. Ces succès ont été guidés essentiellement par le programme « Génome Humain » qui a permis de séquencer l'ADN génomique mais aussi de développer des technologies à haut débit pour l'analyse de l'information génétique. Ces nouveaux outils ont révolutionné la recherche contre le cancer en permettant la cartographie moléculaire des tumeurs. La conséquence directe de ces avancées a été la mise à jour d'une hétérogénéité inter- et intra-tumorale. On peut désormais regrouper les tumeurs d'une même origine tissulaire en plusieurs sous-types moléculaires présentant une évolution clinique différente et nécessitant une prise en charge thérapeutique adaptée. De plus, chaque cellule cancéreuse à l'intérieur d'une même tumeur peut présenter des variations de phénotype et de fonction induisant une diversité cellulaire complexe associée à une réponse thérapeutique différentielle.

De nombreuses études s'accordent à dire que la caractérisation imparfaite de l'hétérogénéité tumorale serait à l'origine des échecs thérapeutiques, de la progression et de la récurrence de la maladie. Il est donc nécessaire de caractériser fonctionnellement toutes les populations cellulaires de la masse tumorale afin de comprendre comment elles interagissent et évoluent ensemble. C'est de ce désir de mieux connaître les sources et les mécanismes de l'hétérogénéité tumorale qu'est né le concept des cellules souches cancéreuses (CSCs).

Modéliser la progression tumorale

Historiquement, le premier modèle de progression tumorale proposé a été le modèle stochastique d'évolution clonale qui suppose que chaque cellule cancéreuse a la capacité de former un clone tumorigène. Ce modèle donne une vision Darwinienne du développement tumoral (15). L'initiation tumorale et sa progression résulteraient de l'acquisition séquentielle de mutations qui sont à l'origine de la formation de clones. Outre les facteurs intrinsèques de la cellule (ses mutations), les facteurs extrinsèques (environnement tumoral, traitements) auraient un rôle dans la sélection clonale (6,11). Il est important de noter que ce modèle souligne l'émergence de nouveaux clones suite aux thérapies et explique ainsi résistance et progression de la maladie.

Depuis la fin des années 1990 ce modèle est challengé par une vision hiérarchique de la masse tumorale. Le modèle hiérarchique se différencie du modèle stochastique en supposant que toutes les cellules tumorales ne sont fonctionnellement pas équivalentes (19). Une seule cellule, la CSC est tumorigène alors que toutes les autres cellules tumorales (non-CSC) sont incapables d'initier et propager la tumeur. Le modèle est dit hiérarchique car la CSC se place au sommet de la pyramide de différenciation tumorale. La CSC possède des

propriétés des cellules souches adultes multipotentes: elle s'auto-renouvelle afin de maintenir le réservoir de CSC et elle se différencie en donnant naissance à l'ensemble des cellules tumorales non-tumorigène. Le modèle des CSC est unidirectionnel: les CSC engendrent les non-CSC alors que les non-CSC sont incapables de générer des CSC.

Dans le modèle hiérarchique, les propriétés fonctionnelles de la CSC seraient à l'origine de l'hétérogénéité intra-tumorale. Les traitements conventionnels cibleraient la masse tumorale composée de non-CSC et épargneraient les rares CSC. Ainsi, les CSC seraient les seules responsables de la résistance, de la rechute et de la progression de la maladie (27). Par conséquent, les thérapies anti-CSC permettraient d'éliminer « la racine du cancer » et assureraient sa rémission complète.

Ces deux modèles de progression tumorale, assez dogmatiques, ont été revisités au début des années 2010 pour aboutir à un modèle hiérarchique d'évolution clonale (11). Il a clairement été démontré que les CSCs constituent une population hétérogène de cellules présentant une diversité génétique responsable de l'organisation oligoclonale de la tumeur. Les CSC acquièrent de nouvelles mutations qui peuvent favoriser l'auto-renouvellement et/ou altérer le pouvoir différenciant de certaines sous-populations de CSC. Ainsi, au cours de la progression tumorale, des nouvelles mutations peuvent conférer un avantage prolifératif à certaine sous-population de CSC.

Si l'hétérogénéité des CSC peut s'expliquer par leur évolution clonale, il est également possible qu'elle s'explique par des événements reprogrammant dans les non-CSC (26). Cette notion est celle de la plasticité cellulaire qui définit les CSC et les non-CSC comme deux états cellulaires. Ainsi, suite à un stress, comme un traitement, les non-CSC pourraient servir de réservoir et réalimenter la population de CSC via une reprogrammation cellulaire. Ce phénomène implique donc que les traitements de demain ciblent à la fois la population de CSC et les mécanismes moléculaires pouvant mener à la conversion de non-CSC en CSC.

La définition d'une CSC: un débat sémantique et conceptuel

Si l'existence des CSC est aujourd'hui démontrée et acceptée pour la grande majorité des cancers hématopoïétiques et solides, la définition de la CSC est débattue et évolue. En effet, si au début des années 2000, le concept des CSC pouvait être schématisé de façon simple, les efforts d'identification des CSC et la compréhension de leur biologie ont aujourd'hui complexifié la définition de la CSC.

La littérature scientifique répertorie plusieurs termes pour désigner les cellules tumorigènes: la cellule souche cancéreuse (« cancer stem cell »), la cellule initiatrice de tumeur (« tumor initiating cell »), la cellule propagatrice de tumeur (« tumor propagating cell »), la cellule maintenant la tumeur (« cancer maintaining cell »), la cellule repeuplant la tumeur (« tumor repopulating cell ») ou encore la cellule cancéreuse ressemblant à une cellule souche (« cancer stem-like cell »). Par conséquent, la confusion règne et nourrit les controverses. Afin de trouver un consensus et délimiter le cadre conceptuel et pratique pour la terminologie des CSC, l'*American Association for Cancer Research* a organisé en 2011 la première réunion de travail sur les CSC (25).

D'un point de vue conceptuel, la confusion est venue du fait que le terme CSC pouvait faire sous-entendre qu'une CSC provenait nécessairement de la transformation d'une cellule souche adulte normale. De plus pour certains « puristes » le terme cellule souche ne doit être réservé qu'à des cellules ayant des propriétés de totipotence/multipotence comme peuvent les avoir les cellules souches embryonnaires. Hors il a clairement été démontré que les CSC ne sont ni exclusivement originaire de la transformation maligne d'une cellule souche adulte normale ni totipotente. Dans un souci de « clarté » certains scientifiques ont alors choisi de renommer les CSC en fonction de leurs propriétés et c'est de cet effort de clarté qu'est née la confusion.

En effet, d'un point de vue opérationnel, les termes autres que CSC donnent une plus grande spécificité sur la technique d'étude utilisée. Le terme « cellule initiatrice de tumeur » (CIT) a été donné aux cellules cancéreuses capables de générer une tumeur lorsque xénogreffées dans des souris immunodéficientes. Le terme « CIT » présente l'avantage d'être un variant aux termes déjà existants dans la littérature (« LTC-IC : long term culture-initiating cell », « M-IC : mammosphere-initiating cell », par exemple) mais ne couvre pas les propriétés fondamentales de la CSC qui sont l'auto-renouvellement et la différenciation. Une cellule non-CSC avec un fort potentiel de prolifération pourrait être considérée comme une CIT et initier une tumeur après une première transplantation sans avoir le pouvoir de maintenir cette capacité au cours de différents passages sériés. Les termes de « long-term cancer propagating » (ou « cancer maintaining ») sont plus en accord avec la définition que l'on veut donner à une CSC. C'est-à-dire une cellule capable de maintenir la croissance tumorale de façon indéfinie. Enfin le terme « cancer stem-like cell » a été réservé aux cellules cancéreuses présentant certains des aspects des cellules souches embryonnaires ou adultes tels que l'expression de facteurs de transcription embryonnaires ou de biomarqueurs sans que cela soit nécessairement associé à une propriété fonctionnelle. Au final, l'absence d'une définition précise du terme cellule souche cancéreuse a provoqué une dérive scientifico-sémantique qui a souvent desservi la cause des « stem cellistes ». Il était donc nécessaire de revenir à une définition consensus.

Des débats sémantiques et conceptuels précédemment évoqués, il ressort finalement que la CSC a une définition fonctionnelle. La CSC est définie par sa capacité à régénérer indéfiniment une tumeur hétérogène. Le pouvoir tumorigène des CSC repose sur la propriété cardinale des cellules souches qui est l'auto-renouvellement. En effet, au cours de la division cellulaire, la CSC peut générer une ou deux CSC (division asymétrique ou symétrique, respectivement) qui conservent leur activité tumorigène.

Techniques d'isolement

Si la définition d'une CSC est une définition fonctionnelle cela implique que les techniques d'isollements soient basées sur cette fonction. Le « gold-standard » admis pour évaluer la présence de CSC est la capacité d'une population cellulaire à maintenir au long terme une tumeur. Les tests les plus utilisés sont soit le traçage cellulaire in vivo (« lineage tracing » ; Cf cours Géraldine Guasch) pour les modèles animaux soit les tests de repopulation chez la souris immunodéficiences pour les cellules tumorales humaines.

Ces tests de transplantation in vivo sont généralement réalisés en dilution limite afin d'évaluer la fréquence de CSC en fonction du nombre de tumeurs formées par rapport au

nombre de cellules implantées. Il faut également réaliser des transplantations sériées afin de démontrer le maintien des capacités tumorigènes au cours du temps, et d'exclure la présence de cellules cancéreuses très proliférantes mais incapables de s'auto-renouveler (11).

Bien que ces tests de transplantation présentent certaines limites (absence de microenvironnement humain, absence de système immunitaire, sélection clonale), ils restent la référence pour le calcul de fréquence de CSC dans une population cellulaire. Ces tests ont notamment permis d'identifier fonctionnellement différents biomarqueurs exprimés par des populations cellulaires enrichies en CSC.

Le premier biomarqueur décrit pour isoler une population enrichie en CSC est une combinaison de trois protéines (CD44, CD24, ESA). A partir de cellules tumorales de patients (tumeurs primaires ou effusions pleurales métastatiques), Al-Hajj et al. ont montré que les cellules tumorigènes du cancer du sein ont un phénotype $CD44^+/CD24^{-/faible}/ESA^+$ (1). Seuls 100 cellules tumorales présentant ce phénotype était capable de recréer une tumeur dans son hétérogénéité phénotypique après injection dans la souris NOD/SCID. A l'inverse 10 000 cellules $CD44^+/CD24^+/ESA^+$ sont incapables de générer de nouvelles tumeurs après réimplantation et cette différence de tumorigénicité été maintenue lors de réimplantation sériées dans de nouveaux animaux. Cette combinaison de biomarqueurs a ensuite été utilisée pour isoler des populations de CSC dans d'autres pathologies telles que le cancer du côlon, ORL, ou du pancréas (3,12,18). D'autres antigènes de surface comme CD133, CD90, ou ABCB5 ont également été identifiés comme de bon marqueur pour la détection et l'isolement des CSCs dans certaines tumeurs solides (16,20,21,23,28)(**Tableau 1**).

En plus des antigènes de surface, des sondes reportrices d'activités enzymatiques ont également été décrites pour isoler les CSCs. La plus utilisées est le BAAA (BODIPY-aminoacetaldehyde) qui permet de détecter les cellules présentant une activité enzymatique de l'ALDH (Aldéhyde déshydrogénase). Cette enzyme est notamment impliquée dans l'oxydation du rétinol en acide rétinoïque qui joue un rôle crucial dans la différenciation cellulaire. Le BAAA est un substrat de l'ALDH qui devient fluorescent lorsqu'il est métabolisé par l'enzyme. Ainsi seules les cellules présentant une activité enzymatique de l'ALDH sont détectables par cytométrie de flux ou microscopie. C'est dans le système hématopoïétique que la détection de l'ALDH a d'abord fait ses preuves comme un marqueur des cellules souches normales et leucémiques (8,9,17). Ces observations ont été généralisées aux tumeurs solides en commençant par le cancer du sein (5), puis celui du colon (10), de l'ovaire (22), ORL (2), ou de l'estomac (14).

Même si d'autres biomarqueurs ont été décrits pour isoler les CSCs (cf **Tableau 1**), l'expression de CD44 et de l'ALDH reste parmi les biomarqueurs les plus utilisés pour l'isolement des CSC dans les tumeurs solides. Il est intéressant de noter que ces marqueurs sont souvent mutuellement exclusifs et qu'ils pourraient définir deux phases cellulaires de la CSC avec les CSC $CD44^+$ qui seraient en phase de migration et les CSC $ALDH^+$ en phase de prolifération (13). En plus de leur utilité pour l'isolement et l'étude des CSCs, ces biomarqueurs peuvent également être utilisé pour la détection des CSCs sur tissus fixés et le transfert du concept des CSC en clinique. Ainsi la présence de cellules $CD44^+$ ou $ALDH^+$ a été démontré comme étant un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (5). Ce type de marquage s'est avéré être un outil efficace pour prédire la réponse à la

chimiothérapie (24) et pourra être un biomarqueur indispensable pour évaluer l'efficacité des traitements anti-CSC de demain.

Tableau 1. Exemples d'études *princeps* décrivant des biomarqueurs de CSC.

Phénotypes des CSCs	Types de tumeur	Références
ESA+/CD44+/CD24-	cancer du sein	Al-Hajj et al., 2003(1)
ESA+/CD44+	Cancer du colon	Dalerba et al., 2007(3)
ESA+/CD44+/CD24+	Cancer du pancréas	Li et al., 2007(12)
CD44+	Cancer ORL	Prince et al., 2007(18)
CD133+	Gliome/Glioblastome/cancer du colon/ cancer du pancréas/Cancer du poumon	Singh et al., 2004(23); O'Brien et al., 2007(16); Ricci-Vitiani et al., 2007(20); Hermann et al., 2007(7); Eramo et al., 2008(4)
ALDH+	Cancer du sein/Cancer du colon/Cancer ORL	Ginestier et al., 2007(5); Huang et al., 2009(10); Clay et al., 2010(2)
ALDH+/CD133+	Cancer de l'ovaire	Silva et al., 2011(22)
ALDH+/CD44+	Cancer du sein/Cancer de l'estomac	Ginestier et al., 2007(5); Nguyen et al., 2016(14)
CD90+	Hépatocarcinome	Yang et al., 2008(28)
ABCB5+	Mélanome	Schatton et al., 2008(21)

Reference List

1. **Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, and M. F. Clarke.** 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100 [doi];0530291100 [pii].
2. **Clay, M. R., M. Tabor, J. H. Owen, T. E. Carey, C. R. Bradford, G. T. Wolf, M. S. Wicha, and M. E. Prince.** 2010. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck*. **32**:1195-1201. doi:10.1002/hed.21315 [doi].
3. **Dalerba, P., S. J. Dylla, I. K. Park, R. Liu, X. Wang, R. W. Cho, T. Hoey, A. Gurney, E. H. Huang, D. M. Simeone, A. A. Shelton, G. Parmiani, C. Castelli, and M. F. Clarke.** 2007. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:10158-10163. doi:0703478104 [pii];10.1073/pnas.0703478104 [doi].
4. **Eramo, A., F. Lotti, G. Sette, E. Pillozzi, M. Biffoni, V. A. Di, C. Conticello, L. Ruco, C. Peschle, and M. R. De.** 2008. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* **15**:504-514. doi:4402283 [pii];10.1038/sj.cdd.4402283 [doi].
5. **Ginestier, C., M. H. Hur, E. Charafe-Jauffret, F. Monville, J. Dutcher, M. Brown, J. Jacquemier, P. Viens, C. G. Kleer, S. Liu, A. Schott, D. Hayes, D. Birnbaum, M. S. Wicha, and G. Dontu.** 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. doi:S1934-5909(07)00133-6 [pii];10.1016/j.stem.2007.08.014 [doi].
6. **Greaves, M. and C. C. Maley.** 2012. Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**:306-313. doi:nature10762 [pii];10.1038/nature10762 [doi].
7. **Hermann, P. C., S. L. Huber, T. Herrler, A. Aicher, J. W. Ellwart, M. Guba, C. J. Bruns, and C. Heeschen.** 2007. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* **1**:313-323. doi:S1934-5909(07)00066-5 [pii];10.1016/j.stem.2007.06.002 [doi].
8. **Hess, D. A., T. E. Meyerrose, L. Wirthlin, T. P. Craft, P. E. Herrbrich, M. H. Creer, and J. A. Nolte.** 2004. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* **104**:1648-1655. doi:10.1182/blood-2004-02-0448 [doi];2004-02-0448 [pii].
9. **Hess, D. A., L. Wirthlin, T. P. Craft, P. E. Herrbrich, S. A. Hohm, R. Lahey, W. C. Eades, M. H. Creer, and J. A. Nolte.** 2006. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood* **107**:2162-2169. doi:2005-06-2284 [pii];10.1182/blood-2005-06-2284 [doi].
10. **Huang, E. H., M. J. Hynes, T. Zhang, C. Ginestier, G. Dontu, H. Appelman, J. Z. Fields, M. S. Wicha, and B. M. Boman.** 2009. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* **69**:3382-3389. doi:0008-5472.CAN-08-4418 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-08-4418 [doi].

11. **Kreso, A. and J. E. Dick.** 2014. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* **14**:275-291. doi:S1934-5909(14)00057-5 [pii];10.1016/j.stem.2014.02.006 [doi].
12. **Li, C., D. G. Heidt, P. Dalerba, C. F. Burant, L. Zhang, V. Adsay, M. Wicha, M. F. Clarke, and D. M. Simeone.** 2007. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* **67**:1030-1037. doi:67/3/1030 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-06-2030 [doi].
13. **Liu, S., Y. Cong, D. Wang, Y. Sun, L. Deng, Y. Liu, R. Martin-Trevino, L. Shang, S. P. McDermott, M. D. Landis, S. Hong, A. Adams, R. D'Angelo, C. Ginestier, E. Charafe-Jauffret, S. G. Clouthier, D. Birnbaum, S. T. Wong, M. Zhan, J. C. Chang, and M. S. Wicha.** 2014. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports* **2**:78-91. doi:10.1016/j.stemcr.2013.11.009 [doi];S2213-6711(13)00149-5 [pii].
14. **Nguyen, P. H., J. Giraud, C. Stadel, L. Chambonnier, P. Dubus, E. Chevet, H. Boeuf, X. Gauthereau, B. Rousseau, M. Fevre, I. Soubeyran, G. Belleanne, S. Evrard, D. Collet, F. Megraud, and C. Varon.** 2016. All-trans retinoic acid targets gastric cancer stem cells and inhibits patient-derived gastric carcinoma tumor growth. *Oncogene* **35**:5619-5628. doi:onc201687 [pii];10.1038/onc.2016.87 [doi].
15. **Nowell, P. C.** 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**:23-28.
16. **O'Brien, C. A., A. Pollett, S. Gallinger, and J. E. Dick.** 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**:106-110. doi:nature05372 [pii];10.1038/nature05372 [doi].
17. **Pearce, D. J., D. Taussig, C. Simpson, K. Allen, A. Z. Rohatiner, T. A. Lister, and D. Bonnet.** 2005. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells* **23**:752-760. doi:23/6/752 [pii];10.1634/stemcells.2004-0292 [doi].
18. **Prince, M. E., R. Sivanandan, A. Kaczorowski, G. T. Wolf, M. J. Kaplan, P. Dalerba, I. L. Weissman, M. F. Clarke, and L. E. Ailles.** 2007. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:973-978. doi:0610117104 [pii];10.1073/pnas.0610117104 [doi].
19. **Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman.** 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**:105-111. doi:10.1038/35102167 [doi];35102167 [pii].
20. **Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle, and M. R. De.** 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**:111-115. doi:nature05384 [pii];10.1038/nature05384 [doi].
21. **Schatton, T., G. F. Murphy, N. Y. Frank, K. Yamaura, A. M. Waaga-Gasser, M. Gasser, Q. Zhan, S. Jordan, L. M. Duncan, C. Weishaupt, R. C. Fuhlbrigge, T. S. Kupper, M. H. Sayegh, and M. H. Frank.** 2008. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* **451**:345-349. doi:nature06489 [pii];10.1038/nature06489 [doi].
22. **Silva, I. A., S. Bai, K. McLean, K. Yang, K. Griffith, D. Thomas, C. Ginestier, C. Johnston, A. Kueck, R. K. Reynolds, M. S. Wicha, and R. J. Buckanovich.** 2011. Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival. *Cancer Res* **71**:3991-4001. doi:0008-5472.CAN-10-3175 [pii];10.1158/0008-5472.CAN-10-3175 [doi].

23. **Singh, S. K., C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano, and P. B. Dirks.** 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**:396-401. doi:nature03128 [pii];10.1038/nature03128 [doi].
24. **Tanei, T., K. Morimoto, K. Shimazu, S. J. Kim, Y. Tanji, T. Taguchi, Y. Tamaki, and S. Noguchi.** 2009. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res* **15**:4234-4241. doi:1078-0432.CCR-08-1479 [pii];10.1158/1078-0432.CCR-08-1479 [doi].
25. **Valent, P., D. Bonnet, M. R. De, T. Lapidot, M. Copland, J. V. Melo, C. Chomienne, F. Ishikawa, J. J. Schuringa, G. Stassi, B. Huntly, H. Herrmann, J. Soulier, A. Roesch, G. J. Schuurhuis, S. Wohrer, M. Arock, J. Zuber, S. Cerny-Reiterer, H. E. Johnsen, M. Andreeff, and C. Eaves.** 2012. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer* **12**:767-775. doi:nrc3368 [pii];10.1038/nrc3368 [doi].
26. **Vermeulen, L., de Sousa e Melo, D. J. Richel, and J. P. Medema.** 2012. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol* **13**:e83-e89. doi:S1470-2045(11)70257-1 [pii];10.1016/S1470-2045(11)70257-1 [doi].
27. **Visvader, J. E. and G. J. Lindeman.** 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* **8**:755-768. doi:nrc2499 [pii];10.1038/nrc2499 [doi].
28. **Yang, Z. F., D. W. Ho, M. N. Ng, C. K. Lau, W. C. Yu, P. Ngai, P. W. Chu, C. T. Lam, R. T. Poon, and S. T. Fan.** 2008. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* **13**:153-166. doi:S1535-6108(08)00009-3 [pii];10.1016/j.ccr.2008.01.013 [doi].