



**HAL**  
open science

# Rôle de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ dans la biologie du glioblastome et dans la résistance aux thérapies anti-EGFR

Anne-Florence Blandin

## ► To cite this version:

Anne-Florence Blandin. Rôle de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  dans la biologie du glioblastome et dans la résistance aux thérapies anti-EGFR. Cancer. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ066 . tel-01424204

**HAL Id: tel-01424204**

**<https://theses.hal.science/tel-01424204>**

Submitted on 2 Jan 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ECOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé**

**Unité de recherche : Faculté de Pharmacie UMR-CNRS-7213**

**THESE DE DOCTORAT présentée par :**

**Anne-Florence BLANDIN**

**Soutenue le 06 Novembre 2015**

En vue de l'obtention du grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : Biologie Cellulaire

***Rôle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans la  
biologie du glioblastome et dans la  
résistance aux thérapies anti-EGFR***

**THESE dirigée par :**

**Mr LEHMANN Maxime**

Pr, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mr MERLIN Jean-Louis**

Pr, Université Nancy-Metz

**Mr LUIS José**

Pr, Université Aix-Marseille

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mr CARREIRAS Franck**

Pr, Université de Cergy-Pontoise

**Mr ALPY Fabien**

Dr, IGBMC, Strasbourg

*A Michèle...*

*« Les passions sont les vents qui enflent les voiles du navire ;  
elles le submergent quelquefois, mais sans elles il ne pourrait  
voguer »*

*Voltaire*

## REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Jean-Louis Merlin, Pr. José Luis, Dr. Fabien Alpy et Pr. Franck Carreiras, d'avoir accepté de juger mon travail et de me faire l'honneur de siéger dans mon jury de thèse.*

*Je remercie également le Pr. Maxime Lehmann, mon directeur de thèse, dont l'exigence m'a fait progresser et qui a su me faire découvrir une science rigoureuse et juste, malgré les embûches et découragements qui n'ont cessé de jalonner ces trois ans de recherche.*

*Mes sincères remerciements aux membres de mon équipe de recherche : Dr Monique Dontenwill, je n'oublierai pas nos discussions scientifiques qui ont aiguisé mon esprit critique, vous m'avez en outre, toujours soutenue et écoutée quelles que soient les circonstances. Dr Sophie Martin, à faire la compétition de bronzage et de vêtements, rien n'aurait été pareil sans toi. Nous avons beaucoup ri mais je n'oublie pas non plus les précieux conseils techniques que tu m'as dispensés dès que j'en ressentais le besoin. Dr Laurence Choulier, tu as toujours été attentive et à l'écoute, nos discussions ont été d'un précieux soutien. Mme Fanny Noulet, toujours agréable et de bonne humeur, merci d'avoir été disponible pour répondre aux nombreuses questions que je n'ai pas manqué de te poser pendant ces trois ans. Dr Isabelle Lelong-Rebel, nos relations ont été plus discrètes mais je retiendrai que vous ne demandez qu'à rendre service si on en formule le besoin. Enfin Dr Nelly Etienne-Selloum, tes questions coriaces lors de nos réunions d'équipe ont toujours été bénéfiques.*

*J'ai une pensée toute particulière pour mes collègues thésards passés et présents, vous avez été un soutien précieux pour ne pas dire indispensable. Dr Anne-Marie Ray et Dr Hana Janouskova auprès de qui j'ai eu l'immense plaisir de travailler pendant ma première année de thèse. Les filles, vous voguez maintenant vers de nouveaux horizons scientifiques, vous ne lirez pas ces lignes, mais merci pour tout ce que vous m'avez transmis. Guillaume Renner, nos relations ont connu des débuts difficiles mais nous avons su nous apprivoiser et nous avons été ravis de nous échapper ensemble du laboratoire pour participer à des congrès ou des formations scientifiques. Marie-Cécile Mercier, je suis toujours ravie des petits papotages du soir que nous partageons ! Et enfin, last but not least, Marion Jenty, collègue les deux premiers mois de notre doctorat, amies et inséparables depuis, nous savons très bien toi et moi ce que nous nous devons...*

*Je remercie les membres du « Journal Club », nos rencontres scientifiques entre étudiants, m'ont permis de développer ma réflexion scientifique dans des thématiques de recherche nouvelles pour moi.*

*Je n'oublie pas l'équipe du Pr Philippe Boucher, Dr Véronique Bruban, Dr Rachel Matz, Dr Jérôme Terrand et Dr Lionel Host. Le partage des lieux a été un vrai plaisir.*

*Enfin, je ne saurai finir sans mentionner le soutien sans égal de ma famille et de mes amis, qui, bien que loin de l'Alsace pour la plupart, ont tous chacun à leur manière, pu me permettre de relativiser mes désillusions et découragements, sentiments qui, s'ils n'existaient pas, feraient perdre de sa saveur au doctorat. Enfin, merci à mes parents, de m'avoir soutenue, encouragée, écoutée, félicitée. Cet appui que je savais indéfectible, a été indispensable à mon équilibre pendant ces trois années de recherche.*

## RÉSUMÉ

Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur cérébrale primaire la plus fréquente. Une dérégulation des voies de signalisation de l'EGFR et un fort potentiel invasif sont les caractéristiques principales du GBM. Malheureusement, les essais cliniques impliquant des thérapies anti-EGFR dans le traitement des GBM demeurent inefficaces. Nous avons précédemment montré que le récepteur de la fibronectine, l'intégrine  $\alpha5\beta1$ , est associé avec un mauvais pronostic et une résistance des patients au temodal. Les intégrines peuvent coopérer avec les récepteurs aux facteurs de croissance et ainsi amplifier leur potentiel oncogénique. Ici, nous avons cherché à déterminer le rôle de l'intégrine  $\alpha5$  dans la résistance aux thérapies anti-EGFR. Utilisant la lignée U87 de GBM, on a dans un premier temps confirmé que l'activation de l'intégrine sous l'influence de la fibronectine, potentialisait la signalisation de l'EGFR. La perte d'expression d' $\alpha5$  sensibilise les cellules U87 aux anti-EGFR (cetuximab, gefitinib) dans des essais de clonogénicité en soft agar. L'expression d'  $\alpha5$  favorise la résistance aux 2 drogues lors de la migration cellulaire. Pour aller plus loin, nous avons développé un nouveau test basé sur la quantification de l'évasion cellulaire à partir d'une sphère tumorale. La perte d'  $\alpha5$  augmente la sensibilité des cellules U87 à 2 TKI réversibles spécifiques de l'EGFR, gefitinib et erlotinib, mais n'a pas d'effet sur l'efficacité du lapatinib, un TKI irréversible ciblant EGFR, ErbB2, ErbB3 et ErbB4. Grâce à la microscopie confocale, nous avons montré l'effet important du gefitinib sur l'endocytose de l'intégrine et de l'EGFR. Ces résultats suggèrent que l'expression d'  $\alpha5$  favorise la résistance aux TKI par l'activation des voies de signalisation des récepteurs ErbB ou en contrôlant le trafic membranaire de l'EGFR. On a aussi montré que pour favoriser l'adhésion cellulaire, l'intégrine  $\alpha5$  stimulait la fibrillogénèse. Dans les cellules migrant à distance de la sphère, l'intégrine  $\alpha5$  est strictement engagée dans des adhésions cellule-substrat contenant la protéine FAK activée. Nos résultats soulignent le rôle central du couple fibronectine/intégrine  $\alpha5$  dans l'invasivité du GBM et la résistance aux thérapies anti-EGFR.

### Mots clés

Lignée cellulaire de glioblastome, intégrine, fibronectine, récepteurs aux facteurs de croissance, résistance aux thérapies ciblées, migration cellulaire, endocytose.

## ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary brain tumor. Alteration of the EGFR pathway and high invasive potential are hallmarks of GBM. Unfortunately, trials using anti-EGFR therapies for the treatment of GBM reveal limited efficacy. We previously showed that overexpression of the fibronectin receptor,  $\alpha 5\beta 1$  integrin, is associated with a poor prognosis for patients and is responsible for chemoresistance to temodal. Integrins can cross-talk with growth factor receptors and amplified their oncogenic activity. Here, we sought to determine the potential role of  $\alpha 5$  integrin in resistance to anti-EGFR therapy. Using U87 GBM cell line, we first confirmed that fibronectin-mediated integrin activation potentiated EGFR signaling. Loss of  $\alpha 5$  integrin expression sensitized U87 cells to anti-EGFR drugs (cetuximab, gefitinib) in soft agar clonogenic assay.  $\alpha 5$  expression can trigger resistance to both drugs on cell migration. To go further, we developed a new assay based on the quantification of cell evasion from tumor spheroids.  $\alpha 5$  depletion increased U87 cell sensitivity to gefitinib and erlotinib, 2 EGFR-selective reversible TKI, but had not effect on lapatinib efficacy, an irreversible TKI that target EGFR, ErbB2, ErbB3 and ErbB4. Confocal microscopy revealed a strong impact of gefitinib on EGFR and integrin endocytosis. These results suggested that  $\alpha 5$  expression may trigger resistance to TKI either by activating ErbB pathways or by controlling EGFR membrane trafficking. We also showed that to promote cell adhesion,  $\alpha 5$  integrin stimulated fibronectin fibrillogenesis. As cells moved away from the spheroids,  $\alpha 5$  became strictly engaged in cell-substratum adhesion sites where it recruited activated FAK. Our work highlights the pivotal role of fibronectin/ $\alpha 5\beta 1$  integrin in invasivity of GBM and resistance to anti-EGFR drugs.

## Key words

Glioblastoma cell line, integrin, fibronectin, growth factor receptors, resistance toward targeted therapies, cell migration, endocytosis

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	2
RÉSUMÉ .....	4
TABLE DES MATIÈRES .....	6
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	10
LISTE DES ABRÉVIATIONS: .....	12
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....	15
INTRODUCTION .....	18
Première partie : Les tumeurs gliales.....	19
1. Caractérisation des gliomes .....	19
1.1. Classification générale .....	19
1.2. Le glioblastome : épidémiologie et diagnostic .....	20
1.3. Traitements conventionnels des glioblastomes .....	21
2. Physiopathologie des gliomes .....	22
2.1. Une instabilité génétique croissante .....	22
2.2. Le caractère hautement invasif du GBM .....	26
Deuxième partie : Les récepteurs aux facteurs de croissance épidermique ErbB1-EGFR-HER1 .....	29
1. Généralités structurales et fonctionnelles de l'EGFR .....	29
1.1. Structure de l'EGFR.....	30
1.2. Activation de l'EGFR .....	32
1.2.1. Les ligands .....	32
1.2.2. Les mécanismes de dimérisation .....	33
1.2.3. Les voies de signalisation activées par l'EGFR dans le glioblastome .....	34
1.3. Trafic intracellulaire de l'EGFR .....	38
1.3.1. Endocytose clathrine-dépendante.....	39
1.3.2. Endocytose clathrine-indépendante.....	40
1.3.3. Devenir des récepteurs internalisés : recyclage ou dégradation .....	41
2. Les mécanismes de dérégulation de l'EGFR dans le glioblastome.....	43
2.1. Amplification du gène de l'EGFR .....	44
2.2. Les mutations de l'EGFR .....	44

2.3. Surabondance des ligands de l'EGFR.....	47
3. Thérapies anti-tumorales ciblant l'EGFR dans les glioblastomes.....	48
3.1. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques.....	48
3.1.1. Mécanisme d'action .....	49
3.1.2 Développement clinique des anticorps monoclonaux dans les gliomes .....	50
3.1.3. Le Cetuximab : des études précliniques aux essais cliniques .....	51
3.2. Les inhibiteurs d'activité tyrosine kinase.....	53
3.2.1. Mécanisme d'action .....	53
3.2.2 Développement clinique des TKI de l'EGFR dans les gliomes .....	53
3.2.3. Le gefitinib : des études précliniques aux essais cliniques .....	55
3.3. Les mécanismes de résistance aux anti-EGFR .....	57
3.3.1. Pénétration insuffisante des drogues dans la masse tumorale.....	57
3.3.2. L'hétérogénéité génétique intratumorale .....	59
3.3.3. L'EGFR nucléaire.....	61
Troisième partie : Les intégrines .....	63
1. Les intégrines, récepteurs de l'adhérence cellulaire.....	63
1.1. Généralités .....	63
1.2. Les mécanismes d'activation des intégrines.....	66
1.3. Structure d'une plaque d'adhérence .....	68
1.4. Le trafic intracellulaire des intégrines .....	69
1.3.1 Les différents mécanismes d'internalisation des intégrines .....	69
1.3.2 Le devenir des intégrines internalisées.....	71
2. Les intégrines, facteurs d'agressivité dans les tumeurs gliales .....	72
2.1. Le rôle des intégrines dans la migration et l'invasion tumorale.....	73
2.2. Les récepteurs de la fibronectine, comme cibles thérapeutiques prometteuses.....	74
2.2.1. La fibronectine.....	74
2.2.2. L'intégrine $\alpha\beta3$ .....	75
2.2.3. L'intégrine $\alpha5\beta1$ .....	76
2.2.4. Développement des antagonistes de l'intégrine $\alpha5\beta1$ .....	76
2.3. Les mécanismes de régulation des récepteurs aux facteurs de croissance par les intégrines.....	79
2.3.1. Coopération des intégrines $\beta1$ et de l'EGFR lors de la progression tumorale.....	81
2.3.2. Les intégrines $\beta1$ comme facteur de résistance aux thérapies anti-EGFR.....	82
2.3.3. Le rôle des intégrines $\beta1$ dans le trafic intracellulaire de l'EGFR.....	84
2.3.4. Coopération des intégrines $\beta1$ et de l'EGFR dans les gliomes .....	85
LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE .....	86

MATÉRIEL ET MÉTHODE .....	88
1. Modèles cellulaires .....	89
2. Transfection et tri cellulaire.....	89
3. Signalisation et analyse par immunoblot.....	90
4. Test d'adhérence cellulaire.....	91
5. Test d'étalement cellulaire .....	92
6. Prolifération cellulaire .....	92
7. Test clonogénique en soft agar .....	92
8. Migration en chambre de Boyden .....	93
9. Formation de sphéroïdes tumoraux .....	93
10. Migration collective à partir de sphéroïdes tumoraux .....	94
11. Immunofluorescence et microscopie confocale.....	94
12. Analyses statistiques .....	95
RÉSULTATS PARTIE 1 .....	96
Etude du rôle l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la résistance des glioblastomes aux thérapies anti-EGFR .....	97
1. Coopération de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et de l'EGFR dans des lignées cellulaires de glioblastome ...	97
1.1. Expression différentielle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et de l'EGFR dans trois lignées de GBM .....	97
1.2. L'adhérence des cellules de GBM à la fibronectine augmente la signalisation de l'EGFR .....	99
2. Impact de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur la signalisation de l'EGFR dans les cellules de GBM .....	101
2.1. Caractérisation de la lignée U87MG .....	101
2.2. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ augmente la réponse signalétique des cellules U87MG après stimulation à l'EGF103	
3. Etude de la coopération $\alpha 5\beta 1$ /EGFR sur la croissance des cellules U87MG.....	105
4. Etude de la coopération $\alpha 5\beta 1$ /EGFR lors de la survie des cellules de GBM .....	108
5. Etude de la coopération $\alpha 5\beta 1$ /EGFR sur la migration par chimiotactisme des cellules U87MG	
.....	110
6. Etude de la potentialisation des co-traitements ciblant l'EGFR et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ .....	113
6.1. Potentialisation des traitements ciblant l'EGFR et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur la survie clonogénique des	
cellules U87 $\alpha 5+$ .....	113
6.2. Potentialisation des traitements ciblant l'EGFR et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur la migration des cellules U87	
$\alpha 5+$ .....	116
7. Impact des anti-EGFR sur la signalisation croisée $\alpha 5\beta 1$ /EGFR.....	118
8. Etude de la résistance aux anti-EGFR dans un modèle d'évasion à partir de sphères tumorales	
.....	121
9. Etude de l'impact du gefitinib sur la localisation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et de l'EGFR lors de la	
migration cellulaire à partir de sphéroïdes tumoraux U87MG .....	128

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	135
RÉSULTATS PARTIE 2 : ARTICLE .....	153
Modélisation <i>in vitro</i> du rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans le potentiel invasif du glioblastome .....	154
BIBLIOGRAPHIE.....	184

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1:</b> Les altérations génétiques dans la progression des gliomes. ....	23
<b>Figure 2 :</b> Modèle hypothétique de la progression du GBM .....	27
<b>Figure 3:</b> Structure des récepteurs ErbB .....	30
<b>Figure 4:</b> Modèle d'activation du domaine intracellulaire de l'EGFR .....	31
<b>Figure 5:</b> Le ratio 2:2 du dimère EGF-EGFR : structure cristallographique des molécules .....	33
<b>Figure 6:</b> Schématisation des 3 principales voies de signalisation de l'EGFR dans le glioblastome.....	35
<b>Figure 7:</b> Modèle d'endocytose de l'EGFR clathrine-dépendante .....	39
<b>Figure 8:</b> Internalisation et tri endosomal de l'EGFR. ....	42
<b>Figure 9:</b> Les mécanismes de dérégulation de l'EGFR dans le GBM. ....	45
<b>Figure 10:</b> Les mécanismes de résistance aux thérapies anti-EGFR identifiés dans le GBM.....	58
<b>Figure 11:</b> La grande famille des intégrines et leurs ligands .....	64
<b>Figure 12:</b> Représentation schématique de la structure des intégrines .....	65
<b>Figure 13:</b> Activation des intégrines.....	67
<b>Figure 14:</b> Architecture multi protéique d'un point focal d'adhérence cellulaire. ....	68
<b>Figure 15:</b> Voies canoniques d'endocytose des intégrines. ....	71
<b>Figure 16:</b> Les différents mécanismes d'interaction des intégrines avec les récepteurs aux facteurs de croissance (GFR) lors de l'activation des voies de signalisation intracellulaire.....	79
<b>Figure 17:</b> Expression différentielle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et de l'EGFR dans trois lignées de GBM.....	98
<b>Figure 18:</b> L'adhérence des cellules de GBM à la fibronectine augmente la signalisation de l'EGFR. ....	100
<b>Figure 19:</b> Caractérisation des lignées U87 $\alpha 5+$ et U87 $\alpha 5-$ .....	102
<b>Figure 20:</b> L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ augmente la réponse signalétique des cellules U87MG après stimulation à l'EGF. ....	104
<b>Figure 21:</b> L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ n'influence pas le potentiel cytotoxique des anti-EGFR lors de la croissance sur plastique des cellules U87MG.....	107
<b>Figure 22:</b> La survie clonogénique des cellules U87MG en présence de cetuximab est dépendante du niveau d'expression d' $\alpha 5\beta 1$ .....	109
<b>Figure 23:</b> L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ augmente la migration par chimiotactisme des cellules U87MG et la résistance aux anti-EGFR.....	111
<b>Figure 24:</b> Action synergique des traitements ciblant l'EGFR et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur la survie clonogénique des cellules U87 $\alpha 5+$ .....	115
<b>Figure 25:</b> Action synergique des traitements ciblant l'EGFR et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur la migration des cellules U87 $\alpha 5+$ .....	117
<b>Figure 26:</b> Impact de l'adhérence des cellules U87 $\alpha 5+$ à la fibronectine sur l'efficacité du cetuximab à inhiber la voie de signalisation de l'EGFR.....	119
<b>Figure 27:</b> L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ module différemment la sensibilité aux anti-EGFR selon la classe thérapeutique d'anti-EGFR utilisée lors de la migration collective des cellules U87MG. ....	123
<b>Figure 28:</b> L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ module différemment la sensibilité aux anti-EGFR selon la classe thérapeutique d'anti-EGFR utilisée lors de la migration collective des cellules U87MG. ....	126
<b>Figure 29:</b> Le gefitinib augmente la localisation intracellulaire de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et de l'EGFR lors de la migration des cellules U87MG. ....	129
<b>Figure 30:</b> Le gefitinib induit une translocation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ des adhésions focales dans des vésicules intracellulaires lors de la migration collective des cellules U87 $\alpha 5+$ . ....	131
<b>Figure 31:</b> La migration des cellules U87 $\alpha 5+$ est dépendante de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en présence de gefitinib....	133

<b>Figure 32:</b> Le gefitinib maintient la coopération de l'EGFR actif et de l'intégrine $\beta 1$ dans des compartiments intracellulaires lors de la migration des cellules U87 $\alpha 5+$ mais pas lors de la migration des cellules U87 $\alpha 5$ .. ...	144
<b>Figure 33:</b> Le gefitinib maintient la coopération de l'EGFR actif et de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans des vésicules intracellulaires de petite taille en périphérie du noyau cellulaire. ....	146
<b>Figure 34:</b> Existence d'un complexe $\alpha 5$ /EGFR dans des compartiments intracellulaires des cellules U87MG. .	149
<b>Figure 35:</b> Modèle proposé des mécanismes moléculaires pouvant expliquer le rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la résistance des cellules U87MG aux anti-EGFR.....	151
<b>Tableau 1:</b> Nomenclature internationale simplifiée des différentes catégories d'anticorps monoclonaux.....	49
<b>Tableau 2:</b> Liste non exhaustive d'anticorps monoclonaux anti-EGFR en essais cliniques dans les gliomes .....	51
<b>Tableau 3:</b> Liste non exhaustive d'inhibiteurs de tyrosine kinase en essais cliniques dans les gliomes.....	55

## ***LISTE DES ABRÉVIATIONS:***

**A**CGH: Array Comparative Genomic Hybridization

ADAM: A Disintegrine And Metalloprotease

ADCC: Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity

ADMIDAS: Adjacent Metal Ion-Dependant Adhesion Site

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AP2 : clathrin Adaptator Protein complex-2

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

**B**CRP : Breast Cancer Resistant Protein

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

**C**BNPC : Cancer Bronchique Non à Petites Cellules

Cbl: Casitas-B lineage Lymphoma

CDK2: Cyclin Dependant Kinase 2

CDKI: Cyclin Dependant Kinase Inhibitor

CSG: Cellules Souches de Glioblastome

**E**GFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EEA1: Early Endosome Antigen-1

ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport

**F**AK: Focal Adhesion Kinase

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization

FRET: Forster Resonance Energy Transfer

**G**AP: GTPase Activating Protein

GBM: Glioblastome Multiforme

GEF: Guanine nucleotid Exchange Factor

GFP: Green Fluorescent Protein

Grb-2: Growth Factor Receptor Bound-protein 2

GDP: Guanine DiPhosphate

GTP: Guanine Triphosphate

**HB**-EGF: Heparin Binding EGF like Growth Factor

HER: Human Epidermal growth factor Receptor

**I**C50: half maximal inhibitory concentration

IDH: Isocitrate DeHydrogenase

ILK: Integrin Linked Kinase

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

**J**AK: Janus Kinase

**K**O: KnockOut

**L**IBS: Ligand Induced Binding Sites

**M**APK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MEC: Matrice ExtraCellulaire

MEK: Mitogen-activated Extracellular signal – regulated Kinase

MGMT: O-6-MethylGuanine-DNA MethylTransferase

MIDAS: Metal Ion-Dependant Adhesion Site

MMP: MetalloProteinases

mTOR: Mammalian Target Of Rapamycin

**O**MS: Organisation Mondiale de la Santé

**P**DGF: Platelet-Derived Growth Factor

PDGFRA: Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha polypeptide

PDK1: Phosphoinositide Dependant-Kinase 1

PI3K: Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase

PTEN: Phosphatase and TENSin homolog

**RB:** RetinoBlastoma

RTK: Receptors Tyrosine Kinase

**SNARE:** Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

SRC-1: Spheroids Receptor Coactivator-1

**TCGA:** The Cancer Genome Atlas

TCPTP: T Cell Protein Tyrosine Phosphatase

TEM: Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TGF- $\alpha/\beta$ : Transforming Growth Factor-  $\alpha/\beta$

TKI: Tyrosine Kinase Inhibitor

TIMP-2: Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-2

TIRF: Total Internal Reflexion Fluorescence

**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor

## LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### Publications:

**Glioma sphere evasion model revealed a dual function for  $\alpha 5$  integrin** (Manuscript en préparation)

Blandin AF, Renner G, Choulier L, Vauchelles R, Rondé P, Noulet F, Etienne-Selloum N, Lelong-Rebel I, Martin S, Dontenwill M, Lehmann M

**$\beta 1$  integrins as therapeutic targets to disrupt hallmarks of cancer.** *Frontiers in Pharmacology* (2015).

Blandin AF, Renner G, Lelong-Rebel I, Martin S and Dontenwill M

**Caveolin-1-negative head and neck squamous cell carcinoma primary tumors display increased epithelial to mesenchymal transition and prometastatic properties.** *Oncotarget* (2015)

Jung A, Ray AM, Ramolu L, Macabre C, Simon F, Noulet F, Blandin AF, Renner G, Lehmann M, Choulier L, Kessler H, Abecassis J, Dontenwill M and Martin S

**Integrin  $\alpha 5\beta 1$  and p53 convergent pathways in the control of anti-apoptotic proteins PEA-15 and survivin in high grade glioma.** *Cell death and differentiation* (2015)  
Renner G, Janouskova H, Noulet F, Koenig V, Guerin E, Bär S, Nuesch J, Rechenmacher F, Neubauer S, Kessler H, Blandin AF, Choulier L, Etienne Selloum N, Lehmann M, Lelong-Rebel I, Martin S and Dontenwill M

**Single cell tracking assay reveals an opposite effect of selective small non-peptidic  $\alpha 5\beta 1$  or  $\alpha \nu \beta 3/\beta 5$  integrin antagonists in U87MG glioma cells.** *Biochim Biophys Acta* 2014

Ray AM, Schaffner F, Janouskova H, Noulet F, Rognan D, Lelong-Rebel I, Choulier L, Blandin AF, Lehmann M, Martin S, Kapp T, Neubauer S, Rechenmacher F, Kessler H, Dontenwill M

**Communications orales:**

**Role of alpha5beta1 integrin in resistance to anti-EGFR therapy in glioblastoma -**

Blandin AF., Front-Tarrès N., Renner G., Martin S, Choulier L., Schaffner F, Lelong Rebel I, Vauchelles R, Dontenwill M , Lehmann M

Journées Campus Illkirch- 13-14 Avril 2014 – Illkirch-Graffenstaden- France

**Role of alpha5beta1 integrin in resistance to anti-EGFR therapy in glioblastoma -**

Blandin AF., Front-Tarrès N., Renner G., Martin S, Choulier L., Lelong Rebel I, Vauchelles R, Dontenwill M , Lehmann M

XXIII<sup>e</sup> Réunion annuelle de la SFBMEC- 11-13 Mars 2015- Lyon- France (Prix de la meilleure communication)

**Role of alpha5beta1 integrin in resistance to anti-EGFR therapy in glioblastoma -**

Blandin AF. Toni C., Renner G., Martin S, Choulier L., Lelong Rebel I, Vauchelles R, Dontenwill M , Lehmann M

Cancéropôle Grand-Est- 12-13 Novembre 2015- Strasbourg- France

**Communications par affiche:**

**Role of alpha5 beta1 integrin in EGFR oncogenic activity in glioblastoma-**

Blandin A.F. , Ray A.M., Janouskova H, Martin S, Choulier L., Schaffner F, Lelong Rebel I, Dontenwill M , Lehmann M

Cancéropôle Grand-Est - 25-26 Novembre 2013 - Strasbourg- France

**Implication of alpha5beta1 integrin in EGFR invasive activity in glioblastoma –**

Blandin A.F. Ray A.M., Renner G., Martin S, Choulier L., Schaffner F, Lelong Rebel I, Vauchelles R, Dontenwill M , Lehmann M

5<sup>th</sup> French Cell Adhesion Club Symposium - 15-16 Mai 2014 - Marseille – France

**Role of alpha5 beta1 integrin in EGFR oncogenic activity in glioblastoma-**

Blandin A.F. , Ray A.M., Janouskova H, Martin S, Choulier L., Schaffner F, Lelong Rebel I, Dontenwill M , Lehmann M

Cancéropôle Grand-Est – 20-21 Novembre 2014 - Strasbourg- France

**Implication of alpha5beta1 integrin in EGFR invasive activity in glioblastoma -**

Blandin AF., Front-Tarrès N., Renner G., Martin S, Choulier L., Lelong Rebel I, Vauchelles R, Dontenwill M , Lehmann M

European Cancer Center Symposium – 22 Mai 2015 - Freiburg- Allemagne

**Role of alpha5beta1 integrin in resistance to anti-EGFR therapy in glioblastoma -**

Blandin AF. Toni C., Renner G., Martin S, Choulier L., Lelong Rebel I, Vauchelles R, Dontenwill M , Lehmann M

Oncotrans – 25-26 Juin 2015- Dijon - France

# ***INTRODUCTION***

---

*Première partie : Les tumeurs gliales*

---

**1. Caractérisation des gliomes****1.1. Classification générale**

Les gliomes représentent la classe de tumeur cérébrale primaire (*de novo*) la plus fréquente. En France, l'incidence des gliomes est d'environ 6 cas pour 100 000 personnes (*Zouaoui et al., 2014*). Le rôle central du cerveau et les conséquences fonctionnelles de sa dérégulation expliquent la sévérité des tumeurs cérébrales primaires. Le tissu de notre système nerveux central s'articule autour de différents types cellulaires : les neurones conduisant l'influx nerveux mais également les cellules de la névroglie constituées majoritairement d'astrocytes. Ces astrocytes remplissent un grand nombre de fonctions, parmi lesquelles un rôle de protection des neurones, d'apport énergétique, de régulation de la transmission synaptique. La gaine de myéline qui détermine le caractère saltatoire de la conduction nerveuse est constituée par les oligodendrocytes. Enfin, les cellules épendymaires permettent la circulation du liquide céphalorachidien grâce à la présence de cils mobiles au niveau du domaine apical. Les tumeurs gliales trouvent leurs origines dans ces trois types cellulaires. L'organisation mondiale de la santé (OMS) décline 3 classes majeures de gliomes : les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les épendymomes. On discrimine les gliomes de bas grade (type I et II) des gliomes malins de haut grade (type III et IV) selon plusieurs caractéristiques histologiques (*Behin et al., 2003*). Selon la classification de l'OMS, le grade I est attribué aux astrocytomes pilocytiques qui sont des tumeurs bénignes délimitées et à croissance faible. Les tumeurs de grade II sont définies comme infiltratives et caractérisées par la présence de noyaux atypiques. On parlera d'astrocytomes diffus. Les astrocytomes anaplasiques de grade III présentent une haute activité mitotique et une anaplasie ce qui signifie que le tissu tumoral d'origine s'est différencié et ressemble histologiquement au tissu d'origine. La prolifération microvasculaire et des zones de nécroses sont observées dans les gliomes de grade IV appelés glioblastome multiforme (GBM) (*Louis et al., 2007*).

L'établissement du grade tumoral est un facteur clé influençant le choix des thérapies et particulièrement le recours à une radiothérapie adjuvante ou à des protocoles de chimiothérapies bien spécifiques.

### 1.2. Le glioblastome : épidémiologie et diagnostic

Le GBM est la forme la plus fréquente des gliomes IV avec une prévalence de 4/100 000 en France. Une étude américaine a montré que les GBM sont 1,5 fois plus communs chez l'homme que chez la femme et 2 fois plus observés dans la population blanche que dans la population noire (*Ostrom et al., 2013*). Dans un petit sous-groupe de patients (environ 5%), certains syndromes héréditaires rares incluant les syndromes de Turcot et Li-Fraumeni, la neurofibromatose de type I ou encore la maladie de Von Hippel Lindau sont associés avec une augmentation du risque de développer un gliome (*Farrell and Plotkin, 2007*). Les autres cas de gliomes représentent des cas sporadiques, une histoire familiale des gliomes étant rarement observée. La malignité d'un gliome implique un cumul d'altérations génétiques ou de dérégulations des voies de signalisation des facteurs de croissance, résultant à la fois de facteurs intrinsèques et environnementaux. Cependant à ce jour, aucune étude ne fait le lien entre l'exposition à des facteurs environnementaux tels que les pesticides ou les ondes électromagnétiques, et l'apparition d'une tumeur cérébrale (*Furnari et al., 2015*).

On décrit deux sous-types de GBM : le GBM primaire est la forme la plus commune (environ 95% des patients). C'est un GBM qui survient *de novo* chez des patients âgés à son stade le plus agressif. Les GBM secondaires proviennent d'une évolution des astrocytomes de bas grades et sont plutôt décrits chez des patients jeunes. Même si ces sous-types montrent des anomalies génétiques différentes (**Figure 1**), les patients ont les mêmes taux de réponse aux traitements standards (*Alifieris and Trafalis, 2015*).

En clinique, la description de certains symptômes chez les patients permettent une première orientation diagnostique : maux de tête, nausée et vomissements, des changements de personnalité, une imprécision dans la démarche du patient, une hémiparésie ou encore des défauts visuels (*Omuro A and DeAngelis LM, 2013*).

Les méthodes de détection des GBM reposent sur la description de ces symptômes et l'IRM (Imagerie par résonance magnétique) qui permet d'observer le système nerveux central de manière non invasive et avec une bonne résolution de contraste. Cependant, un diagnostic plus précis du grade tumoral n'est proposé que suite à l'étude histologique de la masse tumorale après résection chirurgicale.

### 1.3. Traitements conventionnels des glioblastomes

Les patients atteints de GBM ont un pronostic uniforme très sombre puisque leur espérance de survie dépasse rarement 12 à 15 mois. L'arsenal thérapeutique standard pour chaque patient diagnostiqué pour un GBM comprend une ablation chirurgicale de la majorité de la masse tumorale suivie de chimio- et radiothérapie. Le témozolomide est un agent alkylant de l'ADN, administré par voie orale tous les jours en parallèle de la radiothérapie (5 irradiations/semaine pendant 6 semaines). Ce protocole s'appuie sur un essai clinique de phase III qui montre que l'ajout de témozolomide augmente la survie des patients à 14,6 mois au lieu de 12,1 mois avec la radiothérapie seule (Stupp et al., 2005).

Un autre agent proposé en première ligne de traitement des GBM est un polymère biodégradable contenant un agent alkylant de l'ADN, la carmustine, implanté directement dans le lit tumoral après la résection chirurgicale (*Westphal et al., 2003*). Pour les patients qui ne sont pas éligibles pour une nouvelle opération chirurgicale ou une nouvelle cure de radiothérapie, la participation à des essais cliniques est la meilleure option. Le Bévacicumab est un anticorps humanisé dirigé contre le VEGF, un acteur clé de l'angiogénèse tumorale. Il est fréquemment indiqué dans le traitement des récurrences tumorales. Le Bévacicumab permet surtout une diminution rapide de l'œdème péri-tumoral car il bloque le VEGF qui favorise la perméabilité vasculaire. Les essais cliniques ne mettent pas en évidence d'amélioration notable de la survie, mais pour les patients hautement symptomatiques, il permet une amélioration des conditions de vie (*Friedman et al., 2009*). Un récent essai clinique a testé l'association du Bévacicumab et de l'Irinotecan chez des patients atteints d'un GBM récidivant. Cette étude n'a mis en évidence qu'une faible amélioration de la survie sans progression des patients, bien en dessous cependant des espoirs qu'avaient suscité cette combinaison de traitement (*Mesti et al., 2015*).

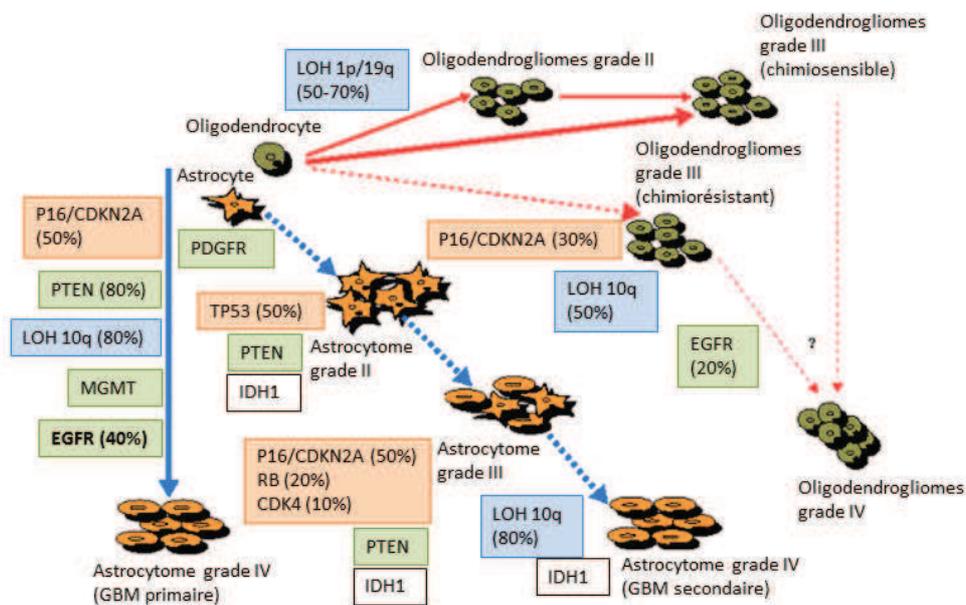
## 2. Physiopathologie des gliomes

### 2.1. Une instabilité génétique croissante

La classification des tumeurs gliales par l'OMS permettant d'établir une échelle de malignité selon des critères histologiques est indispensable mais peu précise. L'amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients s'est appuyée sur une meilleure compréhension du profil génomique des tumeurs. Behin et ses collègues ont alors déterminé une classification moléculaire des différents grades de gliomes selon la survenue d'altérations génétiques (*Behin et al., 2003*). Le GBM, caractérisé par un haut degré d'hétérogénéité moléculaire, efficacement transcrit par le terme « multiforme », a nécessité une classification encore plus précise. La classification génétique de Verhaak a mis en évidence différents sous-types de GBM (*Verhaak et al., 2010*). L'analyse transcriptomique de 200 échantillons tumoraux de patients a mis en évidence 4 sous-types de GBM : classique, neural, pro-neural et mésenchymateux basés sur la fréquence d'évènements mutationnels. Le GBM « classique » est défini par une amplification de l'EGFR et la présence de son mutant constitutivement actif l'EGFR VIII, et la perte du chromosome 10. Le GBM « mésenchymal » est caractérisé par des mutations NF1 et PTEN et la perte de l'amplification de l'EGFR. Le GBM « pro-neural » est décrit par une amplification de PDGFR, et des mutations TP53 et IDH1. Enfin le GBM « neural » est un cas particulier car son expression génique est semblable à celles des échantillons de tissu cérébral sain. Les auteurs ont également mis en évidence une corrélation clinique entre l'âge des patients et les différents sous-types de GBM. Ainsi, les patients jeunes seraient largement représentés dans les GBM « pro-neural ». Les gliomes diffus de grade II et les gliomes de grade III intermédiaires ont des comportements cliniques très variables : certains sont peu évolutifs alors que d'autres progressent rapidement en GBM. Récemment, le TCGA (The Cancer Genome Atlas) a permis de classer ces gliomes de bas grade selon trois groupes étroitement liés au statut mutationnel d'IDH1 et au pronostic des patients (*Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2015*).

On vient de le voir, la caractérisation moléculaire des gliomes est devenue de plus en plus précise et constitue une précieuse aide lors du diagnostic et de la prise en charge thérapeutique des patients.

Les astrocytomes de bas grade sont caractérisés par la surexpression du facteur de croissance dérivé des plaquettes et de son récepteur (PDGFR) (Behin et al., 2003) et une inactivation du gène de la protéine P53 (Okamoto et al., 2004). Les GBM pédiatriques sont également caractérisés par une amplification de PDGFR (Paugh et al., 2010). Lors de l'évolution des tumeurs de bas grade vers un stade plus avancé, elles accumulent d'autres mutations telles qu'une délétion de P16 et une mutation du gène du rétinoblastome (Behin et al., 2003).



**Figure 1: Les altérations génétiques dans la progression des gliomes (Figure adaptée de Behin et al., 2003)**  
 Les zones orange correspondent à des altérations du cycle cellulaire, les zones vertes des altérations affectant les voies de signalisation et les zones bleues correspondent aux pertes d'hétérozygotie.

Une mutation de l'enzyme IDH-1 (isocitrate déhydrogénase) est décrite dans les gliomes de grades II et III (Balss et al., 2008). Cette substitution d'acides aminés est retrouvée dès les premiers stades de développement des gliomes suggérant son implication dans la gliomagenèse (Olar and Aldape, 2014). Compilant des données provenant du TCGA, des chercheurs ont récemment analysé le profil génomique d'échantillons tumoraux de 293 tumeurs de bas grades selon la séquence d'exome, le nombre de copie et les méthylations de l'ADN, l'expression des ARN messagers et l'expression protéique. Leurs conclusions soulignent 3 sous-groupes de gliomes caractérisés par leur statut mutationnel d'IDH1. Les gliomes de bas grade possédant une mutation IDH1 et une délétion 1p/19q sont de bon pronostic.

En revanche, les gliomes de bas grade ayant une forme non mutée d'IDH1 semblent développer des caractéristiques cliniques similaires à celles retrouvées dans les GBM comme par exemple une mutation de la phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog) (*Yan et al., 2009*). Le dernier groupe comprend les gliomes de bas grade positifs pour la mutation IDH1 mais négatifs pour la délétion 1p/19q. Ils possèdent une mutation du gène suppresseur de tumeur P53 dans 94% des cas (*Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2015*).

En ce qui concerne les oligodendrogliomes, les altérations génétiques caractéristiques sont les pertes d'hétérozygotie sur les chromosomes 1p et 19q qui affectent 40 à 80% de ces tumeurs (*Reifenberger and Louis, 2003*). On peut également citer la perte d'hétérozygotie sur le chromosome 10q, présente dans 80 à 90% des GBM primaires ou secondaires (**Figure 1**).

Nous allons maintenant détailler les altérations génétiques des astrocytomes de grade IV décrits comme des tumeurs très instables génétiquement.

Les GBM primaires sont majoritairement caractérisés par une amplification du facteur de croissance épidermique (EGFR) retrouvée chez 40% des patients (**Figure 1**). Une amplification de l'EGFR est également décrite dans les GBM secondaires mais elle est beaucoup moins fréquente. L'utilisation de puces d'hybridation génomique comparative (aCGH- array comparative genomic hybridization) a identifié des variations du nombre de copies de l'EGFR et PDGFRA dans 463 échantillons de GBM. La co-amplification de ces récepteurs a été observée dans seulement 34 échantillons au sein desquels émergent des sous-populations cellulaires exprimant des amplifications variables de l'EGFR et PDGFRA (*Little et al., 2012; Szerlip et al., 2012*). Cette étude souligne l'hétérogénéité génétique des GBM. Nous reviendrons en détails sur les mécanismes de dérégulation de l'EGFR dans les GBM dans un prochain chapitre.

La MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) est un gène de réparation de l'ADN qui retire les groupements alkyls à partir de la position O<sup>6</sup> de la guanine. Elle peut ainsi diminuer les effets des agents alkylants tels que le temozolomide ou les nitrosourées. Le statut de méthylation du promoteur est un facteur pronostic chez les patients atteints de GBM.

En effet, la méthylation inactivatrice du promoteur de la MGMT est observée dans près de la moitié des GBM nouvellement diagnostiqués et elle est associée à une meilleure réponse à la chimiothérapie par agents alkylants et une augmentation de la survie globale des patients (*Hegi et al., 2005*).

La délétion ou la mutation de PTEN (phosphatase and tensin homolog) sont des altérations très fréquentes retrouvées dans près de 80% des GBM primaires. L'analyse des données cliniques et moléculaires de 543 patients atteints de GBM (collection d'échantillons du TCGA) relève des mutations des composants influençant la voie PI3K tel que PTEN. La mutation de PI3K est retrouvée chez 25,1% des patients. Cette mutation est mutuellement exclusive des mutations ou délétion de PTEN. En effet, 59,4% des GBM développent l'une ou l'autre mutation (*Brennan et al., 2013a*).

La mutation de l'enzyme IDH-1 est également présente dans les GBM secondaires. Mais cette mutation est décrite dans seulement 5% des GBM primaires (*Kang et al., 2009*). Deux études associant le statut muté d'IDH1 et une amélioration de la survie globale des patients atteints de GBM pourraient permettre de proposer l'enzyme IDH-1 comme marqueur pronostique des gliomes de haut grade (*Cheng et al., 2013; Yao et al., 2013*).

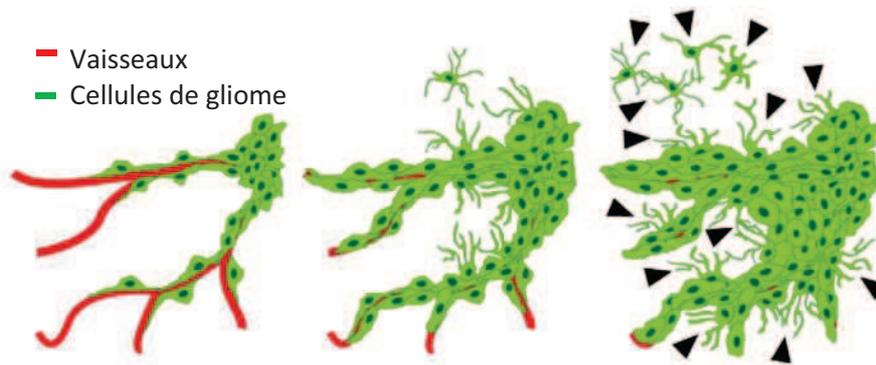
L'hétérogénéité intrinsèque du GBM fait référence à une diversité moléculaire, mais aussi à l'existence de populations distinctes ayant les caractéristiques de cellules souches et aussi appelées cellules initiatrices de tumeurs (TIC- tumor initiating cells) au sein d'une même tumeur. Ces cellules se distinguent des autres cellules de la tumeur par leur potentiel tumorigénique que l'on pourrait définir comme leur capacité à générer une tumeur originale après une transplantation secondaire. L'existence de cellules souches dans les gliomes humains a été révélée par des études *in vitro*. Des cellules dissociées provenant de biopsies de gliomes de bas grade et de médulloblastomes étaient capables de former des neurosphères tumorales ayant un potentiel d'autorenouveaulement et de différenciation en cellules gliales et neuronales dans différentes conditions (*Singh et al., 2003*). Il a été largement démontré que cette nouvelle population de cellules de gliomes expriment plusieurs marqueurs de cellules souches neurales tels que CD133, une protéine des filaments intermédiaires, la Nestine, ou encore les facteurs de transcriptions SOX2 et BMI1 (*Gangemi et al., 2009; Kong et al., 2008; Stojnik et al., 2007*).

A partir de fractions cellulaires provenant de biopsies de GBM ou de lignées de cellules souches de GBM (CSG) implantées *in vivo*, des auteurs ont identifié différentes sous-populations de cellules de GBM basée sur l'expression de l'EGFR et de différents marqueurs de cellules souches (SOX2, CD133, CD15) (Mazzoleni et al., 2010). Le potentiel tumorigénique (croissance, invasion) de ces cellules souches semble, dans cette étude, strictement associé à une surexpression de l'EGFR.

### 2.2. Le caractère hautement invasif du GBM

Le GBM est une tumeur caractérisée par une infiltration rapide des cellules tumorales dans le parenchyme cérébral. Les cellules néoplasiques ont la capacité de migrer sur de longues distances à partir de la tumeur d'origine. Un patient peut ainsi développer un nouveau foyer tumoral dans l'autre hémisphère cérébral, on parlera alors de GBM multifocal.

Les gliomes primaires envahissent en cellules isolées partout dans le cerveau mais ont tendance à infiltrer le long des vaisseaux sanguins, le long des fibres neuronales ou encore à proximité des pieds astrocytaires (Bellail et al., 2004). Le comportement des cellules de carcinomes qui métastasent dans le cerveau est totalement différent. L'invasion de ces cellules est nettement plus délimitée. Les cellules se regroupent pour migrer sur de courtes distances (Bellail et al., 2004). L'étude des modes d'invasion des cellules de GBM est facilitée par l'utilisation d'un modèle d'allogreffe intracrâniale de cellules de GBM C6 de rat. Les cellules C6 sont implantées dans des rats syngéniques et partagent les caractéristiques histologiques des GBM humains (Grobbs et al., 2002). L'observation *ex vivo* par la microscopie biphotonique de coupes de GBM provenant de ce modèle, a permis de confirmer que les cellules de GBM envahissent préférentiellement le long des vaisseaux sanguins au front de migration et ensuite pénètrent le parenchyme cérébral à partir des régions péri vasculaires (Hirata et al., 2012).



**Figure 2 : Modèle hypothétique de la progression du GBM (Figure adaptée de Hirata et al. 2012).** Les cellules de GBM ont tendance à infiltrer le parenchyme cérébral le long des vaisseaux ou à proximité des astrocytes.

Selon le mode d'invasion, la morphologie cellulaire diffère. En effet, les cellules de GBM migrant le long des vaisseaux adoptent plutôt une forme fuselée avec un unique pseudopode qui s'étend dans la direction du mouvement (**Figure 2**). En revanche, les cellules migrant dans le parenchyme cérébral émettent de multiples pseudopodes dans de multiples directions. Ces deux modes d'invasion semblent également mobiliser des GTPases de la famille Rho différentes (*Hirata et al., 2012*).

Lors des processus d'invasion cellulaire, le remodelage de la matrice est une étape indispensable. Pour cela, les cellules de GBM expriment des enzymes dégradant la MEC.

La fonction de ces enzymes est contrôlée par des inhibiteurs spécifiques tel que TIMP-2 (tissu inhibitor of metalloproteinase-2) (*Roy et al., 2014*). Un déséquilibre dans le niveau d'expression de ces protéases facilite l'invasion. Dans le GBM, on distingue trois groupes de protéases : les protéases à sérine, les protéases à cystéine et les métalloprotéinases (MMPs) de la matrice (*Vehlow and Cordes, 2013*). Toutes les MMPs acquièrent leur potentiel à dégrader la matrice par clivage enzymatique de leur pro-enzyme inactive (*Nakada et al., 2003*). Des MMPs particulières de type 2 et 9 (MMP-2 et MMP-9) favorisent l'invasion des cellules de GBM (*Alves et al., 2011; Hagemann et al., 2012*). L'inhibition de l'activité de ces MMP-2 réduit la migration et l'invasion de lignées cellulaires de GBM *in vitro* (*Badiga et al., 2011*) et dans des xénogreffes de gliomes humains (*Kesanakurti et al., 2012*).

Malgré son extrême invasivité, les métastases extra-crânielles sont extrêmement rares. Un cas de métastase sous-cutanée a été récemment décrit. Le patient a développé un œdème sous-cutané dans la région cervicale postérieure huit mois après la résection chirurgicale. L'examen immunohistochimique de ce deuxième foyer tumoral a révélé les mêmes caractéristiques que le GBM primaire (*Guo et al., 2012*).

En dépit de l'optimisation des régimes de chimiothérapie adjuvante, le taux de survie des patients atteints de GBM reste sensiblement le même depuis ces 10 dernières années. Compte tenu du caractère hautement invasif du GBM que nous avons décrit précédemment, une résection chirurgicale complète est impossible et le pool de cellules tumorales restant conduit fréquemment à une récurrence de la maladie. Ces récurrences diminuent l'espérance de survie et limitent les options thérapeutiques disponibles. L'émergence des thérapies ciblées, dirigées dans la majorité des cas, contre des facteurs de croissance et leurs récepteurs, a apporté un souffle nouveau dans la prise en charge thérapeutique des GBM.

---

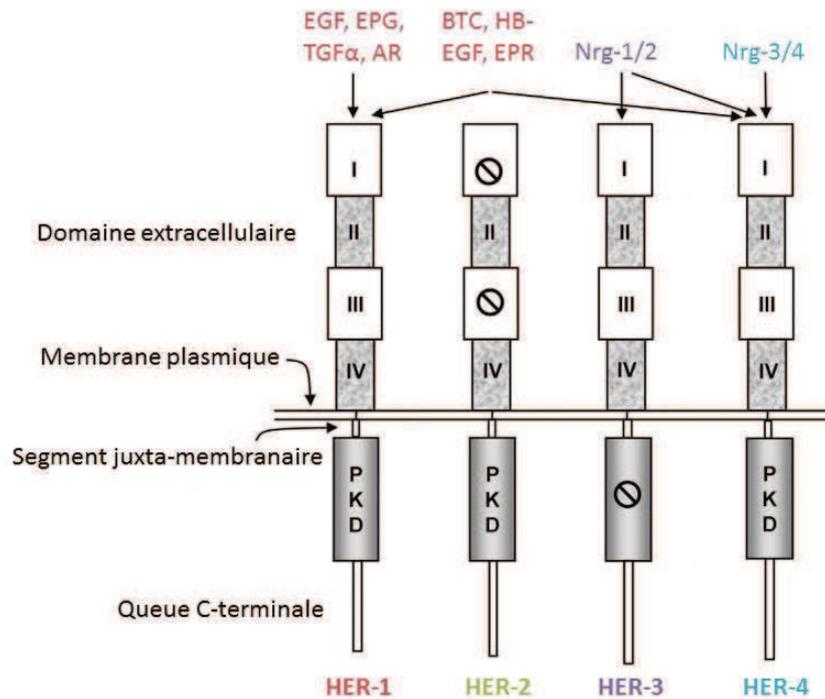
*Deuxième partie : Les récepteurs aux facteurs  
de croissance épidermique ErbB1-EGFR-HER1*

---

**1. Généralités structurales et fonctionnelles de l'EGFR**

Une des principales familles de senseurs contrôlant les fonctions cellulaires basiques sont les récepteurs transmembranaires possédant une activité tyrosine kinase. La famille des récepteurs ErbB est particulièrement étudiée et régule la croissance, la différenciation, la progression du cycle cellulaire, l'adhérence, la migration, l'apoptose... (Citri and Yarden, 2006). Les sigles ErbB dérivent du nom de l'oncogène du virus de l'érythroblastose aviaire (v-ErbA) qui partage une forte homologie avec l'EGFR (Yamamoto et al., 1983).

La famille des récepteurs ErbB est composée de 4 membres : EGFR/ErbB1/HER1 (human EGF receptor-1), ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 et ErbB4/HER4 qui sont exprimés de manière ubiquitaire dans les cellules épithéliales, mésenchymateuses ou nerveuses ainsi que dans leurs progéniteurs cellulaires (Roskoski Jr., 2014). Ces récepteurs se dimérisent suite à la fixation du ligand ce qui conduit à l'activation du domaine tyrosine kinase. ErbB2 ne peut se lier à aucun facteur de croissance donc la formation d'un homodimère fonctionnel est difficile. Cependant, ErbB2 est un partenaire privilégié pour s'associer avec les autres membres de la famille ErbB et la combinaison hétérodimérique d'ErbB2 avec ErbB1 et ErbB3 arbore une importante activité signalétique (Pinkas-Kramarski et al., 1996). Le domaine tyrosine kinase d'ErbB3 est non fonctionnel ce qui induit la formation d'un homodimère qui ne peut pas stimuler les voies de signalisation en aval du récepteur (**Figure 3**).



**Figure 3: Structure des récepteurs ErbB (Figure adaptée de Roskoski Jr., 2014).** Les récepteurs sont schématisés et leurs facteurs de croissance spécifiques sont indiqués. Les domaines extracellulaires sont constitués de quatre segments I à IV. Les domaines I et III d'HER-2 ne fixent aucun ligand connu. Dans la région intracytoplasmique, le domaine kinase (PKD) d'HER-3 est non fonctionnel. EGF: Epidermal growth Factor. EPG: Epigen. TGFα: Transforming Growth Factor-alpha. AR: Amphiregulin. BTC: Betacellulin. HB-EGF: heparin-binding epidermal growth factor. EPR: Epiregulin. Nrg-1/2/3/4: Neuregulin-1/2/3/4.

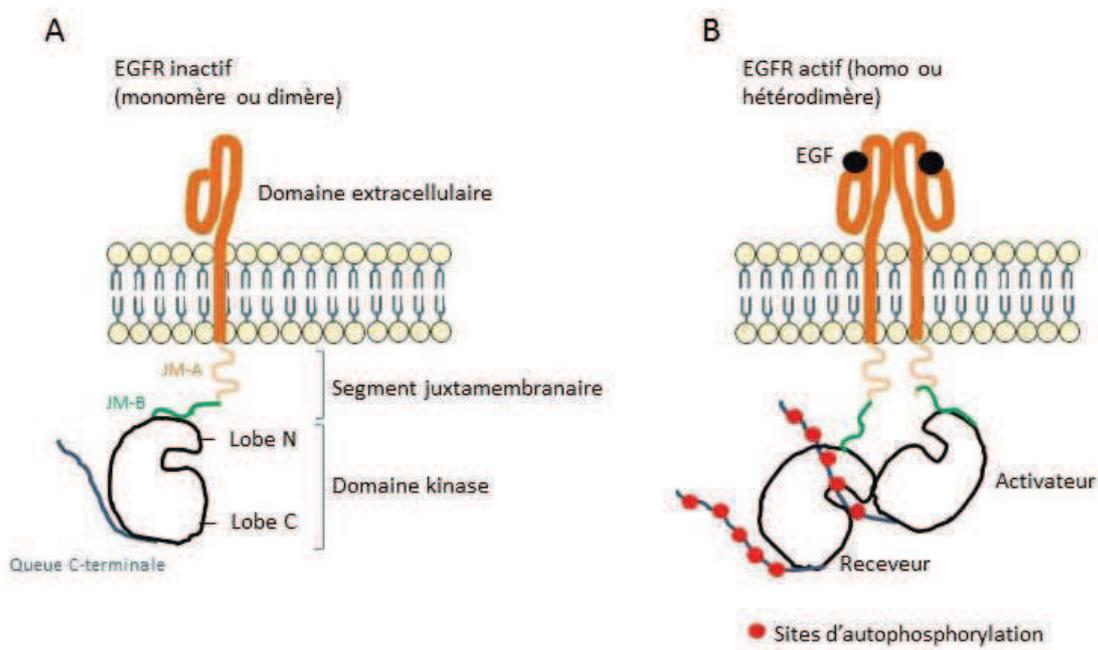
### 1.1. Structure de l'EGFR

L'EGFR fut le premier récepteur tyrosine kinase caractérisé (*Carpenter and Cohen, 1990*). Il est situé sur le bras court du chromosome 7 (7p12). L'EGFR est composé d'un domaine extracellulaire, d'un segment transmembranaire hydrophobe et d'un domaine intracellulaire possédant l'activité tyrosine kinase. L'organisation de l'EGFR n'est pas réellement différente des récepteurs à d'autres facteurs de croissance tels que le PDGF ou les facteurs de croissance fibroblastique (FGF).

- Le domaine extracellulaire riche en chaînes d'oligosaccharides est divisé en 4 parties : les domaines I et III riches en leucine, participent à la liaison du ligand. Les domaines II et IV contiennent des clusters de résidus cystéine et participent à la formation de ponts disulfures (**Figure 3**). Le domaine II participe à l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation du récepteur avec les autres récepteurs de la famille ErbB (*Ogiso et al., 2002*).

- Le domaine extracellulaire est suivi d'un segment transmembranaire de 19 à 25 acides aminés structurés en hélice alpha. Les extrémités N-ter et C-ter de ce segment transmembranaire comprennent des motifs particuliers dits GG4: deux résidus glycine distants de 4 acides aminés (G-xxx-G) (Escher et al., 2009).

- Le domaine intracytoplasmique (environ 550 acides aminés) est lui-même divisé en 3 parties : le segment juxta-membranaire, le domaine protéine kinase et une queue carboxyterminale.



**Figure 4: Modèle d'activation du domaine intracellulaire de l'EGFR (Figure adaptée de Jura et al., 2009).** A- La partie intracellulaire de l'EGFR se décompose en 3 parties : un segment juxta-membranaire, un domaine kinase dans lequel deux lobes forment le site actif de liaison de l'ATP, et une queue C-terminale qui est le site d'autophosphorylation du récepteur. B- La dimérisation de l'EGFR induite par la fixation du ligand est suivie d'un processus de trans-autophosphorylation du domaine kinase du récepteur. Le monomère receveur est phosphorylé par le monomère activateur et réciproquement. JM-A : segment juxta-membranaire A. JM-B : segment juxta-membranaire B.

Le segment juxta-membranaire (résidus 645 à 682) est décrit par une extrémité N-terminale nommée JM-A et une extrémité C-terminale nommée JM-B (Figure 4A). La délétion du segment JM-A réduit l'efficacité catalytique de 10 fois montrant qu'un segment juxta-membranaire complet est requis pour une activation totale du récepteur (Jura et al., 2009).

Par un procédé cristallographique, un autre groupe confirme l'importance du segment juxta-membranaire de l'EGFR en montrant que des mutations dans la région C-ter suppriment l'activation du récepteur (*Brewer et al., 2009*).

Le domaine kinase est formé par deux lobes qui convergent pour former une fente profonde où se lie l'adénosine triphosphate (ATP) (**Figure 4A**). La structure du lobe N-terminal en feuillet beta assure les mécanismes de liaison de l'ATP. Le lobe C-terminal riche en hélice alpha assure le transfert des groupements phosphates de l'ATP aux protéines cibles (*Taylor et al., 2012a*).

La queue C-terminale du domaine intracytoplasmique de l'EGFR est une région riche en résidus tyrosines. Les tyrosines kinases vont permettre le transfert d'un groupement phosphate provenant de l'ATP sur toutes les tyrosines du domaine kinase de l'EGFR et ensuite le relargage du nucléotide diphosphate (*Gajiwala, 2013*). Des protéines cytoplasmiques viennent alors se fixer sur les tyrosines phosphorylées. Cela engendre des modifications conformationnelles de ces protéines conduisant à l'activation des différentes voies de signalisation de l'EGFR qui guident des réponses cellulaires spécifiques.

### 1.2. Activation de l'EGFR

#### 1.2.1. Les ligands

Les ligands de la famille de l'EGF peuvent être classés en trois groupes selon leur sélectivité pour le récepteur (**Figure 3**).

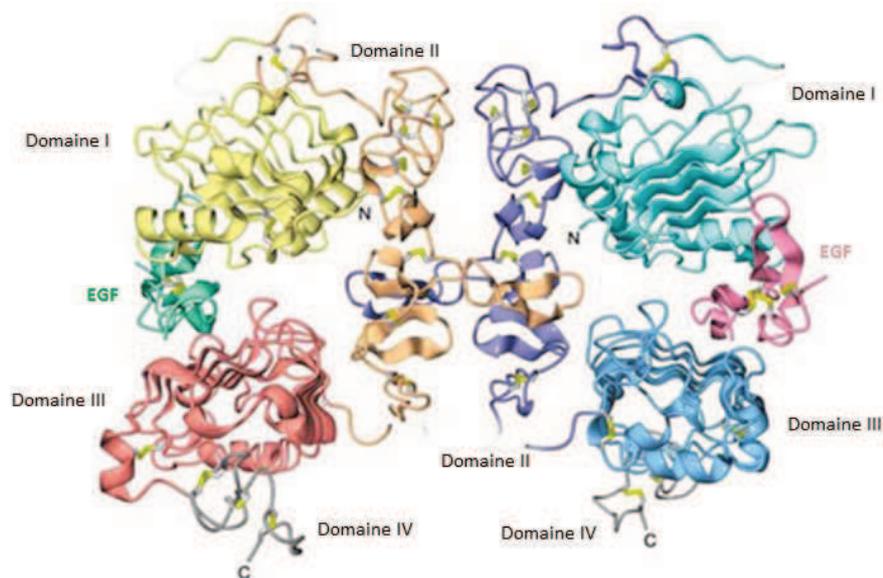
- Le premier groupe comprend l'EGF, le TGF $\alpha$ , l'amphiréguline et l'épigène qui se lient préférentiellement à l'EGFR
- Le second groupe comprend la bétacelluline (BTC), HB-EGF (Heparin Binding EGF) et l'épiréguline (EPR). Ces ligands possèdent une sélectivité de liaison pour ErbB1 et ErbB4.
- Le troisième groupe est composé des neurégulines (NRGs) : NRG1/2 fixent ErbB3 et ErbB4 alors que NRG3/4 sont sélectifs d'ErbB4.

L'étude de l'expression des ligands de l'EGFR révèle une forte expression de l'EGF, de l'HB-EGF, de l'amphiréguline (*Yotsumoto et al., 2008*) et de l'épiréguline (*Auf et al., 2013*) dans les cellules de GBM.

L'EGF humain est un facteur de croissance de 53 acides aminés contenant 3 ponts disulfures divisant la molécule en trois boucles : les boucles A et C interagissent avec les résidus du domaine III de l'EGFR et la boucle B interagit avec les résidus du domaine I de l'EGFR. L'EGF est synthétisé sous forme de précurseur possédant un domaine extracellulaire, une portion transmembranaire et un petit segment intracellulaire. Ces précurseurs, après acheminement à la membrane plasmique, sont clivés par protéolyse par des membres de la famille ADAMs (A disintegrine and metalloproteases) (Blobel, 2005). Le processus protéolytique libère dans le milieu extracellulaire des facteurs de croissance matures hydrophobes contenant une séquence de 6 résidus cystéine.

### 1.2.2. Les mécanismes de dimérisation

Il existe en permanence un équilibre entre les conformations actives et inactives de l'EGFR, guidé par la présence ou non de l'EGF respectivement. Dans une conformation inactive, les domaines II et IV se rejoignent pour éviter que les domaines I et III ne se rapprochent et forment le site de liaison de ligand. Dans la conformation active ouverte, les domaines II et IV se déplacent loin des domaines I et III (**Figure 5**).



**Figure 5: Le ratio 2:2 du dimère EGF-EGFR : structure cristallographique des molécules (Figure adaptée de Ogiso et al., 2002).** Deux molécules d'EGF forment un complexe avec deux molécules d'EGFR. Une molécule EGF du complexe est colorée en vert et l'autre en rose. Les domaines I, II, III et IV d'un récepteur sont colorés en jaune, orange, rouge et gris respectivement. Les domaines I, II, III, et IV de l'autre récepteur sont colorés en bleu clair, violet, bleu foncé et gris respectivement. Les ponts disulfures sont montrés en jaune.

Il en résulte la formation d'une poche de fixation pour le ligand en forme de C entre les domaines I et III. Cette modification de structure démasque le bras de dimérisation (domaine II) qui va pouvoir se lier au bras de dimérisation d'un autre récepteur monomérique (occupé par un ligand ou libre dans le cas d'HER-2) (*Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002*).

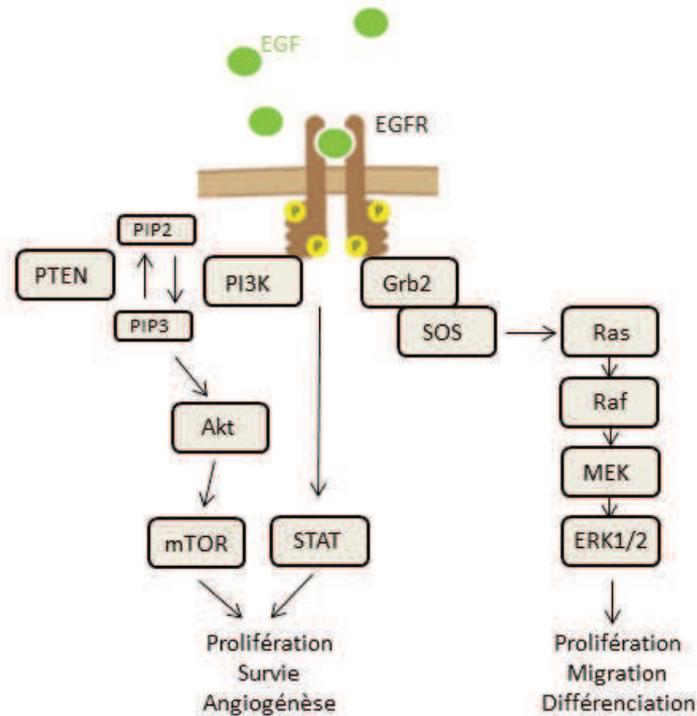
Des études cristallographiques ont confirmé des études plus anciennes indiquant que deux molécules d'EGF forment un complexe avec deux molécules d'EGFR selon un ratio 2:2 (**Figure 5**) (*Lemmon et al., 1997; Ogiso et al., 2002*). En absence de ligand, l'équilibre se déplace en faveur d'une conformation fermée. La liaison du ligand stabilise la conformation ouverte du récepteur et permet l'accumulation d'homo- ou d'hétérodimères actifs (*Dawson et al., 2005*). La capacité des ligands ErbB à induire la formation d'homo- et d'hétérodimères élargit le potentiel signalétique des récepteurs. Nous ne rentrerons pas dans les détails ici mais des complexes entre les différents membres de la famille ErbB ont été identifiés dans le développement normal et dans les pathologies cancéreuses (*Gullick, 2001; Olayioye et al., 2000*).

La dimérisation induit le rapprochement des domaines kinases dans une orientation asymétrique. Cela déclenche un processus d'autophosphorylation réciproque d'un monomère par la kinase de l'autre monomère (**Figure 4B**). Le lobe C d'un monomère activateur interagit avec le lobe N d'un monomère receveur ce qui conduit à la phosphorylation de la queue C-terminale du monomère activateur (Y992, Y1045, Y1068, Y1148 et Y1173) (*Zhang et al., 2006*). Les résidus tyrosine phosphorylés servent de sites d'ancrage au recrutement de protéines adaptatrices contenant les domaines SH2 (Src homology 2) et PTB (phosphotyrosine binding) (*Jones et al., 2006*). La formation de complexe de signalisation entraîne l'initiation de plusieurs voies de signalisation en aval qui vont réguler de multiples réponses cellulaires.

### 1.2.3. Les voies de signalisation activées par l'EGFR dans le glioblastome

La signalisation cellulaire médiée par les récepteurs tyrosine kinase est étroitement impliquée dans la progression tumorale et un grand nombre de protéines clés régulant ces voies de signalisation sont devenues des cibles thérapeutiques.

La nature des médiateurs se liant aux sites d'autophosphorylation de l'EGFR définissent l'activation des voies de signalisation Ras/Raf/MAPK (Mitogen-activated protein kinase) ou PI3K/Akt (phosphatidylinositol-3 kinase), ou encore des facteurs de transcription comme les protéines STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) (Citri and Yarden, 2006). Ce sont les trois voies essentielles qui contrôlent la progression du GBM en régulant la survie, la croissance, la prolifération et la migration cellulaire (Figure 6).



**Figure 6: Schématisation des 3 principales voies de signalisation de l'EGFR dans le glioblastome.** Les protéines des voies de signalisation PI3K/Akt et STAT stimulent la croissance cellulaire et la survie. La voie Ras/MAPK stimule également la division cellulaire mais permet aussi aux cellules de migrer.

- La voie MAPK :

GRB2 est une des protéines adaptatrices de l'EGFR la mieux caractérisée (Figure 6). Dans des modèles de xénogreffes de cancers pulmonaires dérivés de patients, une étude décrit l'analyse de la formation du complexe EGFR/GRB2 par la technique PLA (proximity ligation assay) (Smith et al., 2015). Le taux de formation du complexe semble relié à une réduction de la taille de la tumeur chez les souris traitées avec un anti-EGFR (cetuximab) et à une amélioration de la survie dans des biopsies de patients.

La corrélation décrite entre l'expression du complexe et une meilleure réponse aux traitements anti-EGFR apparaît toutefois imparfaite.

GRB2 peut interagir avec l'EGFR soit directement, soit par l'intermédiaire d'une autre protéine adaptatrice SHC (contenant un domaine SH2 et un domaine ayant une affinité pour les séquences peptidiques PTB) (Lowenstein et al., 1992). GRB2 se trouvera ensuite associée avec la protéine SOS. Le complexe SHC-GRB2-SOS ainsi formé permet à SOS de catalyser l'échange entre la forme inactive de Ras (liée au GDP) et la forme active de Ras (liée au GTP). S'en suit l'activation de la voie des MAP kinases qui contient 3 types de kinases séquentielles. La sérine-thréonine protéine kinase Raf (MAP kinase kinase kinase) est activée par la protéine Ras. Raf activée, phosphoryle à son tour les MAP kinase kinases nommées MEK1 et MEK2 (mitogen-activated extracellular signal – regulated kinase) sur deux résidus sérine différents (S218 et S222) (Roskoski, 2012). MEK est une protéine kinase bivalente qui active les MAP kinases ERK1 et ERK2 en y phosphorylant aussi bien des résidus thréonine que tyrosine. Cette spécificité confère à cette kinase un rôle central dans l'intégration des signaux dans la voie des MAPK (Sebolt-Leopold, 2000). Les kinases ERK phosphorylent plusieurs cibles parmi lesquelles d'autres protéines kinases telles que les protéines RSK (90kDa ribosomal S6 kinase) (Romeo et al., 2012) et certains facteurs de transcription impliqués dans le cycle cellulaire tel que Fos.

Cette cascade d'évènements induit non seulement la migration cellulaire mais impacte d'autres processus cellulaires ou physiopathologiques incluant la différenciation, la prolifération, l'apoptose ou l'angiogénèse. L'inhibition de la voie des MAPK pourrait être un bon moyen de contrecarrer la dérégulation de ces processus cellulaires dans les cancers. A titre d'exemple, l'utilisation d'un inhibiteur de la MAPK p38 (un dérivé benzimidazole, le LY2228820) dans plusieurs modèles de xénogreffes de tumeurs solides incluant les gliomes, montre une inhibition significative de la croissance tumorale (*Campbell et al., 2014*).

### - La voie PI3K :

La kinase PI3K est un dimère composé d'une sous-unité régulatrice p85, et d'une sous-unité catalytique p110. La stimulation de l'EGFR par l'EGF dans des cellules de GBM induit l'activation de la PI3K par liaison directe de la phosphatase SHP-2 (via ses deux domaines SH2) à la sous-unité p85 (Wu et al., 2001).

Lorsqu'elle est activée, la PI3K catalyse la phosphorylation des inositols phospholipides et génère des lipides membranaires di-phosphates appelés PI(3,4)P2 ou tri-phosphates PI(3,4,5)P3 (**Figure 6**). Le PI(3,4)P2 et PI(3,4,5)P3 servent de site d'arrimage à la sérine/thréonine kinase Akt qui est alors phosphorylée (et activée) par la PDK1 (phosphatidylinositol 3-dépendent kinase 1). Ces lipides restent à la membrane plasmique jusqu'à ce qu'ils soient déphosphorylés par des phosphatases spécifiques telle que PTEN. Akt est un proto-oncogène qui a de nombreuses cibles en aval dont la sérine/thréonine kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) (Brown et al., 1994).

Les régulateurs de la voie de signalisation émanant de PI3K étant fréquemment mutés dans les GBM, des études pré-cliniques suggèrent que l'inhibition de cette voie pourrait avoir un potentiel thérapeutique. Nous ne détaillerons pas ici les différents inhibiteurs spécifiques de la PI3K qui semblent sensibiliser les cellules de GBM à la chimiothérapie par temozolomide (résumés dans la revue Wick et al., 2011). La rapamycine, antibiotique initialement utilisé dans le traitement anti-rejet des greffes, possède des propriétés anti-tumorales par son action inhibitrice de la protéine mTOR. De nombreux analogues de la rapamycine se sont depuis développés. Dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de GBM, un nouvel inhibiteur de mTOR a montré son efficacité, en synergie avec le temozolomide, à inhiber la croissance et l'invasion cellulaire et réduire le volume tumoral et ainsi améliorer la survie de souris xénogreffées (Yu et al., 2015).

### - La voie STAT :

Les protéines STAT (signal transducers and activators of transcription) sont activées par des facteurs solubles tels que les cytokines mais également par les récepteurs aux facteurs de croissance incluant l'EGFR (**Figure 6**). STAT3 interagit physiquement avec l'EGFR à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Shao et al., 2003). Dans le cytoplasme, le domaine SH2 de STAT3 interagit avec les tyrosines 1068 et 1086 de l'EGFR conduisant à l'activation de STAT3 sur les résidus Tyr705 et Ser727 par l'intermédiaire des protéines tyrosines kinases de la famille de JAK (Janus kinase) (Calò et al., 2003).

La phosphorylation des protéines STAT enclenche leur dimérisation et leur translocation dans le noyau où elles activeront la transcription de leurs gènes cibles impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Horvath, 2000). Une étude récente a montré l'importance d'un inhibiteur de STAT3 dans l'induction de la mort par apoptose des lignées cellulaires de GBM (Mukthavaram et al., 2015).

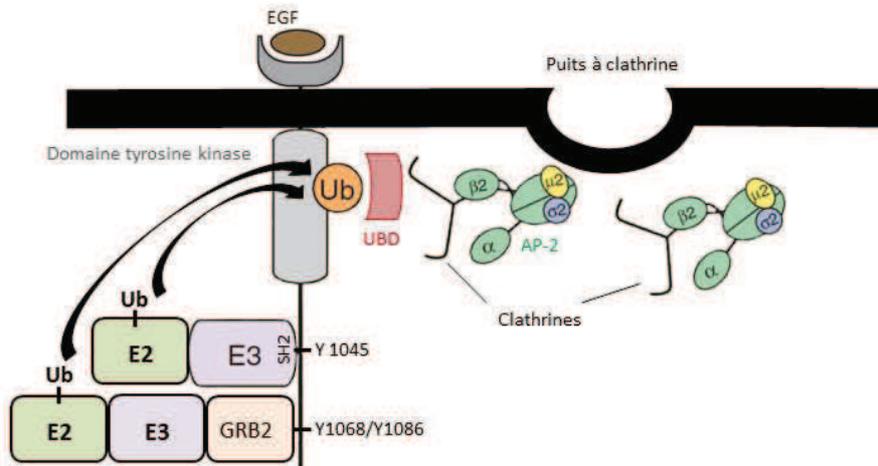
### 1.3. Trafic intracellulaire de l'EGFR

Parmi les nombreux mécanismes régulant l'activité de l'EGFR, l'endocytose du récepteur constitue un régulateur important de la signalisation du récepteur. Elle peut être divisée en deux étapes. L'initiation de l'internalisation est la translocation des récepteurs de la surface cellulaire dans des compartiments intracellulaires. Cette étape contrôle le nombre de récepteurs à la surface de la cellule. Lors d'une deuxième étape, les récepteurs sont triés à travers un système complexe de vésicules intracellulaires appelées endosomes. Ces différents compartiments favoriseront le recyclage ou la dégradation des récepteurs (*Citri and Yarden, 2006*). Plusieurs voies d'internalisation de l'EGFR ont été décrites. L'internalisation médiée par la clathrine est le mécanisme majeur de l'étape initiale d'internalisation (*Vieira et al., 1996*) mais une seconde voie s'appuyant sur les cavéoles a également été décrite (*Orlichenko et al., 2006; Sigismund et al., 2005*).

Une dérégulation du trafic intracellulaire de l'EGFR joue un rôle important dans l'oncogénèse. Un défaut de l'endocytose de l'EGFR entraîne une diminution du rétrocontrôle négatif associé à une augmentation de la signalisation pouvant conduire au développement du cancer (*Tomas et al., 2014*). Un exemple de l'importance du trafic de l'EGFR dans la tumorigénèse implique l'interaction entre la phosphatase PTEN et SPRY2 (sprouty homolog 2, un régulateur négatif des récepteurs tyrosines kinases) dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer prostatique. Une diminution de l'expression de SPRY2 stimule la voie PI3K/Akt conduisant à une augmentation de la prolifération et de l'invasion cellulaire par augmentation de l'internalisation de l'EGFR et HER-2 (*Gao et al., 2012*). Très peu de publications décrivent à ce jour l'implication du trafic de l'EGFR dans la gliomagénèse.

## 1.3.1. Endocytose clathrine-dépendante

Suite à la fixation de son ligand et l'activation de son domaine tyrosine kinase, l'EGFR est ubiquitinylé (*Madhus and Stang, 2009*). L'endocytose clathrine-dépendante est contrôlée par l'ubiquitylation du récepteur faisant intervenir la protéine E3 ubiquitine ligase Cbl (Casitas B lineage lymphoma) (**Figure 7**). Trois homologues de la protéine Cbl ont été décrits dans les cellules de mammifères : c-Cbl, Cbl-b et Cbl-c.



**Figure 7: Modèle d'endocytose de l'EGFR clathrine-dépendante (Figure adaptée de Goh and Sorkin, 2013).** L'addition du ligand EGF provoque la dimérisation du récepteur et l'activation du domaine kinase. L'EGFR est alors phosphorylé sur plusieurs résidus tyrosine. Certaines tyrosines phosphorylées interagissent directement avec la ligase E3 c-Cbl. Cbl recrute alors une E2 qui permet l'ubiquitylation de l'EGFR. Les protéines à domaines UBD permettent le recrutement de l'EGFR dans les puits invaginés recouverts de clathrine. Ub : ubiquitylation. E3 : ubiquitine-ligase Cbl. UBD : ubiquitin-binding domain. AP-2 : clathrin adaptator protein complex 2).

La protéine ligase c-Cbl possède un domaine SH2 qui lui permet de se lier au domaine tyrosine kinase de l'EGFR. Des auteurs ont montré que la perte d'expression de c-Cbl inhibait l'ubiquitylation et l'internalisation clathrine-dépendante de l'EGFR en prévenant sa localisation dans les puits recouverts de clathrine (*Bertelsen et al., 2011*). Cette liaison de Cbl à l'EGFR peut être renforcée par l'adaptateur Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) qui interagit avec deux tyrosines de l'EGFR : Tyr1068 et Tyr 1086 (**Figure 7**) (*Jiang et al., 2003*).

Lorsqu'un complexe EGFR-Cbl stable est formé, les tyrosines kinases de l'EGFR phosphorylent la protéine Cbl ce qui entraîne le recrutement d'une molécule E2 chargée en ubiquitine (*Levkowitz et al., 1999*). La molécule E2 transfère alors le polypeptide ubiquitine sur les résidus lysines de l'EGFR. Des protéines adaptatrices contenant un domaine de liaison à l'ubiquitine (ubiquitine-binding domain UBD) permettent de lier le récepteur ubiquitylé aux molécules de clathrine conduisant ainsi l'EGFR dans les puits d'endocytose recouvert de clathrine (*Goh and Sorkin, 2013*). Chaque sous-unité de clathrine est composée de trois grosses chaînes polypeptidiques et de trois petites qui forment une structure particulière à trois bras appelé triskélium (**Figure 7**). Une protéine, l'adaptine, est nécessaire pour relier le réseau de clathrines à la face interne de la membrane plasmique.

Des études utilisant la microscopie TIRF (total internal reflection fluorescence) ont étudié la dynamique membranaire de l'EGFR sur des cellules vivantes. Les clusters d'EGFR actifs sont localisés dans des réseaux de clathrines préformés à la surface de la cellule. Le complexe protéique AP2 (clathrin adaptator protein complex 2), composé des protéines adaptines, intervient ensuite dans l'invagination de ces domaines membranaires riches en clathrines (*Rappoport and Simon, 2009*). La vésicule d'endocytose ainsi créée, est libérée de la membrane et le manteau de clathrine est rapidement éliminé.

### 1.3.2. Endocytose clathrine-indépendante

Des études ont montré que l'EGFR suivait des routes d'internalisation différentes suivant la concentration en ligand disponible. En effet, lorsque l'EGFR est stimulé par des concentrations physiologiques d'EGF, il se localise préférentiellement dans des invaginations recouvertes de clathrine. Lorsque la concentration en ligand est importante, la voie d'endocytose dépendante des clathrines est saturée et l'EGFR est internalisé par d'autres mécanismes indépendants des clathrines. Dans ce cas, l'EGFR co-localise avec la cavéoline-1, protéine structurale majeure des radeaux lipidiques (riches en cholestérol et glycosphingolipides) formant les cavéoles (*Sigismund et al., 2005*).

Dans ce cas ce n'est pas le manteau de protéines qui permet l'invagination de la membrane mais la composition lipidique de la membrane de la cavéole.

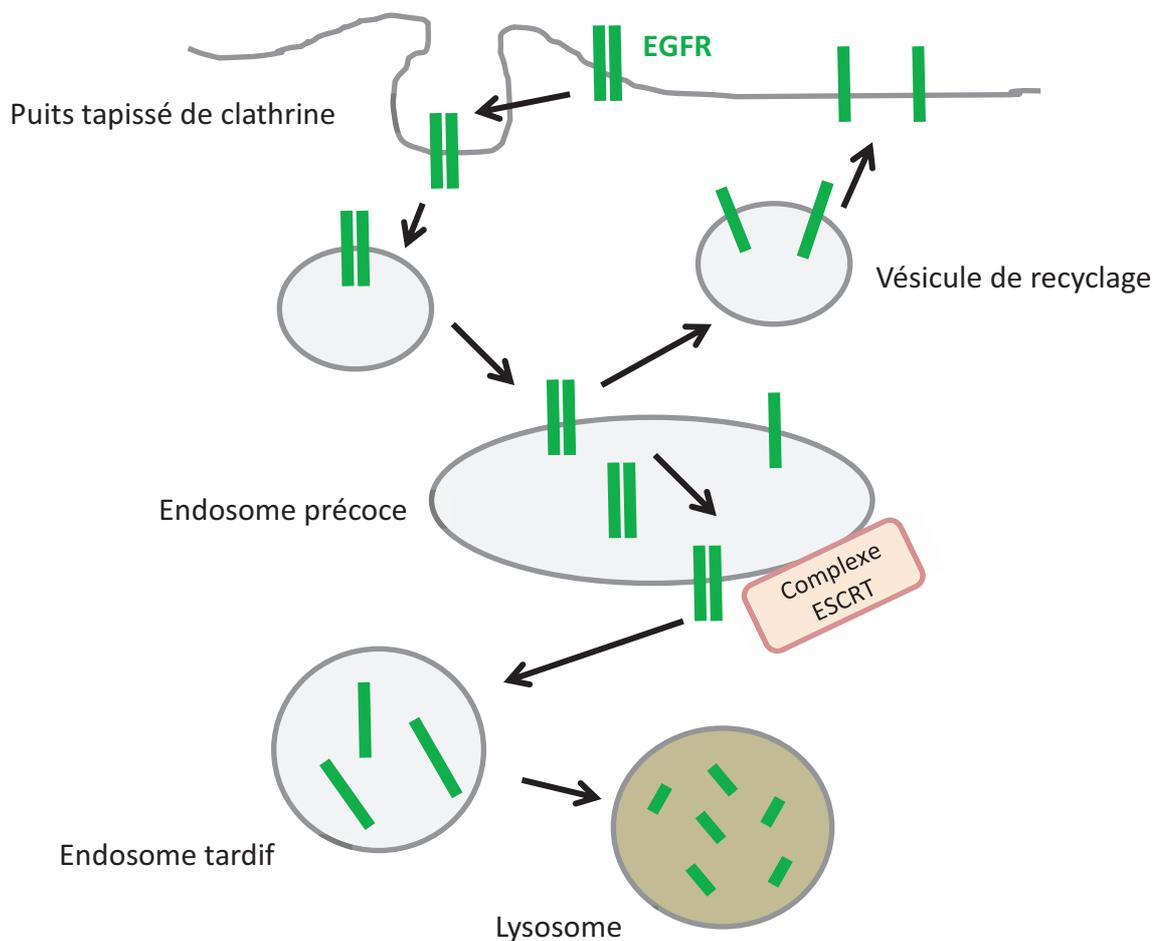
Cependant, une étude a mis en évidence que même en présence de fortes concentrations en EGF, l'endocytose de l'EGFR était inhibée dans un modèle de cellules Hela ne possédant pas les molécules de clathrines (*Kazazic et al., 2006*). Cela suggère que de fortes concentrations en EGF n'induisent pas obligatoirement une endocytose de l'EGFR mobilisant les cavéoles. L'endocytose de l'EGFR via un phénomène dépendant des clathrines demeure donc le mécanisme d'internalisation prédominant de l'EGFR activé par son ligand.

La nature du ligand qui stimule l'EGFR semble aussi important dans la régulation des mécanismes d'endocytose du récepteur. En effet, l'activation de l'EGFR par l'EGF et le TGF $\alpha$  induit une endocytose de l'EGFR dépendante des clathrines. En revanche, l'inhibition de la clathrine ne réduit qu'en partie l'endocytose de l'EGFR après stimulation avec HB-EGF. Cela suggère que HB-EGF stimule des mécanismes d'endocytose à la fois clathrine dépendants et indépendants (*Henriksen et al., 2013*).

### 1.3.3. Devenir des récepteurs internalisés : recyclage ou dégradation

Suite à son internalisation par endocytose clathrine-dépendante, l'EGFR est transporté dans des endosomes précoces. Des protéines cargos orientant l'EGFR vers une dégradation dans les lysosomes ou un recyclage à la membrane, se regroupent à proximité des sites de formation des invaginations membranaires. Les endosomes précoces semblent orienter un recyclage membranaire de l'EGFR (**Figure 8**). En revanche, lorsque l'EGFR est transporté dans des endosomes tardifs par la machinerie ESCRT (endosomal sorting complex required for transport), il est engagé dans une voie de dégradation lysosomale (*Roepstorff et al., 2008*). Une protéine régulatrice des récepteurs de la famille HER, Mig-6 (mitogen-inducible gene-6), serait impliquée dans le trafic de l'EGFR dans des lignées cellulaires de GBM (*Ying et al., 2010*). En effet, Mig-6 supprimerait le potentiel malin des cellules de GBM (réduction de la prolifération, de la survie clonogénique et de l'invasion) en favorisant l'orientation de l'EGFR dans les compartiments lysosomaux et donc sa dégradation.

Une étude récente a montré que la régulation du pH endosomal modifiait le potentiel oncogénique de l'EGFR dans le GBM. NHE9 est un échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dont le gain de fonction va alkalyner l'endosome mais dont la perte de fonction va au contraire acidifier les vésicules intracellulaires. Dans les cellules de GBM, NHE9 est exprimé en excès. Cela limite l'acidification des endosomes favorisant le recyclage membranaire de l'EGFR et ainsi la persistance de l'activation des voies de signalisation régulant la croissance et la migration tumorale (Kondapalli et al., 2015).



**Figure 8: Internalisation et tri endosomal de l'EGFR (Figure adaptée de Roepstorff et al., 2008).** Après son activation par l'EGF, l'EGFR (vert) est transporté dans des puits recouverts de clathrine à la membrane plasmique puis internalisé. Après son transport dans les endosomes précoces, l'EGFR peut être recyclé à la membrane plasmique ou incorporé dans des vésicules au sein des endosomes précoces. Les endosomes précoces vont mûrir en endosomes tardifs sous l'impulsion de la machinerie ESCRT (endosomal sorting complex required for transport - ESCRT 0, I, II et III) et l'EGFR pourra être dégradé dans les lysosomes.

Les différents ligands de l'EGFR semblent également influencer le devenir du récepteur internalisé. Alors que l'EGF oriente le récepteur vers une voie de dégradation, le TGF $\alpha$  permet le recyclage du récepteur (Longva et al., 2002). Le pH endosomal est critique pour l'adressage de l'EGFR dans les différents types de vésicules intracellulaires. L'EGF lié à l'EGFR est relativement stable à de faibles pH dans les endosomes. En revanche le TGF $\alpha$  se dissocie rapidement de l'EGFR dans les endosomes ce qui conduit à une déphosphorylation, une déubiquitinylation du récepteur et ainsi un recyclage à la surface cellulaire.

### **2. Les mécanismes de dérégulation de l'EGFR dans le glioblastome**

Le potentiel oncogénique des récepteurs ErbB et de leurs ligands dans les carcinomes humains a été confirmé dans un grand nombre d'études qui ont montré une surexpression de ces protéines dans la majorité des tumeurs solides. L'expression de l'EGFR et ErbB-3 a été décrite comme dérégulée chez 50 à 70% des patients ayant un gliome, un carcinome mammaire, pulmonaire ou du colon. Le rôle de l'EGFR dans la progression maligne du GBM et son effet sur la survie des patients a été largement discuté. La surexpression des récepteurs ErbB-2 et ErbB-4 est généralement restreinte aux carcinomes mammaires (Normanno et al., 2006).

Le séquençage de l'exome et l'analyse du nombre de copies de l'ADN de 251 GBM provenant du TCGA (The Cancer Genome Atlas) a permis de montrer que l'EGFR était le récepteur tyrosine kinase le plus altéré (en terme d'amplification et de mutations) dans le GBM (57.4% des cas) alors que PDGFRA et MET ne sont altérés que chez 13.1 et 1.6% des patients respectivement (Brennan et al., 2013b). L'amplification et les mutations de l'EGFR sont des événements qui interviennent tardivement dans la tumorigénèse du GBM (Del Vecchio et al., 2013).

### 2.1. Amplification du gène de l'EGFR

L'amplification génique correspond à une augmentation du nombre de copies du gène de l'EGFR (**Figure 9B**). Les copies surnuméraires se trouvent alors soit sous forme intégrée dans un chromosome, soit sous forme de mini chromosomes surnuméraires, les chromosomes double minute (fragment d'ADN extra chromosomique instables dépourvus de centromères).

De nombreux travaux étudiant l'expression de l'EGFR dans des biopsies de patients atteints de GBM, révèlent que 40 à 55% de ces patients sont porteurs d'une amplification génique de l'EGFR et que cette dérégulation de l'EGFR est associée avec une diminution de la survie des patients (*Zhao et al., 2012*). Des auteurs ont mis en évidence une nouvelle forme de mutations liées à une amplification génique : les mutations extra-chromosomales. Dans des échantillons de patients atteints de GBM provenant du TCGA, l'EGFR sauvage et son mutant vIII sont amplifiés mais les niveaux d'amplification varient d'une cellule tumorale à l'autre. L'analyse par FISH du mutant vIII de l'EGFR révèle une localisation à l'extérieur des chromosomes dans des fragments d'ADN double-minute dans 20% des échantillons analysés (*Sanborn et al., 2013*).

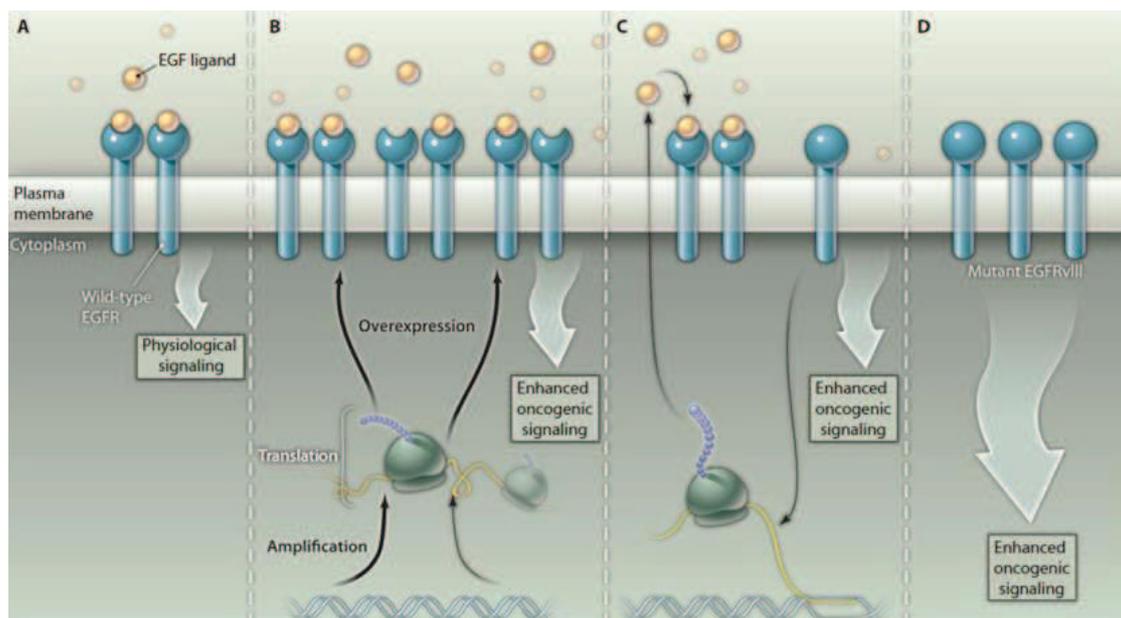
Bien que les dérégulations de l'EGFR soient reliées à une résistance aux traitements et un mauvais pronostic dans le GBM, certaines études cliniques menées sur des carcinomes pulmonaires suggèrent au contraire qu'une augmentation du nombre de copies de l'EGFR pourrait être un facteur moléculaire prédictif de l'efficacité des thérapies ciblant le récepteur (*Cappuzzo et al., 2005*). Une étude moléculaire récente sur des biopsies provenant de récives de patients atteints de GBM a montré un rôle pronostique favorable de la surexpression de l'EGFR chez les patients ayant reçu une chimiothérapie métronomique par temozolomide. En revanche, il n'y a pas d'association entre la survie et une amplification génique de l'EGFR chez les patients ayant reçu le protocole de chimiothérapie standard (*Cominelli et al., 2015*).

### 2.2. Les mutations de l'EGFR

Les mutations de l'EGFR varient selon le type tumoral. Par exemple, des mutations somatiques dans le domaine kinase de l'EGFR comme L858R sont fréquemment retrouvées

dans le cancer du poumon non à petites cellules mais elles sont rares dans les GBM (Furnari et al., 2015).

Les mutations qui impliquent des délétions dans le domaine extracellulaire sont seulement retrouvées dans le GBM : le variant I de l'EGFR possède un domaine N-terminal tronqué. Une délétion des exons 14-15 décrit le variant II de l'EGFR. L'EGFR vIII est constitutivement actif car il a perdu la capacité de fixation d'un agoniste par délétion des exons 2 à 7 du domaine extracellulaire (**Figure 9D**) (Francis et al., 2014; Nishikawa et al., 2004). Les délétions au niveau de la queue cytoplasmique sont aussi exclusives du GBM : l'EGFRvIV (délétion des exons 25-27) et l'EGFRvV (délétion des exons 25-28). L'ubiquitinylation et la dégradation de ces deux mutants sont diminuées car les délétions portent sur le site de liaison de la ligase Cbl sur la tyrosine Y1045 de l'EGFR (Peschard et al., 2007).



**Figure 9: Les mécanismes de dérégulation de l'EGFR dans le GBM (Huang et al., 2009).** A- Signalisation physiologique de l'EGFR suite à la fixation de son ligand. Dans le GBM, trois mécanismes majeurs conduisent à la dérégulation de la signalisation de l'EGFR. B- Amplification génique de l'EGFR conduisant à une augmentation du nombre de récepteurs fonctionnels à la surface de la cellule. C- La sécrétion d'une grande quantité de ligand active une boucle de régulation autocrine. D- La présence du mutant EGFRvIII permet une activation constitutive du récepteur en absence de fixation de son ligand. Ces trois mécanismes entraînent une amplification des voies de signalisation en aval du récepteur conduisant à augmenter la malignité du GBM.

Afin de mettre en évidence des mutations en dehors du domaine kinase de l'EGFR, des chercheurs ont séquencé les régions codantes de l'EGFR à partir d'échantillons d'ADN provenant de 132 biopsies de GBM et 8 lignées cellulaires de GBM. Ils ont découvert une autre classe de mutations, les mutations non-sens situées sur le domaine extracellulaire de l'EGFR. Ces mutations augmentent les propriétés tumorigéniques du GBM. Les substitutions nucléotidiques G323A (exon 3) et A787C (exon 7) sont les plus fréquemment décrites (*Brennan et al., 2013b; Lee et al., 2006*).

Le mutant EGFRvIII de l'EGFR (aussi nommé  $\Delta$ EGFR ou 2-7EGFR) est privé d'une partie de son domaine extracellulaire de liaison au ligand donnant lieu à une activation constitutive de ce récepteur, indépendamment de la présence d'un agoniste. Il est caractérisé par la délétion des exons 2 à 7 du gène de l'EGFR ce qui correspond à une délétion des domaines extracellulaires I et II de l'EGFR (**Figure 9D**). Cette mutation empêche respectivement la fixation du ligand et la modulation du récepteur en conformation inactive.

On connaît depuis longtemps le potentiel oncogénique du mutant VIII de l'EGFR. Dans environ 50% des GBM avec une amplification de l'EGFR, le mutant spécifique EGFRvIII est détecté (*Huang et al., 2009*). L'inoculation de cellules de GBM exprimant l'EGFRvIII dans des souris Nude conduit à un développement tumoral plus rapide que chez les souris ayant reçu des cellules de GBM exprimant la forme sauvage de l'EGFR (*Nishikawa et al., 1994*). De nombreuses autres études confirment que la co-expression de l'EGFR et de son mutant VIII potentialise la malignité des cellules de GBM *in vitro* et *in vivo* (*Fan et al., 2013; Zhu et al., 2009*).

Cette valeur pronostique de l'EGFR muté dans le GBM a également été mise en évidence chez le patient. Plusieurs études cliniques incluant des patients diagnostiqués pour un GBM et porteurs d'une amplification de l'EGFR associée ou non à l'expression de l'EGFRvIII ont mis en évidence une survie globale plus faible chez les patients porteurs du mutant EGFRvIII en comparaison aux patients uniquement porteurs d'une amplification de l'EGFR (*Lv et al., 2012; Shinojima et al., 2003*).

Nous avons vu que l'expression du mutant VIII de l'EGFR était associée à un mauvais pronostic dans les gliomes de haut grade. Cependant, de récentes études contredisent ces conclusions. L'étude d'une cohorte de 50 GBM montrant une amplification de l'EGFR et l'expression du mutant EGFRVIII, n'a pas permis de faire le lien entre la survie globale des patients et la présence d'une dérégulation de l'EGFR (*Faulkner et al., 2014*). Une méta-analyse récente menée à partir de base de données bibliographiques confirme qu'il n'y a pas de différence significative entre la survie globale des patients positifs et négatifs pour la mutation EGFRVIII (*Chen et al., 2015*). Des différences (grade tumoral, ethnie, âge...) entre les populations de patients inclus dans ces études pourraient expliquer ces divergences de résultats. En considérant ces études dans leur ensemble, il est difficile de conclure que le mutant EGFRVIII puisse être un marqueur pronostique de la survie des patients atteints de GBM.

### 2.3. Surabondance des ligands de l'EGFR

L'augmentation de l'expression de l'EGFR dans les GBM est parfois accompagnée d'une surabondance des ligands solubles EGF et TGF $\alpha$  qui amplifie l'activation de la boucle autocrine et ainsi une dérégulation chronique de la signalisation du récepteur (*Singh and Harris, 2005*) (**Figure 9C**). Une étude de 43 échantillons de tumeurs cérébrales montre que l'expression de la protéase ADAM12 (a disintegrin and metalloprotease 12) est 5.7 fois plus importante dans les GBM que dans les autres tumeurs cérébrales. De plus, ADAM12 augmente le clivage et le relargage de l'HB-EGF (heparin binding EGF like growth factor), un ligand de l'EGFR lié à la MEC, entraînant une sur-activation de l'EGFR (*Kodama et al., 2004*). Une analyse de l'expression de différents gènes dans des cellules de GBM exprimant le mutant EGFRVIII, indique une augmentation de l'expression du TGF $\alpha$  et de l'HB-EGF (*Ramnarain et al., 2006*). L'EGFRVIII pourrait ainsi jouer un rôle dans l'activation de la boucle autocrine de l'EGFR non muté et ainsi maintenir une activité signalétique en aval du récepteur.

### 3. Thérapies anti-tumorales ciblant l'EGFR dans les glioblastomes

Nous l'avons vu, malgré l'optimisation des schémas d'administration de la chimio- et radiothérapie, la survie des patients atteints de GBM dépasse rarement 15 mois. Les récurrences tumorales sont inévitables et limitent alors les options thérapeutiques disponibles. Des progrès majeurs dans la connaissance de la biologie cellulaire et moléculaire des cancers ont permis le développement de thérapies ciblées. Dans le cas du GBM, les thérapies ciblées sont majoritairement dirigées vers les facteurs de croissance (VEGF, EGF et PDGF) et leurs récepteurs. L'altération génétique la plus commune dans les GBM étant l'amplification de l'EGFR, de nombreuses thérapies ciblant l'EGFR et son mutant constitutivement actif, l'EGFRvIII sont développées en clinique.

Il existe actuellement 4 stratégies pour inhiber l'EGFR et les voies de signalisation dépendantes du récepteur : les anticorps monoclonaux qui ciblent le domaine extracellulaire de liaison au ligand, les inhibiteurs de tyrosines kinases qui ciblent l'activité tyrosine kinase intrinsèque de l'EGFR, les vaccins anti-tumoraux et les thérapies basées sur les ARN EGFR (*Taylor et al., 2012b*). Je ne développerai ici que les deux premières classes d'anti-EGFR car ce sont les classes thérapeutiques les plus utilisées dans la prise en charge clinique du patient.

#### 3.1. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques

Les anticorps monoclonaux occupent maintenant une place importante en oncologie car la chimiothérapie conventionnelle est peu sélective et implique des toxicités collatérales qui limitent l'utilisation à long terme de composés puissants.

Pour facilement distinguer l'origine des anticorps monoclonaux en clinique, une nomenclature internationale a été adoptée utilisant un suffixe spécifique indiquant la source et la fonction de l'anticorps (*Scheen, 2009*).

La syllabe précédant le suffixe « mab » (commun à tous les anticorps) détermine le type d'anticorps : « o » pour les anticorps de souris, « xi » pour les anticorps chimériques, « zu » pour les anticorps humanisés et enfin « u » pour les anticorps humains (**Tableau 1**).

Type d'anticorps	Suffixe	% humain	Antigénicité	Exemples
murins	« momab »	0	+++	Muromomab (Orthoclone®)
chimériques	« ximab »	60-70	+	Cetuximab (Erbitux®)
humanisés	« zumab »	>90	+/- 0	Nimotuzumab (Theraloc®)
humains	« mumab »	100	+/- 0	Panitumumab (Vectibix®)

**Tableau 1:** Nomenclature internationale simplifiée des différentes catégories d'anticorps monoclonaux (Adaptée de Scheen A.J. 2009).

### 3.1.1. Mécanisme d'action

Les anticorps monoclonaux administrés par voie parentérale, peuvent spécifiquement se lier à la partie extracellulaire du récepteur, avec une grande affinité, et bloquer son activation.

La constatation selon laquelle la réaction immunitaire du patient contre les anticorps de souris compromet l'efficacité thérapeutique a conduit au développement de stratégies visant à diminuer l'immunogénicité des anticorps monoclonaux. Se sont alors développés les anticorps chimériques constitués d'une partie murine variable et d'une partie humaine constante (Harris, 2004). La fréquence d'induction d'une réponse anti-anticorps chez les patients a considérablement diminué permettant une administration répétée de ces composés. Le cetuximab (Erbitux®) est un anticorps monoclonal chimérique qui n'induit que très rarement la formation d'anti-anticorps.

Les anticorps monoclonaux induisent des effets cytotoxiques contre les cellules tumorales par une interaction avec le système immunitaire. On parlera alors de mécanismes immuno-transmis. Lorsque l'anticorps monoclonal s'est fixé sur sa cible tumorale, les cellules « natural killer » (effecteurs de l'immunité acquise) ou les molécules du complément (effecteurs de l'immunité innée) vont reconnaître le fragment constant des anticorps.

La cellule tumorale est alors détruite par un phénomène ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity). Les anticorps chimériques comme le cetuximab, sont particulièrement impliqués dans les réponses ADCC (*Gelderman et al., 2004*). Les anticorps monoclonaux peuvent cependant induire des effets thérapeutiques sans devoir activer des réponses immunologiques. Ils peuvent bloquer directement les récepteurs cibles ou leurs ligands solubles. Ils peuvent également activer les cascades de signalisation intracellulaire et conduire par exemple à l'apoptose des cellules tumorales. On parlera alors de mécanismes bio-régulateurs.

### *3.1.2 Développement clinique des anticorps monoclonaux dans les gliomes*

Depuis une vingtaine d'années, différents anticorps monoclonaux ont été développés et inclus dans des protocoles d'essais cliniques auprès de patients diagnostiqués pour une tumeur cérébrale et réfractaires aux thérapies conventionnelles.

- Le cetuximab, que nous détaillerons plus particulièrement dans le paragraphe suivant, est un anticorps monoclonal inclus dans des protocoles d'essais cliniques sur les gliomes **(Tableaux 1 et 2)**.

- L'anticorps monoclonal Mab 806 est un anticorps anti-EGFR qui est produit après immunisation de souris avec des fibroblastes de souris NR6 exprimant le mutant EGFRvIII (*Mishima et al., 2001*). Il se lie donc au mutant EGFRvIII mais également à l'EGFR sauvage dans des lignées cellulaires de GBM (U87MG) surexprimant l'EGFR (*Johns et al., 2002*). Mab806 augmente l'efficacité des radiations ionisantes dans des xénogreffes de cellules de GBM exprimant l'EGFRvIII, favorisant ainsi une réduction du volume tumoral (*Johns et al., 2010*).

- Le Nimotuzumab est un anticorps anti-EGFR humanisé (**Tableaux 1 et 2**). Il a été inclus dans des essais cliniques de phase II et III dans le traitement de GBM pédiatrique chez l'enfant et l'adolescent mais les résultats finaux de ces études n'ont pas été publiés (*MacDonald et al., 2011*). Une étude testant l'impact clinique du Nimotuzumab chez 35 patients adultes atteints de gliomes malins, a mis en évidence une prolongation de la survie médiane chez les patients ayant reçu l'anticorps en association à la radiothérapie, en comparaison aux patients n'ayant reçu que la radiothérapie seule (12,4 mois versus 8 mois respectivement) (*Solomon et al., 2014*). Cependant, un essai clinique de phase III incluant 149 patients diagnostiqués pour un GBM et traités au Nimotuzumab, a révélé que ce nouvel anti-EGFR était bien toléré mais ne prolongeait pas statistiquement la survie globale et la survie sans progression des patients (*Westphal et al., 2015*).

- Le panitumumab est un anticorps anti-EGFR humain (**Tableaux 1 et 2**). Cet anticorps a été testé en association avec l'Irinotecan dans le GBM mais les résultats n'ont pas été publiés (*Alifieris and Trafalis, 2015*).

Anticorps monoclonal	Nom commercial	Classe	Essais cliniques (références dans le texte)
Cetuximab	Erbix <sup>®</sup>	chimérique	Phase II – GBM récidivant et/ou porteur de dérégulations de l'EGFR
Panitumumab	Vectibix <sup>®</sup>	humain	GBM – résultats non publiés
Nimotuzumab	Orphanet <sup>®</sup>	humanisé	Phase II/III – GBM de l'adulte et pédiatrique

**Tableau 2:** Liste non exhaustive d'anticorps monoclonaux anti-EGFR en essais cliniques dans les gliomes

### 3.1.3. Le Cetuximab : des études précliniques aux essais cliniques

Le cetuximab (Erbix<sup>®</sup>), aussi connu sous le nom de C225 (du nom de son progéniteur murin M225), est un anticorps monoclonal chimérique qui se lie spécifiquement à l'EGFR avec une haute affinité empêchant l'interaction du ligand avec son récepteur (**Tableaux 1 et 2**).

Le cetuximab a une meilleure affinité pour l'EGFR (constante d'affinité 0,1nM) que ses ligands l'EGF ou le TGF- $\alpha$  (constante d'affinité de 1nM) (*Goldstein et al., 1995*). La liaison du cetuximab inhibe l'autophosphorylation de l'EGFR et induit son internalisation et sa dégradation.

Le cetuximab a été le premier anticorps chimérique inclus dans des protocoles cliniques. Il a été testé dans des essais cliniques de phase III pour le traitement d'une grande variété de tumeurs solides. Le cetuximab a obtenu son autorisation de mise sur le marché (AMM) en France en 2004 dans le cas du traitement de cancer colorectal métastatique exprimant l'EGFR (donnée issue de l'avis de la commission de la transparence de la Haute Autorité de Santé). Des études cliniques ont ensuite montré que la mutation KRAS était associée à une résistance au cetuximab et à une survie plus courte de ces patients (*Lièvre et al., 2006*). Les derniers rectificatifs de la Haute Autorité de Santé (en 2008) préconisent maintenant l'utilisation thérapeutique du cetuximab chez des patients présentant un cancer colorectal métastatique avec le gène KRAS de type sauvage et exprimant l'EGFR. L'identification du statut KRAS permet d'identifier les patients qui auraient un bénéfice clinique à l'utilisation du cetuximab et éviter des administrations potentiellement toxiques chez des patients non répondeurs.

Des données pré-cliniques révèlent que le cetuximab est incapable d'inhiber la croissance cellulaire *in vitro* de nombreuses lignées de GBM même lorsque celles-ci présentent une amplification de l'EGFR (*Hasselbalch et al., 2010a*). Cependant, l'ajout de cetuximab au schéma classique chimiothérapie (témozolomide) et radiothérapie, a montré un effet additif concernant la survie *in vitro* des cellules de GBM (*Combs et al., 2007*). Des xénogreffes de cellules de GBM dans des souris immunodéprimées ont permis de démontrer que le cetuximab réduit de manière significative la croissance tumorale et augmente la survie médiane des souris (*Eller et al., 2002*).

L'efficacité du cetuximab chez les patients atteints de GBM est bien moins évidente. Dans un essai clinique de phase II, les auteurs ont conclu que le traitement était généralement bien toléré même si des toxicités dermatologiques étaient observées chez 11% des patients. La survie globale des patients était légèrement supérieure chez les patients porteurs d'une amplification de l'EGFR mais cette différence n'était pas significative (*Neyns et al., 2009*).

Un autre essai clinique de phase II a testé l'efficacité de la combinaison du cetuximab et du bévécizumab et irinotecan (utilisés dans le traitement des cancers colorectaux avancés) chez des patients ayant développés un GBM récidivant. Le cetuximab n'a apporté aucun bénéfice clinique à ces patients (*Hasselbalch et al., 2010b*).

Les études concluant régulièrement à une absence de bénéfice clinique pour ces patients, aucun anticorps monoclonal n'a obtenu à ce jour en France d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement des gliomes.

### 3.2. Les inhibiteurs d'activité tyrosine kinase

Les récepteurs à activité tyrosine kinase ont été largement étudiés depuis une vingtaine d'années. De nombreux laboratoires ont recherché des inhibiteurs de l'activité enzymatique des diverses tyrosines kinases. La nomenclature de ces anticancéreux en expansion est facilement identifiable car leur dénomination commune internationale (DCI) se termine par le suffixe « inib ».

#### 3.2.1. Mécanisme d'action

La quinazoline est un composé organique aromatique dont les dérivés sont fréquemment utilisés pour la fabrication d'anti-cancéreux comme les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI – tyrosine kinase inhibitor). Les TKI ciblent la partie intracellulaire du récepteur puisqu'ils entrent en compétition avec l'ATP en se liant au site catalytique du domaine tyrosine kinase de l'EGFR. Bien que ces inhibiteurs partagent un mécanisme d'action commun, ils ont des spécificités d'interaction pour les différents récepteurs ErbB (*Grünwald and Hidalgo, 2003*). Ils diffèrent également par la réversibilité de liaison avec le site de liaison de l'ATP. La liaison réversible ou irréversible de ces inhibiteurs dans la poche à ATP de l'EGFR abolit à la fois l'autophosphorylation du récepteur et l'activation des voies de signalisation en aval impliquées dans la prolifération, la survie et la migration des cellules cancéreuses.

#### 3.2.2 Développement clinique des TKI de l'EGFR dans les gliomes

La découverte de l'amplification du gène de l'EGFR dans près de la moitié des GBM a restitué les TKI comme molécules de choix de la prise en charge personnalisée des patients porteurs de GBM.

- Le gefitinib, que nous détaillerons plus particulièrement dans le paragraphe suivant, est un inhibiteur de tyrosine kinase réversible spécifique de l'EGFR inclus dans des protocoles d'essais cliniques sur les gliomes (**Tableau 3**).

- L'erlotinib est un inhibiteur de tyrosine kinase réversible indiqué dans le cancer du pancréas métastatique (données issues de l'avis de la commission de la transparence de la Haute Autorité de Santé) (**Tableau 3**). Un essai clinique de phase II n'a pas démontré de réelle amélioration de la survie sans progression et survie globale des patients atteints d'un GBM stabilisé suite aux cures de radiothérapie. Les auteurs ont tout de même mis en évidence une corrélation entre le développement de toxicité dermatologique et une meilleure réponse au traitement (*Raizer et al., 2010*).

- L'afatinib est un inhibiteur de tyrosine kinase irréversible indiqué dans le cancer bronchique non à petites cellules et présentant des mutations activatrices de l'EGFR (données issues de l'avis de la commission de la transparence de la Haute Autorité de Santé) (**Tableau 3**). Il se lie de manière covalente à un résidu cystéine du site de liaison de l'ATP de l'EGFR (Cys 797), HER2 (Cys 805), et ERBB4 (Cys 803). Cette liaison covalente irréversible inhibe l'activité tyrosine kinase et ainsi les étapes importantes de la transduction du signal de tous les membres de la famille ErbB (*Hirsh, 2015*). Dans des xénogreffes de gliomes, la croissance tumorale était réduite par l'ajout de l'afatinib. De plus, le volume tumoral maximal mesuré était atteint 75 jours après la greffe chez les souris traitées avec l'afatinib en association avec la radiothérapie, par comparaison aux souris du groupe contrôle (moins de 25 jours) (*Gurtner et al., 2014*). Une étude récente a évalué dans un essai de phase I, la dose maximum tolérée d'afatinib (en termes d'efficacité et de sécurité) en monothérapie ou en association avec le temozolomide chez des patients atteints de GBM récurrents. Le taux de survie sans progression des patients à 6 mois était de 3% dans le bras afatinib en monothérapie (survie toutefois meilleure chez les patients porteurs de l'EGFRvIII), 10% dans le bras afatinib associé au temozolomide et 23% dans le bras temozolomide en monothérapie (*Reardon et al., 2015*). Une étude combinant l'afatinib et la radiothérapie avec ou sans temozolomide est actuellement en cours (NCT00977431) (*Alifieris and Trafalis, 2015*).

- Le dacomitinib est un nouvel inhibiteur de tyrosine kinase irréversible qui n'a pour l'instant pas d'autorisation de mise sur le marché définie pour une pathologie (**Tableau 3**). Il est actuellement à l'étude dans deux essais cliniques de phase II: l'un incluant des patients atteints de GBM et porteurs d'une dérégulation de l'EGFR et l'autre incluant des patients atteints de GBM récurrents (*Alifieris and Trafalis, 2015*).

Inhibiteurs de tyrosine kinase	Nom commercial	Classe	Essais cliniques (références dans le texte)
Gefitinib	Iressa <sup>®</sup>	TKI réversible	Phase II – GBM récurrent
Erlotinib	Tarceva <sup>®</sup>	TKI réversible	Phase II – GBM récurrent
Afatinib	Giotrif <sup>®</sup>	TKI irréversible	Phase II – GBM récurrent
Dacomitinib	-	TKI irréversible	Phase II – GBM porteur de dérégulations de l'EGFR ou récidivant

**Tableau 3:** Liste non exhaustive d'inhibiteurs de tyrosine kinase en essais cliniques dans les gliomes

### 3.2.3. Le gefitinib : des études précliniques aux essais cliniques

Le gefitinib (Iressa<sup>®</sup>) est une molécule synthétique dérivée de l'anilinoquinazoline qui inhibe le domaine tyrosine kinase de l'EGFR de manière réversible (**Tableau 3**). Le gefitinib est sélectif de l'EGFR car il réduit l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (IC50 comprise entre 0,023 $\mu$ M et 0,079 $\mu$ M) approximativement 100 fois plus efficacement que celle de HER-2 (IC50>3,7 $\mu$ M) (*Grünwald and Hidalgo, 2003*).

Le gefitinib a obtenu son AMM en 2009 pour le traitement des patients atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) réfractaires aux chimiothérapies conventionnelles et possédant des mutations activatrices de l'EGFR (*Lynch et al., 2004*). Ces mutations activatrices sont localisées dans la plupart des cas sur les exons 18 à 21 de l'EGFR. Leur présence orientait généralement le choix thérapeutique vers l'utilisation du gefitinib. Cependant, ces patients ont développé des résistances au cours du traitement que l'on attribue aujourd'hui à la présence d'une nouvelle mutation appelée T790M (mutation sur la thréonine 790 en méthionine) située au niveau de l'exon 20 de l'EGFR (*Wang et al., 2014*).

Cette mutation semble être acquise au cours du traitement car elle n'est pas observée chez les patients qui n'ont pas reçu de gefitinib.

Il a été mis en évidence qu'une amplification de l'EGFR permettait également une meilleure réponse au gefitinib chez les patients atteints de CBNPC en termes de temps de progression de la maladie et survie globale (*Cappuzzo et al., 2005*). Le cancer bronchique fait l'objet de nombreuses études qui permettent une prise en charge de plus en plus précise des patients.

Des données pré-cliniques provenant d'études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que le traitement utilisant le gefitinib seul peut réduire le potentiel oncogénique de nombreuses tumeurs solides. L'angiogénèse tumorale est un processus qui conduit à la formation de nouveaux vaisseaux dans la masse tumorale. Elle joue un rôle central dans la survie et la prolifération cellulaire puisque ces nouveaux vaisseaux apportent les nutriments et l'oxygène nécessaire à la croissance de la masse tumorale. Le développement de cette vascularisation tumorale est dépendant de la production de facteurs de croissance tels que le TGF- $\alpha$  et le VEGF. Dans différentes lignées cancéreuses humaines (colon, sein, ovaire, estomac, poumon) surexprimant l'EGFR, le gefitinib démontre un effet anti-angiogénique par inhibition de la synthèse du TGF- $\alpha$  et du VEGF (*Ciardiello et al., 2001*). Cet effet anti-angiogénique contribue également à un effet antiprolifératif et anti tumoral *in vivo*.

Dans la littérature, peu d'études ont exploré l'impact du gefitinib sur le développement des gliomes *in vitro* et chez l'animal. Dans des modèles *in vivo* d'oligodendrogliomes, il a été montré que le gefitinib augmentait le délai de croissance des tumeurs de 4,5 à 16 jours selon les xénogreffes considérées (*Pinel et al., 2013*). Le traitement combinant la radiothérapie et le gefitinib permettait de tripler la médiane de survie des souris en comparaison à la radiothérapie seule (118 jours vs 37 jours respectivement) soulignant l'impact du gefitinib pour radio-sensibiliser les oligodendrogliomes.

Malheureusement, ces données pré-cliniques encourageantes n'ont pas été confirmées en clinique. Des essais cliniques ont décrit l'utilisation du gefitinib jusqu'en phase II chez des patients porteurs d'un GBM. Bien qu'il soit bien toléré, les conclusions unanimes n'ont pas démontré de réel bénéfice clinique à l'utilisation du gefitinib seul ou en association avec la radiothérapie (*Chakravarti et al., 2013; Franceschi et al., 2007; Rich et al., 2004; Uhm et al., 2011*).

L'EGFR a été largement décrit comme ayant un rôle important dans l'oncogénicité du GBM. Pourtant les essais cliniques impliquant des inhibiteurs de l'EGFR peinent à montrer des résultats prometteurs dans les gliomes de haut grade.

### 3.3. Les mécanismes de résistance aux anti-EGFR

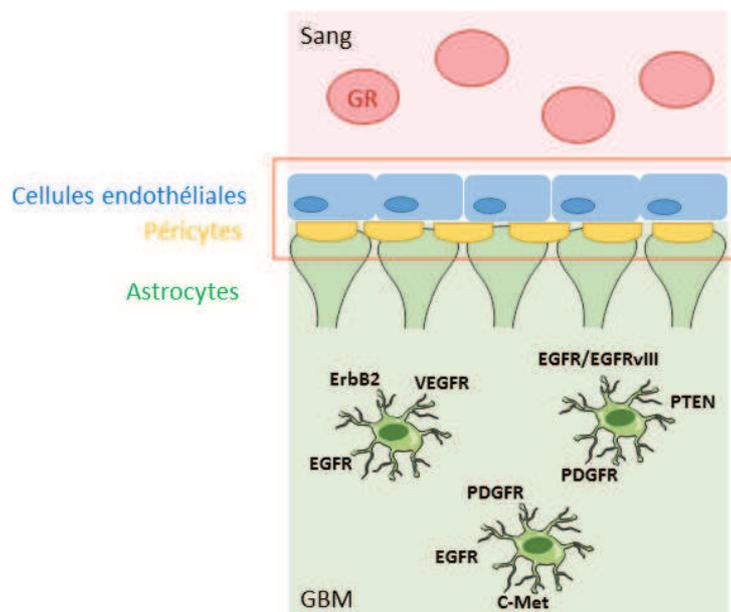
En dépit de l'avancée des connaissances sur la biologie et la génétique des gliomes de haut grade, ces pathologies demeurent à ce jour, incurables. On a vu précédemment que les thérapies anti-EGFR avaient eu quelques beaux succès dans le traitement de certaines tumeurs solides mais malheureusement les mécanismes de résistance développés dans les gliomes sont nombreux et probablement pas encore tous identifiés.

Dans le cancer du poumon, 4 mutations du domaine kinase de l'EGFR sont associées à une résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase chez plus de 50% des patients : les substitutions L747S et D76Y sur l'exon 19, la substitution T790M qui est la plus fréquente sur l'exon 20 et la substitution T854A sur l'exon 21 (*Ohashi et al., 2013*). Ce n'est pas le cas du GBM car aucune mutation secondaire associée à un mécanisme de résistance acquise aux inhibiteurs de tyrosine kinase n'a été détectée (*Furnari et al., 2015*). Nous allons voir que d'autres pistes permettant d'expliquer les mécanismes de résistance aux anti-EGFR dans les gliomes sont étudiées.

#### 3.3.1. Pénétration insuffisante des drogues dans la masse tumorale

La capacité des drogues à pénétrer la barrière hémato-encéphalique (BHE) est un sujet controversé. Les molécules hydrophiles, les substances de masse moléculaire supérieure à 400-500 daltons (la masse moléculaire d'une immunoglobuline est d'environ 150kDa) ou les ligands des transporteurs d'efflux, ne peuvent passer la BHE et pénétrer le parenchyme cérébral (**Figure 10**) (*Johnson and Sampson, 2010*). Néanmoins, certaines études s'accordent à dire que la BHE est fréquemment lésée dans les gliomes de haut grade, permettant alors le passage de ces grosses molécules. Une perte de la perméabilité sélective de la BHE est également décrite chez les patients épileptiques (*Marchi et al. 2015*). Que l'on soit convaincu par l'une ou l'autre hypothèse, il est de toute façon probable que les cellules qui envahissent le parenchyme cérébral sain à distance de la masse tumorale soient protégées par une BHE intacte.

Le GBM est une tumeur hautement vascularisée mais cette vascularisation est discontinue, perméable et le nombre de péricytes protégeant les vaisseaux est diminué. Cela entraîne une diminution du flux sanguin, des œdèmes et un gradient de pression sanguine qui peut avoir pour effet un rétrécissement des capillaires à certains endroits (*Krakstad and Chekenya, 2010*). Ces différences régionales dans le microenvironnement tumoral incluant l'architecture tissulaire et la proximité de la tumeur avec des vaisseaux sanguins vont ainsi générer des gradients de nutriments et d'oxygène au sein de la tumeur. Il se crée des pressions de sélection différentes dans la masse tumorale. Les caractéristiques de cette vascularisation tortueuse sont autant d'obstacles à une bonne pénétration des drogues au cœur de la tumeur.



**Figure 10: Les mécanismes de résistance aux thérapies anti-EGFR identifiés dans le GBM.** L'efficacité des drogues en clinique est limitée par une faible pénétrabilité au sein de la masse tumorale pouvant être expliquée par une difficulté des drogues à passer la barrière hématoencéphalique (cellules endothéliales/péricytes/pieds astrocytaires). D'autre part, l'expression génique est très variable dans les GBM. Les mutations de la phosphatase PTEN sont fréquemment décrites. De plus, l'inactivation pharmacologique de l'EGFR entraîne des mécanismes d'activation compensatoire d'autres récepteurs tyrosines kinases.

Les données sur la pénétration des TKI dans le système nerveux sont rares. Ces études sont cependant indispensables car la plupart des TKI atteignent la taille limite des agents pouvant passer la BHE. Une équipe a étudié la pharmacocinétique de l'erlotinib afin de déterminer la pénétration de cette drogue dans le tissu tumoral.

A partir de 4 biopsies de patients qui avaient été traités à l'erlotinib la semaine précédant la résection chirurgicale de leur GBM, les auteurs ont montré que la concentration en erlotinib dans le tissu tumoral représentait 6 à 8% de la concentration plasmatique suggérant une faible pénétration de la drogue dans la tumeur (*Lassman et al., 2005*). La délivrance incomplète des drogues jusqu'à leur cible pourrait expliquer en partie, les déconvenues que suscitent les TKI dans le traitement du GBM.

De nouvelles méthodes ou nouveaux agents qui augmenteraient la pénétration de la chimiothérapie ou des thérapies ciblées dans les tumeurs cérébrales, pourraient avoir un énorme potentiel thérapeutique. Une équipe a récemment évalué les effets d'un analogue du tamoxifène, le tesmilifène, sur la perméabilité de la BHE dans des xénogreffes de rats. Les auteurs ont montré que le tesmilifène augmentait la diffusion de traceur fluorescent dans la tumeur et inhibait également l'activité de pompes d'efflux multi drogues résistantes (*Walter et al., 2015*). Ces deux effets combinés pourraient contribuer à augmenter la délivrance d'agents thérapeutiques dans les GBM.

### 3.3.2. L'hétérogénéité génétique intratumorale

Des différences régionales dans l'expression des gènes, des mutations génétiques et des altérations chromosomiques variables décrivent les GBM.

#### - Les mutations de PTEN

La délétion ou mutation du gène suppresseur de tumeur PTEN est fréquemment observée dans les gliomes de haut grade (**Figure 10**) (*Appin and Brat, 2015*). Son rôle est controversé dans la littérature puisqu'elle est décrite comme facteur de sensibilité et de résistance aux thérapies anti-EGFR dans les gliomes.

Dans 10 modèles de xénogreffes de gliomes, une équipe a évalué l'effet synergique anti tumoral de l'association du gefitinib et de la radiothérapie. Les mutations de type amplification de l'EGFR et délétion de PTEN retrouvées dans certains de ces modèles, ne permettaient pas de prédire l'efficacité thérapeutique du gefitinib (*Pinel et al., 2013*).

De même, l'étude immunohistochimique des biopsies de 35 patients atteints de gliomes a mis en évidence l'expression de PTEN dans 21% des gliomes testés, tous étant des gliomes de haut grade et tous porteurs d'une mutation/amplification de l'EGFR (Lv et al., 2012). Dans cette sous-population de patients traités avec le cetuximab, la présence de PTEN n'était pas corrélée à la survie des patients.

Mais dans d'autres études cliniques, la phosphorylation de PTEN sur le résidu tyrosine Y240 est associée avec une survie globale plus courte des patients atteints de GBM et à une résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase (Fenton et al., 2012). Nous pouvons imaginer que les cellules exprimant cette mutation maintiennent la voie de signalisation PI3K nécessaire à la croissance tumorale car PTEN est un régulateur négatif de cette voie. L'étude de 49 coupes de patients atteints de GBM et traités avec des inhibiteurs de tyrosine kinase (gefitinib et erlotinib) a démontré que les patients répondeurs exprimaient le mutant EGFRvIII et PTEN. Dans ce cas, l'expression de PTEN est un facteur de sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase chez ces patients (Mellinghoff et al., 2005).

### - L'activation compensatoire de multiples RTK

Certaines tumeurs ne sont pas dépendantes de l'inhibition de fonction de l'EGFR car les cellules tumorales sont capables de mettre en place des voies de signalisation alternatives émanant d'autres récepteurs tyrosine kinase (**Figure 10**). Il a été montré que de multiples récepteurs tyrosine kinase tels qu'EGFR, MET, PDGFR, HER-2, HER-3 ou VEGFR sont activés simultanément dans des lignées cellulaires de gliomes (également confirmé dans des coupes de gliomes).

L'inhibition conjointe de plusieurs récepteurs tyrosine kinase est nécessaire pour annuler l'activation des voies PI3K/Akt et MAPK et réduire la survie cellulaire (Stommel et al., 2007). Les cellules tumorales contiennent un certain nombre d'oncogènes activés qui permettent une rapide compensation après l'inactivation de l'oncogène dominant. Ainsi dans les cellules de GBM, l'inactivation de l'EGFRvIII à l'aide d'un anticorps monoclonal conduit à l'activation de différents RTK tels que C-met, PDGFR ou VEGFR. *In vivo*, les auteurs ont montré l'efficacité d'un co-traitement ciblant à la fois l'EGFRvIII et C-met pour prévenir l'échappement thérapeutique et réduire efficacement la croissance tumorale (Pillay et al., 2009).

Des xénogreffes sous-cutanées de cellules de GBM dans des souris SCID ont montré que l'erlotinib réduisait activement la signalisation de l'EGFR. Cependant, la croissance cellulaire était maintenue et une augmentation considérable de l'activité de PDGFR $\beta$  était observée. Cette corrélation inverse entre l'expression de l'EGFR et PDGFR $\beta$  a également été confirmée dans des échantillons de patients atteints d'un GBM et non répondeurs aux thérapies ciblées (*Akhavan et al., 2013*). Une sous-population de cellules de GBM, les cellules souches de GBM, montrent une résistance accrue aux thérapies anti-EGFR et continuent de proliférer malgré une privation en EGF ou une inhibition de l'EGFR par le cetuximab. Cette résistance s'expliquerait par l'activation compensatoire de ErbB-2 et ErbB-3 (*Clark et al., 2012*). On pourrait alors imaginer que l'utilisation d'anti-EGFR non sélectifs de l'EGFR et permettant le blocage de plusieurs membres de la famille ErbB (tel que l'afatinib) serait nécessaire pour éradiquer avec succès les CSG.

### - L'ADN « double-minute » de l'EGFR

Des auteurs ont récemment identifié un nouveau mécanisme de résistance aux thérapies ciblant l'EGFR chez les patients atteints de GBM : la régulation de l'ADN extrachromosomique de l'EGFR VIII (*Nathanson et al., 2014*). Dans cet article, il est décrit que les cellules exprimant fortement l'EGFRVIII sont plus sensibles à l'effet pro-apoptotique de l'erlotinib que les cellules exprimant peu le mutant. L'exposition à l'erlotinib élimine l'EGFRVIII de l'ADN extrachromosomique (petits fragments d'ADN circulaires appelés ADN « double-minute ») et cette diminution de l'expression du mutant désensibilise les cellules tumorales à l'erlotinib. En revanche, à l'arrêt du traitement, il y a ré-émergence de l'EGFR mutant extrachromosomique suggérant que les cellules de GBM modulent le niveau d'expression du mutant EGFR générant des phénomènes de résistances aux thérapies ciblées.

### 3.3.3. L'EGFR nucléaire

La signalisation de l'EGFR membranaire a été largement étudiée mais de nouvelles fonctions de l'EGFR dans le noyau des cellules sont maintenant décrites incluant la prolifération cellulaire et la réparation de l'ADN (*Brand et al., 2013*). La translocation nucléaire de l'EGFR est également un facteur de résistance aux drogues ciblant l'EGFR reconnu dans de nombreux cancers.

Une étude pré-clinique sur des carcinomes pulmonaires a mis en évidence le rôle de la localisation nucléaire de l'EGFR dans la résistance au cetuximab (Li et al., 2009). La translocation nucléaire de l'EGFR initiée par les kinases de la famille Src, confère une résistance au cetuximab *in vitro* et *in vivo*. En effet, le cetuximab peut éliminer les signaux de prolifération transmis par l'EGFR membranaire mais il ne peut pas cibler l'EGFR nucléaire qui poursuit alors son activité signalétique. Dans le cas de la résistance au gefitinib, l'EGFR nucléaire agit comme un co-facteur de transcription de la protéine BCRP (breast cancer resistant protein), un transporteur membranaire ATP-dépendant retrouvé à la surface des cellules de carcinome mammaire. L'activation de ces transporteurs conduit à une augmentation de l'efflux du gefitinib en dehors de la tumeur et diminue ainsi la concentration intracellulaire de gefitinib réduisant son efficacité (Huang et al., 2011b).

Nous l'avons vu précédemment, STAT3 interagit physiquement avec l'EGFR à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Les GBM co-expriment l'EGFR (et/ou son mutant EGFRvIII) et STAT3 activée ce qui leur confèrent un comportement plus agressif (Birner et al., 2010; Lo et al., 2008). Cette connexion fonctionnelle entre EGFR et STAT3 est renforcée par une récente étude mettant en évidence le rôle d'IGFBP2 (Insulin-like growth factor binding protein 2) dans l'activation de la signalisation de l'EGFR associée à STAT3 (Chua et al., 2015). La protéine oncogénique IGFBP2 pourrait donc être une cible thérapeutique potentielle dans les gliomes de haut grade. Les interactions dans plusieurs compartiments cellulaires entre l'EGFR et STAT3, émergent comme un mécanisme potentiel soulignant la résistance des GBM aux thérapies anti-EGFR.

---

### Troisième partie : Les intégrines

---

#### 1. Les intégrines, récepteurs de l'adhérence cellulaire

##### 1.1. Généralités

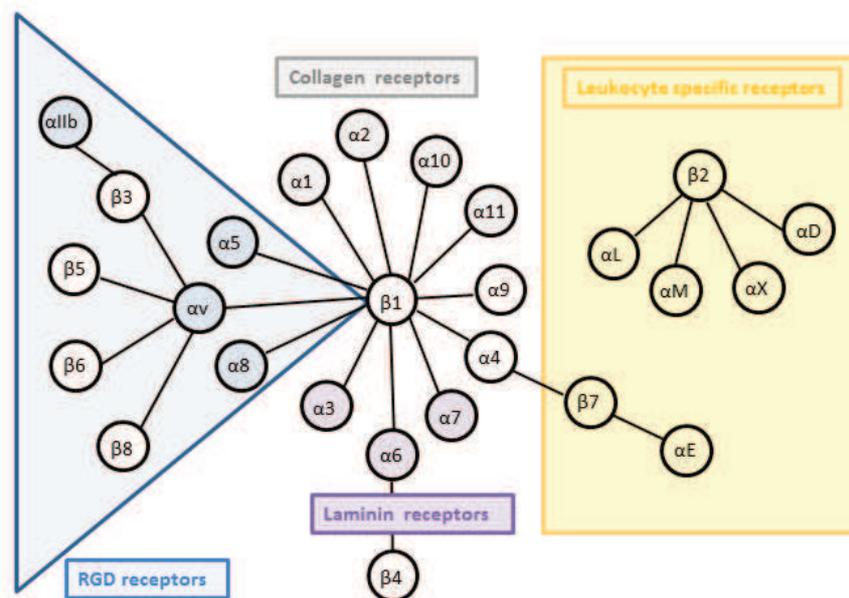
Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires jouant à la fois un rôle structural dans l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire (MEC) et un rôle fonctionnel grâce à leur couplage à des protéines cytoplasmiques. Les intégrines ne possèdent pas d'activité signalétique intrinsèque mais elles propagent une signalisation bidirectionnelle à travers la membrane plasmique: de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule comme toute voie de signalisation, on parlera de signalisation « outside-in », mais aussi de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur, on parlera de signalisation « inside-out ». Les intégrines sont activées par des messages intracellulaires ce qui a pour conséquence de moduler l'attachement cellulaire à la matrice, et cet attachement est à l'origine de la modulation de nombreux processus cellulaires (croissance , survie, différenciation, migration) et physiopathologiques (développement, immunité, cancer)(Hynes, 2002).

Les intégrines sont des hétérodimères composés de l'association non covalente d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . Chez les vertébrés on dénombre 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  qui se rassemblent en 24 hétérodimères différents (Takada et al., 2007). Il est possible de classer les intégrines selon la composition de ces différentes sous-unités et la spécificité de liaison de l'hétérodimère à son ligand (**Figure 11**):

- Un groupe reconnaît la séquence de trois acides aminés RGD (arginine, glycine, acide aspartique) que l'on retrouve dans des molécules comme la fibronectine ou la vitronectine par exemple (Banères et al., 1998). Parmi les 24 intégrines hétérodimériques connues, 8 intégrines reconnaissent la séquence RGD. L'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  se lie avec une plus haute affinité à des peptides contenant la séquence RGD suivie d'un résidu glycine et d'un résidu tryptophane (peptide cyclique RGDGW) mais avec une plus faible affinité aux autres peptides RGD (Koivunen et al., 1995).

La liaison d'un anticorps anti- $\alpha 5$  spécifique (Mab16) s'effectue dans une région de la sous-unité  $\alpha 5$  contenant les résidus sérine et tryptophane (Ser156-Trp157). Une mutation du tryptophane en alanine a montré que ce résidu interagissait avec le tryptophane de la séquence RGDGW et que cette interaction déterminait la spécificité de liaison de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  pour des peptides comme la fibronectine contenant la séquence RGDGW (Humphries et al., 2000).

- Un autre groupe est impliqué dans la liaison aux molécules de laminine de la membrane basale
- Le groupe des récepteurs au collagène reconnaissent à la fois des protéines de la MEC et des molécules impliquées dans l'adhérence des leucocytes et monocytes à l'endothélium vasculaire comme VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1).
- Un groupe contient les intégrines  $\beta 2$  et  $\beta 7$  qui sont strictement exprimées dans les leucocytes



**Figure 11: La grande famille des intégrines et leurs ligands (Figure adaptée de Hynes, 2002).** Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques  $\alpha\beta$  impliqués dans de nombreux processus biologiques indispensables. Les 24 combinaisons possibles sont classés en 4 sous-parties : les intégrines récepteurs de la laminine (en violet), les intégrines récepteurs du collagène (en gris), les intégrines reconnaissant des motifs RGD (en bleu) et les intégrines récepteurs spécifiques des leucocytes (en jaune). Quelques sous-unités  $\alpha$  sont restreintes aux cordés comme c'est le cas d' $\alpha 4$ ,  $\alpha 9$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 8$ .



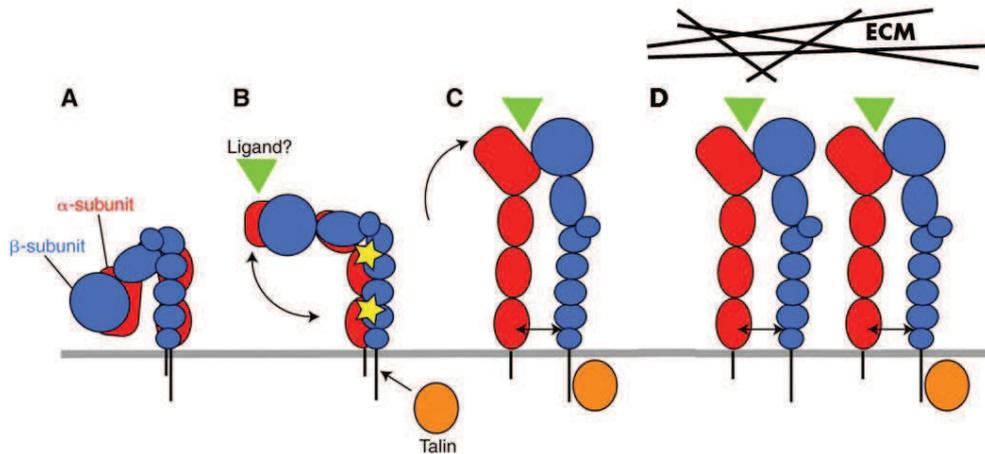
Dans le cas où les sous-unités  $\alpha$  ne possèdent pas le domaine  $\alpha I$ , nous savons maintenant que c'est le domaine  $\beta I$  qui lie directement le ligand (Zhang and Chen, 2012). Le domaine  $\beta I$  contient trois sites de liaison pour les ions métalliques: au centre le site MIDAS flanqué de deux autres sites : un site SyMBS (synergistic metal ion binding site) et un site ADMIDAS (adjacent metal ion-dependent adhesion site) liant préférentiellement des ions calcium. Il a été démontré que des mutations conduisant à retirer le site MIDAS empêchaient totalement la liaison du ligand démontrant le rôle essentiel de ce motif dans la création du couple ligand/récepteur (Chen *et al.*, 2003). Le  $Ca^{2+}$  exerce une fonction de régulation bivalente à travers les motifs ADMIDAS et SyMBS qui ont respectivement des rôles de régulateurs négatifs et positifs de liaison du ligand à l'intégrine (Vorup-Jensen *et al.*, 2007). La « jambe » des sous-unités  $\beta$  est composée d'un domaine PSI (plexine semaphorine integrin), d'un domaine hybride et de 4 domaines EGF (epidermal growth factor like domain). Un dernier domaine qui se situe à la limite de la membrane est appelé « queue  $\beta$  » (**Figure 12**) (Barczyk *et al.*, 2009).

### 1.2. Les mécanismes d'activation des intégrines

L'activité des intégrines et donc leur fonction est modulée par différentes voies incluant les ligands, les ions divalents, les anticorps monoclonaux ou les interactions avec des protéines intracellulaires. Une régulation précise de l'activation des intégrines est particulièrement importante dans le contrôle de l'agrégation de cellules plaquettaires exprimant l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  à leur surface. Une activation rapide de cette intégrine par la fixation de son ligand le fibrinogène est nécessaire pour déclencher l'hémostase et la cicatrisation d'une blessure. Mais une activation inappropriée de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  peut causer un thrombus obturant un vaisseau sanguin (Shattil *et al.*, 1998).

L'activité des intégrines est basée sur un équilibre entre 3 états conformationnels (**Figure 13**): une forme repliée inactive dans laquelle elles ont une faible affinité pour leur ligand, une forme partiellement dépliée et une forme active dépliée et liée au ligand dans laquelle elles sont capables d'initier une activité signalétique (Takagi and Springer, 2002; Xiao *et al.*, 2004).

Certains travaux suggèrent que les intégrines peuvent aussi se lier à leur ligand dans une conformation repliée ou partiellement repliée (Arnaout et al., 2007). L'analyse cristallographique du domaine extracellulaire de l'intégrine  $\alpha\beta3$  montre qu'elle est capable de lier un peptide contenant une séquence RGD même dans une conformation repliée (Xiong et al., 2002).



**Figure 13: Activation des intégrines (Figure adaptée de Askari et al., 2009).** Les trois états conformationnels majeurs des intégrines : **A-** Conformation repliée inactive, **B-** Conformation intermédiaire active, **C-** Conformation ouverte active liée au ligand. Les protéines intracellulaires dont la Taline se lient aux intégrines facilitant ainsi l'acquisition de leur conformation active et la liaison de leur ligand extracellulaire via une signalisation « inside-out ». **D-** Regroupement des intégrines pour mettre en place une signalisation « outside-in ».

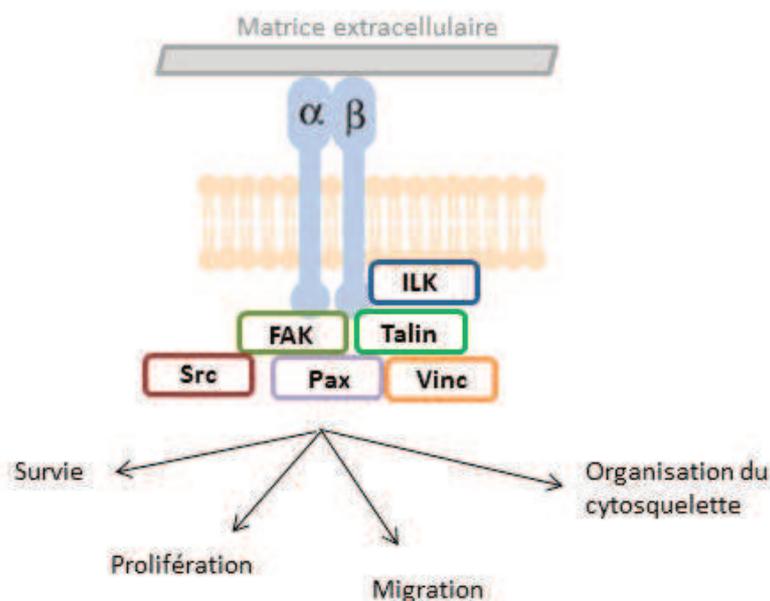
La liaison de plusieurs anticorps aux intégrines est stabilisée ou induite par les ligands. Ces épitopes ainsi reconnus sont appelés LIBS (Ligand Induced Binding Sites) (Bazzoni et al., 1995). Nous utilisons dans nos travaux un LIBS spécifique de la sous-unité  $\alpha5$  : le SNAKA-51 (Clark et al., 2005).

Dans la signalisation dite « inside-out », l'activation de l'intégrine est modulée par divers signaux intracellulaires menant au recrutement d'un grand nombre de protéines activatrices (telles que la taline ou la kindline) ou inhibitrices (telle que la filamine) aux régions intracytoplasmiques des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  (Kiema et al., 2006; Ye et al., 2011). La liaison de la taline au domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  de l'intégrine est une étape clé dans les signaux qui régulent l'activation des intégrines (**Figure 13**) (Tadokoro et al., 2003).

L'éloignement des deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  dans les régions cytoplasmique et transmembranaires conduit à des changements conformationnels où la « tête » de l'intégrine devient fixe augmentant ainsi son affinité de liaison au ligand (Kim et al., 2003). Cette signalisation permet de moduler l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire.

### 1.3. Structure d'une plaque d'adhérence

Lorsque les intégrines actives s'assemblent en « cluster », elles initient la signalisation « outside-in » (Figure 13). La liaison du ligand à son récepteur stabilise une conformation dépliée de l'intégrine ce qui maintient la séparation des domaines intracytoplasmiques des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (Kim et al., 2003).



**Figure 14: Architecture multi protéique d'un point focal d'adhérence cellulaire (Figure adaptée de Hynes et al., 2002).** La Taline se lie au domaine intracytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  et à l'actine fibrillaire faisant ainsi le lien entre le cytosquelette et la MEC. Les kinases liées aux intégrines (ILK-Integrin Linked Kinase) interagissent avec la queue  $\beta$  des intégrines par l'intermédiaire de leur domaine kinase C-terminal. Les ILK sont impliquées dans le renouvellement des adhésions cellule-matrice. La paxilline (Pax) est une protéine essentielle dans l'architecture des complexes de signalisation guidant les phénomènes d'adhérence cellulaire. La vinculine (Vinc) ne se lie pas directement à la sous-unité  $\beta$  des intégrines mais elle interagit avec la paxilline et la taline. La tyrosine kinase Src active la protéine FAK par la phosphorylation de 4 résidus tyrosine (Y576, Y577, Y861, Y925). Le complexe FAK-Src lié à la queue cytoplasmique des sous-unités  $\beta$  régule la prolifération, la survie et la migration cellulaire.

En plus de leur rôle structural de connexion entre la MEC et le cytosquelette d'actine, les intégrines peuvent initier des cascades signalétiques intracellulaires favorisant la prolifération, la survie et la migration cellulaire dans des contextes physiologique ou tumorigénique. Cette signalisation nécessite une régulation dynamique d'assemblage et de désassemblage de complexes multi protéiques qui se forment autour de la queue cytoplasmique de l'intégrine dans des sites particuliers appelés points focaux d'adhérence (**Figure 14**). Un des principaux modulateurs de la signalisation des intégrines, la kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) se lie aux intégrines via une interaction entre son domaine C-terminal et des protéines associées aux intégrines telles que la taline ou la paxilline (*Hanks et al., 1992; Mitra and Schlaepfer, 2006*).

### 1.4. Le trafic intracellulaire des intégrines

Les intégrines sont en permanence internalisées ou recyclées à la membrane plasmique afin de maintenir la polarité cellulaire, réguler la transduction du signal et faciliter la régulation dynamique de l'adhésion et de la migration cellulaire (*Caswell et al., 2009*).

#### 1.3.1 Les différents mécanismes d'internalisation des intégrines

Les intégrines peuvent emprunter différentes routes d'internalisation : d'une part, la micro pinocytose incluant l'endocytose clathrine-dépendante et l'endocytose cavéoline-dépendante qui assimile des éléments d'une taille limite d'environ 100nm, et d'autre part, la macro pinocytose pouvant retenir un large volume d'environ 1 $\mu$ m (*Swanson, 2008*).

#### - L'endocytose clathrine-dépendante (**Figure 15**):

A part quelques rares exemples d'interaction directe des intégrines avec les triskélions de clathrine comme le récepteur de la vitronectine  $\alpha\beta 5$  (*Deyne et al., 1998*), le recrutement des intégrines dans des invaginations recouvertes de clathrine requiert un grand nombre de protéines adaptatrices spécifiques. La protéine HAX1 se lie au domaine cytoplasmique de l'intégrine  $\alpha\beta 6$  et favorise la migration cellulaire via un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendante (*Ramsay et al., 2007*).

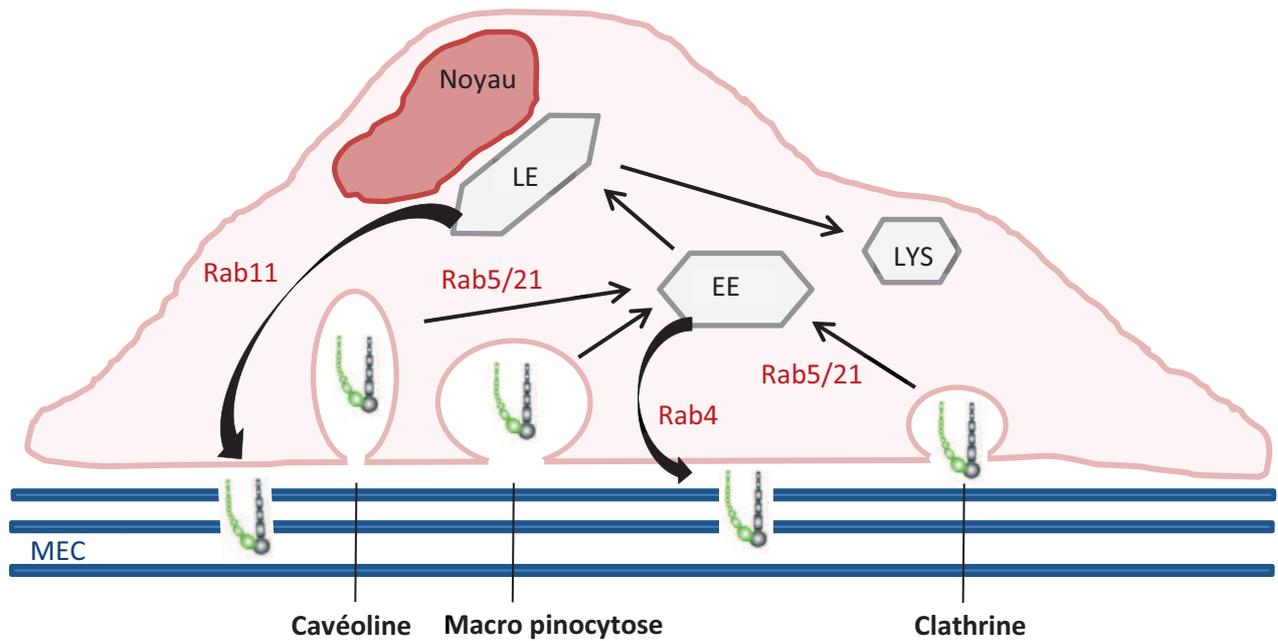
Des approches protéomiques permettant d'identifier les intégrines présentes à la surface de la cellule ont mis en évidence l'implication de la protéine adaptatrice DAB2 dans l'internalisation de certaines intégrines  $\beta 1$  ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  et  $\alpha 3\beta 1$ ) (Teckchandani et al., 2009). On peut également citer le rôle de la glycoprotéine transmembranaire NRP-1 (neuropilin-1) dans l'internalisation de la forme active de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans les cellules endothéliales. Grâce à la microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy), les auteurs ont montré que cette internalisation dépendante de NRP-1 survenait dans les adhésions fibrillaires, structures riches en fibronectine et son récepteur l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Valdembri et al., 2009). Ils ont ainsi confirmé l'importance des protéines de la MEC dans le trafic intracellulaire des intégrines.

### - L'endocytose cavéoline-dépendante (Figure 15):

Il est intéressant de souligner le cas particulier de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , qui peut à la fois être internalisée via des mécanismes clathrine-dépendants comme on vient de le voir, mais cette intégrine peut également mobiliser la cavéoline lors de son internalisation. Dans un modèle de culture cellulaire de myofibroblastes KO pour la fibronectine soumis à des cycles de supplémentation/privation en fibronectine, les auteurs ont démontré que la cavéoline-1 régulait l'endocytose de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et le renouvellement matriciel de la fibronectine (Shi and Sottile, 2008). Ils mettent également en évidence la possibilité d'endocytose de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  en absence de son ligand.

### - Le phénomène de macro pinocytose (Figure 15):

La macro pinocytose désigne la formation de grandes vésicules d'endocytose de taille et de forme irrégulières, produites par évagination de la membrane plasmique sur la face dorsale de la cellule (Swanson and Watts, 1995). Ces invaginations circulaires particulières recrutent, internalisent et recyclent les intégrines (De Franceschi et al., 2015).



**Figure 15: Voies canoniques d'endocytose des intégrines.** Les intégrines membranaires peuvent être internalisées dans de petites vésicules de cavéoline ou de clathrine ou dans de grandes vésicules de macro pinocytose. Elles rejoignent les endosomes précoces (early endosome EE) puis sont adressées dans des compartiments périnucléaires : les endosomes tardifs (late endosome LE) et enfin dirigées vers une dégradation lysosomale (LYS). L'endocytose des récepteurs fait intervenir les protéines Rab5 et Rab21 et le recyclage à la membrane fait intervenir les protéines Rab 4 et Rab11.

Il a par exemple été démontré que suite à une stimulation par le facteur de croissance PDGF, l'internalisation de l'intégrine  $\beta 3$  était permise par le recrutement de macropinosomes. Un suivi par vidéo microscopie de l'intégrine  $\beta 3$  couplée à la GFP (green fluorescent protein) a permis de montrer que l'intégrine  $\beta 3$ , internalisée à la face dorsale de la cellule par macro pinocytose, était recyclée à travers des compartiments endosomaux pour réapparaître au niveau de nouvelles adhésions focales sur la face ventrale de la cellule (Gu et al., 2011).

### 1.3.2 Le devenir des intégrines internalisées

Ces cycles d'endo-exocytose facilitent la détection et l'élimination des intégrines non fonctionnelles à la membrane plasmique. Des auteurs ont mis en évidence le rôle de protéines chaperones comme la calnexine qui détectent les intégrines mal repliées ou endommagées (Okazaki et al., 2000). Elles seront dans ce cas transportées dans des endosomes tardifs puis des lysosomes pour y être dégradées.

L'acidité qui règne dans ces endosomes tardifs permet de « nettoyer » l'intégrine des fragments restants de ligand favorisant ainsi le recyclage membranaire des intégrines compétentes pour lier de nouveaux ligands.

Le recyclage des intégrines humaines a été largement étudié comme modulant l'agressivité de nombreux cancers (prostate, poumon, sein, ovaire, colon etc...) mais cela n'a jamais été examiné dans les tumeurs cérébrales (*Dozynkiewicz et al., 2012*).

Le trafic intracellulaire des intégrines implique des compartiments spécifiques dans la cellule, contenant de petites GTPases de la famille des protéines Rab. Les protéines Rab basculent entre un état actif lié à une molécule de GTP (guanosine triphosphate) et un état inactif couplé au GDP (guanosine diphosphate). Il existe une soixantaine de protéines Rab chez l'homme, chacune pouvant interagir avec plusieurs partenaires dont les facteurs d'échanges nucléotidiques GEF (aidant le passage de la forme inactive à la forme active) et les effecteurs GAP qui vont déclencher les cascades de signalisation. Les intégrines qui intégreront une boucle de recyclage courte sont triées dans des sous-domaines des endosomes précoces et retournent rapidement à la membrane plasmique sous le contrôle de la GTPase Rab4. C'est le cas par exemple de l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  qui s'associe à la kinase PKD1 (phosphoinositide dependent kinase-1) pour former un complexe de recyclage rapide à la membrane. C'est dans ces endosomes précoces riches en Rab5 et Rab21 que se joue l'avenir des intégrines endocytées (*Pellinen et al., 2006*). Elles peuvent également transiter par une étape intermédiaire dans un compartiment de recyclage périnucléaire et finalement retourner à la membrane plasmique via un mécanisme dépendant des Rab11 (*Eva et al., 2010*) et Rab25 (*Caswell and Norman, 2006*), on parlera de boucle de recyclage longue. Les hétérodimères  $\beta 1$  (et particulièrement l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ ) s'accumulent dans ces compartiments Rab11 avant leur retour à la membrane plasmique (*Muller et al., 2009*).

### **2. Les intégrines, facteurs d'agressivité dans les tumeurs gliales**

Ces dernières années, les intégrines sont devenues des cibles thérapeutiques prometteuses dans des domaines aussi variés que les cancers, l'ostéoporose, l'asthme, les maladies thrombotiques, l'arthrose, le psoriasis... (*Goodman and Picard, 2012*).

Ces récepteurs jouent un rôle crucial dans la transformation maligne des cellules tumorales et la résistance aux thérapies. En même temps que la surexpression de protéines matricielles, une expression élevée de leur récepteur respectif a été détecté dans des échantillons de GBM suggérant un rôle important des intégrines lors de la progression tumorale. Les intégrines  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$  et  $\alpha v\beta 3$  sont fortement exprimées dans les biopsies de GBM en comparaison au tissu sain (Brown et al., 2008; Gingras et al., 1995; Riemenschneider et al., 2005).

### 2.1. Le rôle des intégrines dans la migration et l'invasion tumorale

Lors de l'invasion locale, une cellule cancéreuse utilise des mécanismes de migration similaires à ceux d'une cellule non-néoplasique lors des processus physiologiques. La cellule doit acquérir la capacité de s'étaler dans le tissu et de dégrader puis envahir la MEC. Cela nécessite une conversion du phénotype cellulaire appelée transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) impliquant une perte des contacts cellule-cellule, une réorganisation du cytosquelette et l'acquisition de propriétés migratoires (Lamouille et al., 2014).

L'utilisation d'anticorps ou de peptides inhibiteurs des intégrines diminue la capacité invasive des cellules de GBM (Cordes et al., 2003; Ray et al., 2014). La migration des cellules de gliomes *in vitro* et *in vivo* est augmentée par la radiothérapie qui conduit à une augmentation de l'expression des récepteurs de la vitronectine. Ainsi, l'inhibition des intégrines  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha v\beta 5$  avec des anticorps réduit la migration cellulaire et sensibilise les cellules à la radiothérapie (Amir Abdollahi et al., 2005; Rieken et al., 2011). Il est également suggéré que l'intégrine  $\alpha 3$  favorise la migration cellulaire. Elle est localisée dans les cellules de gliomes et particulièrement dans les cellules situées au front de migration et les cellules en périphérie de la vascularisation tumorale. L'abolition de l'expression de l'intégrine  $\alpha 3$  dans différentes lignées de gliomes réduit la migration et l'invasion tumorale (Nakada et al., 2013).

Les intégrines influencent le comportement invasif des cellules de gliomes en contrôlant la localisation et l'activité de protéases dégradant la matrice, les métallo protéinases de la matrice (MMPs) (Alves et al., 2011).

Il a été montré par vidéomicroscopie que l'intégrine  $\alpha\beta3$  se lie et active la MMP-2 et que cette interaction est cruciale pour l'invasion des cellules tumorales (Rupp et al., 2008). Dans les astrocytes, l'intégrine  $\beta1$  co-localise avec les MMP-2 dans les contacts focaux des lamellipodes suggérant un rôle clé de ces protéases lors de l'invasion cellulaire (Ogier et al., 2006). Des études de microscopie confocale ont montré une forte co-localisation de l'intégrine  $\alpha5\beta1$  et MMP-2. Le KO de MMP-2 par SiRNA diminue l'expression d'  $\alpha5\beta1$  dans des xénogreffes de gliomes et réduit le volume de la tumeur (Kesanakurti et al., 2013a).

### 2.2. Les récepteurs de la fibronectine, comme cibles thérapeutiques prometteuses

#### 2.2.1. La fibronectine

La matrice extracellulaire (MEC) occupe de nombreuses fonctions dans notre cerveau. On peut noter qu'elle module la migration des cellules gliales et des précurseurs neuronaux, la formation de synapse et la prolifération cellulaire. Dans des processus de réparations physiologiques, la synthèse des composants de la MEC est augmentée pour faciliter le remodelage tissulaire (Bosman and Stamenkovic, 2003). Nous nous concentrerons ici sur la fibronectine.

Une analyse de l'expression des gènes dans les gliomes a révélé une augmentation de l'expression des transcrits de la fibronectine dans le GBM comparé au tissu cérébral sain (Lal et al., 1999). Une confirmation plus récente a identifié la fibronectine comme un des cinq gènes fortement exprimés dans les GBM en comparaison à des astrocytomes non invasifs (Colin et al., 2005). Il a été montré que l'extra-domaine B de la fibronectine s'accumule autour des néo-vaisseaux durant les processus d'angiogenèse mais pas autour des vaisseaux matures. De plus, cette implication de la fibronectine dans l'angiogenèse tumorale semble être corrélée au grade tumoral puisque le pourcentage de néo-vaisseaux positifs à la fibronectine est plus important dans les astrocytomes de haut grade que dans les astrocytomes de bas grade (Castellani et al., 2002). Les cellules endothéliales sont, comme on vient de le voir, responsables de la production de fibronectine. Cependant, une équipe a prouvé récemment que la fibronectine pouvait également être synthétisée par les cellules tumorales augmentant ainsi la malignité *in vitro* et *in vivo* des GBM (Serres et al., 2014).

Le principal récepteur de la fibronectine est l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  mais dans une moindre mesure la fibronectine peut également interagir avec l'intégrine  $\alpha v\beta 3$  (principal récepteur de la vitronectine) (Danen et al., 2002; Ray et al., 2014).

### 2.2.2. L'intégrine $\alpha v\beta 3$

L'angiogénèse est un phénomène indispensable à la croissance tumorale, ce mécanisme est induit par la synthèse de facteurs de croissance angiogéniques afin de développer de nouveaux vaisseaux. Les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha v\beta 3$ , particulièrement impliquées dans l'angiogénèse tumorale, sont devenues d'excellents candidats pour les thérapies anti-cancéreuses (Guo and Giancotti, 2004). L'intégrine  $\alpha v\beta 3$  lie plusieurs protéines contenant le motif RGD incluant la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine et l'ostéopontine (Plow et al., 2000).

Le cilengitide est un penta peptide synthétique cyclique contenant une séquence RGD qui bloque l'activation des intégrines  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha v\beta 5$  (Reardon et al., 2008). De nombreux essais cliniques (phases I à III) utilisant le cilengitide en association avec la chimio/radiothérapie ont été menés pour les GBM nouvellement diagnostiqués (Eisele et al., 2014; Gilbert et al., 2012; Nabors et al., 2012; Stupp et al., 2010). Les auteurs ont validé la délivrance de l'agent au sein de la tumeur, l'efficacité du cilengitide seul restant tout de même modeste. Une augmentation de la survie était toutefois observée chez les patients dont le promoteur de la MGMT était méthylé. Ces conclusions ont conduit à la mise en place d'un essai clinique multicentrique sur une grande cohorte de 926 patients atteints de GBM (provenant de 25 pays) et inclus dans l'étude selon leur statut MGMT méthylé. Les résultats de cette étude furent décevants puisque la médiane de survie globale était exactement la même (23,6 mois) dans le groupe de patients ayant reçu le cilengitide en combinaison à la chimiothérapie par temozolomide et dans le groupe contrôle (patients ayant reçu la chimiothérapie seule) (Stupp et al., 2014).

### 2.2.3. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$

L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est impliquée dans le potentiel oncogénique de nombreuses tumeurs solides incluant les gliomes. Son expression augmente les propriétés tumorigéniques *in vitro* et *in vivo* des cancers mammaires (Jia et al., 2004), ovariens (Mitra et al., 2011; Sawada et al., 2008) et dans le mélanome (McKenzie et al., 2010; Qian et al., 2005). Ces conclusions sont en adéquation avec des observations cliniques puisqu'une forte expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de carcinomes colique (Toquet et al., 2012) et pulmonaire (Adachi et al., 2000; Dingemans et al., 2010).

L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  émerge ces dernières années comme une cible thérapeutique prometteuse dans les gliomes. L'analyse immunohistochimique de 30 GBM a permis de localiser les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\beta 8$  dans les zones péri vasculaires (Riemenschneider et al., 2005). Notre équipe (Cosset et al., 2012; Janouskova et al., 2012) et d'autres (Holmes et al., 2012) ont montré qu'un haut niveau d'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  chez des patients atteints de gliome était corrélé au grade tumoral et à un plus mauvais pronostic. Le traitement de lignées cellulaires de GBM avec des antagonistes spécifiques de l'intégrine, a démontré son implication dans la prolifération, la survie clonogénique (Maglott et al., 2006), l'apoptose (Martinkova et al., 2010), la migration cellulaire (Ray et al., 2014) et la résistance à la chimiothérapie via l'expression de la protéine P53 (Janouskova et al., 2012).

### 2.2.4. Développement des antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

La recherche d'antagonistes spécifiques de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  s'est accélérée ces dernières années. Trois classes d'antagonistes sont décrits jusqu'à présent : les anticorps inhibiteurs, les molécules mimant la séquence RGD et les petits peptides non RGD-mimétiques.

- Les anticorps ciblant l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  :

Le Volociximab (PDL BioPharma) est un anticorps chimérique souris-humain dérivé de l'anticorps inhibiteur de fonction spécifique de l'intégrine et largement utilisé en préclinique : le IIA1. *In vitro*, le IIA1 inhibe l'invasion des cellules de carcinomes ovariens en Matrigel. *In vivo*, il diminue le nombre de métastases et augmente la survie des souris (Sawada et al., 2008).

Des expériences de BIAcore ont montré que le Volociximab et le IIA possédaient une affinité de liaison à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  équivalente (Ramakrishnan et al., 2006). Dans des modèles *in vitro* d'angiogenèse, le Volociximab réduisait l'apoptose des cellules endothéliales (Ramakrishnan et al., 2006). Dans des modèles de xénogreffes syngéniques de carcinomes VX2 chez le lapin, le Volociximab a permis de réduire la densité de la vascularisation tumorale et ainsi la croissance de la tumeur (Bhaskar et al., 2007). Depuis sa création, le Volociximab a été inclus dans 10 essais cliniques ciblant les mélanomes métastatiques, les cancers du poumon non à petites cellules, les cancers du pancréas métastatiques, les carcinomes rénaux mais aucune étude ne porte sur les tumeurs cérébrales (données issues de <https://clinicaltrials.gov/>). Une étude pharmacocinétique de phase I chez 21 patients atteints de tumeurs solides avancées a montré que le Volociximab était bien toléré malgré quelques effets secondaires tels que des symptômes gastro-intestinaux, des maux de tête ou une hypertension. Le bénéfice clinique est mince puisque une seule réponse stable et durable a été observée dans le mélanome (Ricart et al., 2008). L'essai clinique le plus avancé est un essai de phase II qui a testé le taux de réponse au Volociximab chez des patients atteints de cancers ovariens réfractaires à la chimiothérapie ou de cancers du péritoine. L'anticorps était bien toléré chez les patients mais aucune amélioration notable de la survie n'a pu être constatée (Bell-McGuinn et al., 2011).

Un autre anticorps, PF-04605412, ciblant spécifiquement l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  a été conçu à partir de l'immunoglobuline IgG1 dirigée contre  $\alpha 5$  dans laquelle trois mutations de la région Fc ont été introduites car ces mutations augmentent le phénomène de toxicité cellulaire dépendante des anticorps ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity). *In vitro*, cet anticorps inhibe la signalisation intracellulaire médiée par l'intégrine, l'adhésion et la migration cellulaire et la tubulogénèse des cellules endothéliales. L'anticorps PF-04605412 augmente l'ADCC dans les cellules tumorales U87 de GBM exprimant l'intégrine  $\alpha 5$ . *In vivo*, l'administration hebdomadaire de l'anticorps réduit significativement le volume des tumeurs U87. De plus, l'ajout de l'anticorps à de faibles doses au sunitinib potentialise l'efficacité anti tumorale (Li et al., 2010). Suite à ces résultats précliniques très prometteurs, un essai de phase I a testé l'administration intraveineuse de cet anticorps chez des patients atteints de tumeurs solides métastatiques.

Malheureusement, l'évaluation de la balance bénéfico-risque n'étant pas positive, cela n'encouragera pas la poursuite d'autres essais cliniques (données issues de <https://clinicaltrials.gov/>).

- Les petites molécules mimant la séquence RGD :

Le premier antagoniste non peptidique sélectif de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est le SJ749. Notre équipe a prouvé sa capacité à inhiber la prolifération *in vitro* des cellules de gliomes (Maglott *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2009) et à sensibiliser les cellules de gliomes à la chimiothérapie (Martinkova *et al.*, 2010). Un autre composé sélectif de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , analogue du SJ746, a été conçu par le groupe du Pr. Kessler (Munich, Allemagne) : le K34c. Notre équipe a montré que le K34c réduisait la survie des cellules de GBM (Cosset *et al.*, 2012; Martinkova *et al.*, 2010) et des cellules de cancer colorectal (Janouskova *et al.*, 2013).

- Les peptides non RGD mimétiques sélectifs de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ :

Les séquences en dehors du site RGD sont nécessaires pour permettre une adhésion complète de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  à la fibronectine. Une séquence particulière Pro/His/Ser/Arg/Asn (PHSRN) a permis la conception d'un antagoniste peptidique sélectif de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  : l'ATN-161 (San Diego, USA) (Stoeltzing *et al.*, 2003). La culture 3D de sphères de carcinome mammaire a mis en évidence une potentialisation de l'effet *in vitro* de la radiothérapie par l'ATN-161 (Nam *et al.*, 2010). Des cellules de carcinome de colon murin ont été injectées dans la rate de souris BALB/c pour produire des métastases hépatiques. La combinaison de l'ATN-161 et d'une chimiothérapie par fluorouracile, réduit significativement le nombre de métastases hépatiques et l'angiogenèse tumorale (Stoeltzing *et al.*, 2003).

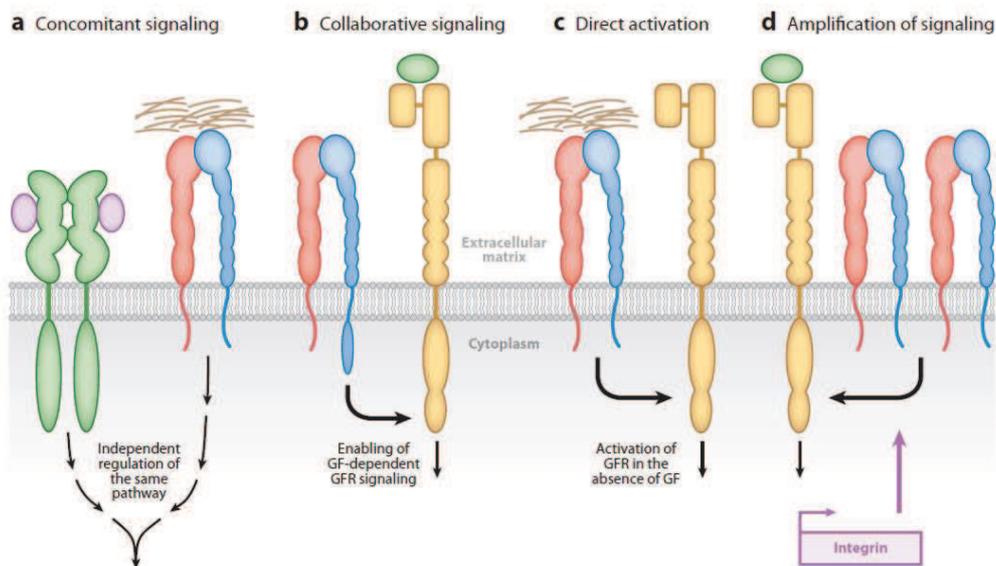
Un essai clinique de phase I a validé la sécurité d'utilisation de l'ATN-161 dans plusieurs tumeurs solides résistantes aux traitements standards. Environ 1/3 des 26 patients inclus dans l'étude ont bénéficié d'une stabilisation prolongée de leur maladie (Cianfrocca *et al.*, 2006). Plus récemment, un essai clinique américain de phase I (pharmacocinétique)/II (évaluation du taux de réponse) a testé l'association de l'ATN-161 et d'une chimiothérapie par carboplatine chez des patients atteints de gliomes malins récurrents.

Cet essai s'est achevé en 2012 mais ces résultats n'ont pas été publiés (données issues de <https://clinicaltrials.gov/>).

### 2.3. Les mécanismes de régulation des récepteurs aux facteurs de croissance par les intégrines

La littérature a maintenant bien établi que les intégrines et leurs ligands (protéines matricielles) sont de proches collaborateurs des récepteurs aux facteurs de croissance lors de la transduction du signal. C'est la synergie de ces deux types de récepteurs qui participe à l'agressivité de nombreuses tumeurs solides (Guo and Giancotti, 2004).

Il existe 4 types d'interactions entre les intégrines et les récepteurs aux facteurs de croissance (Figure 16) (Ivaska and Heino, 2011).



**Figure 16: Les différents mécanismes d'interaction des intégrines avec les récepteurs aux facteurs de croissance (GFR) lors de l'activation des voies de signalisation intracellulaire. A-** L'activité signalétique des 2 récepteurs est distincte mais elle régule les mêmes voies de signalisation intracellulaire. **B-** Les intégrines rassemblent autour d'elles une plateforme de protéines de signalisation et assistent ainsi la signalisation provenant des facteurs de croissance. **C-** Les intégrines sont également capables d'activer les GFR en absence de facteurs de croissance. **D-** Une augmentation de la densité d'intégrines à la surface cellulaire renforce la signalisation émanant des GFR.

- Une signalisation simultanée : la signalisation indépendante des deux récepteurs conduit à l'activation des mêmes molécules de signalisation et déclenche les mêmes effets biologiques (Morozevich et al., 2012).

- Une signalisation collaborative : les facteurs de croissance se lient à leurs récepteurs et la plateforme de protéines signalétiques recrutée par les intégrines assiste la signalisation des récepteurs aux facteurs de croissance.
- Une amplification de la signalisation : les signaux générés par les récepteurs aux facteurs de croissance conduisent fréquemment à l'activation des gènes des intégrines. Une augmentation de l'expression des intégrines à la surface cellulaire active la signalisation médiée par les récepteurs aux facteurs de croissance.
- La transactivation ou activation directe des récepteurs aux facteurs de croissance même en absence de leurs ligands.

La phosphorylation des récepteurs tyrosine kinase (RTK) par les intégrines est un mécanisme par lequel les intégrines peuvent augmenter la signalisation émanant des RTK (*Cabodi et al., 2004*). La coopération entre les intégrines et l'EGFR a été dans un premier temps mise en évidence dans des cellules normales. Il a été montré dans des lignées de cellules endothéliales humaines que l'activation de l'EGFR dépendante des intégrines conduit à la phosphorylation de l'EGFR sur les mêmes résidus tyrosine spécifiques que ceux phosphorylés suite à une stimulation par l'EGF. Ce n'est cependant pas toujours le cas puisque les intégrines n'induisent pas la phosphorylation de l'EGFR sur le résidu 1148 qui est pourtant un site majeur d'autophosphorylation du récepteur en réponse à l'EGF (*Moro et al., 2002*).

Dans la plupart des cas, les intégrines apparaissent comme des régulateurs positifs de la signalisation des RTK. Cependant, les interactions cellule-cellule peuvent aussi induire l'inhibition de la signalisation des RTK. L'engagement de l'intégrine  $\alpha1\beta1$  avec le collagène nécessite le recrutement de la protéine TCPTP (T cell protein tyrosine phosphatase) qui induit une déphosphorylation de l'EGFR, de PDGFR et du VEGFR (*Mattila et al., 2010*). L'importance d' $\alpha1\beta1$  dans la régulation négative de l'EGFR a aussi été démontrée *in vivo*. Des souris génétiquement modifiées pour ne pas exprimer l'intégrine ont une augmentation du niveau basal de phosphorylation de l'EGFR (*Chen et al., 2007*).

### 2.3.1. Coopération des intégrines $\beta 1$ et de l'EGFR lors de la progression tumorale

Dans ce paragraphe nous allons discuter de l'impact de la coopération signalétique de l'EGFR et de l'intégrine  $\beta 1$  (homo- ou hétérodimère) dans la tumorigénicité de différentes tumeurs solides.

La collaboration préférentielle entre l'EGFR et l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est particulièrement bien décrite dans les modèles *in vitro* de carcinomes épidermoïdes. La stimulation des cellules de carcinome épidermoïde par l'EGF régule l'état d'activation de l'intégrine via la phosphorylation de la filamine-A (régulateur négatif des intégrines qui favorise une conformation inactive non liée au ligand) (Vial and McKeown-Longo, 2012). Dans le même modèle cellulaire, l'inhibition pharmacologique et génétique de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  réduit la phosphorylation de l'EGFR sur les résidus 1086 et 1148, particulièrement impliqués dans les voies de signalisation de la prolifération cellulaire (PI3K/Akt et MAPK) (Morozevich et al., 2012). L'inhibition de l'EGFR et de l'intégrine a le même effet de diminuer la prolifération cellulaire. La combinaison des inhibiteurs de l'EGFR et de l'intégrine entraîne la suppression de la phosphorylation des protéines FAK, Akt et Erk suggérant que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et l'EGFR partagent des voies de signalisation commune régulant la prolifération des cellules de carcinome épidermoïde.

La coopération entre l'intégrine  $\beta 1$  et l'EGFR est également décrite dans les cellules de cancer bronchique. Morello et ses collègues ont montré que l'intégrine  $\beta 1$  contrôlait la signalisation de l'EGFR *in vitro* et *in vivo* et qu'elle était nécessaire pour la croissance tumorale et la migration des cellules de cancer bronchique (Morello et al., 2011).

Cette collaboration entre les deux récepteurs est également bien connue lors de l'acquisition par la cellule tumorale d'un phénotype invasif dans les carcinomes mammaires. Utilisant une lignée cellulaire très invasive issue d'une tumeur mammaire humaine, une équipe a démontré par microscopie confocale, une colocalisation entre les protéines Src, l'EGFR et l'intégrine  $\beta 1$  à la membrane plasmique de la face ventrale des cellules (Williams and Coppolino, 2014). La formation de ce complexe physique entre ces trois protéines est dépendante des protéines SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor) ayant un rôle dans le transport des MMPs lors de la maturation des invadopodes.

Une autre étude confirme l'importance de la collaboration de l'EGFR et des intégrines dans la migration des cellules de cancer mammaire (Guo et al., 2015). L'expression de la kindline (protéine qui renforce l'activation des intégrines par la Taline) est corrélée à l'expression de l'EGFR dans des biopsies de tumeur mammaire. *In vitro*, la kindline interagit directement avec le domaine kinase de l'EGFR. Ce complexe permet la stabilisation du récepteur et le blocage de sa dégradation maintenant ainsi son effet sur les voies de signalisation qui contrôlent la migration cellulaire.

### 2.3.2. Les intégrines $\beta 1$ comme facteur de résistance aux thérapies anti-EGFR

De par son rôle important dans l'oncogénicité tumorale, l'EGFR a été la cible d'anticorps ou d'inhibiteurs pharmacologiques dans l'intention de réduire la croissance tumorale. Dans la plupart des cas, les thérapies anti-EGFR n'ont pas tenu leurs promesses. De plus, les mécanismes de résistance soulèvent des questions sur le rationnel clinique d'utilisation de ces drogues chez des patients non sélectionnés. Ces dernières années, les protéines de la MEC et leurs récepteurs émergent comme des biomarqueurs de réponse aux thérapies ciblant les RTK dont l'EGFR.

Les traitements actuels contrôlent la croissance tumorale dans les premières phases du cancer mais l'efficacité à long terme est beaucoup plus modeste. Les cellules initiatrices de tumeurs aussi appelées cellules souches cancéreuses contribuent aux capacités métastatiques des tumeurs conduisant aux rechutes thérapeutiques. Dans ce contexte, je citerai une étude importante qui ne porte pas sur l'intégrine  $\beta 1$  mais qui propose l'intégrine  $\beta 3$  comme facteur favorisant les propriétés souches d'une tumeur incluant la résistance aux thérapies anti-EGFR (Seguin et al., 2014). Ils ont démontré que l'intégrine  $\alpha\beta 3$  était surexprimée dans différentes tumeurs solides (sein, poumon et pancréas) résistantes aux anti-EGFR. *In vivo*, la suppression génétique par shRNA de l'expression de l'intégrine  $\beta 3$  augmente l'efficacité de différents TKI de l'EGFR. Cette résistance aux anti-EGFR serait sous la dépendance de la coopération de l'intégrine et de l'oncogène KRAS. De plus, l'expression de  $\beta 3$  dans des biopsies de cancer pulmonaires est augmentée chez les patients ayant reçu un traitement anti-EGFR en comparaison aux patients n'ayant pas reçu de thérapies ciblées.

Plusieurs études démontrent l'importance de l'intégrine  $\beta 1$  dans la résistance des cancers mammaires aux thérapies ciblant l'EGFR. Les mécanismes de résistance au lapatinib (agent ciblant l'EGFR et HER-2) étant peu décrits, une équipe propose une voie de survie alternative dépendante de l'intégrine  $\beta 1$ . L'inhibition de l'intégrine  $\beta 1$  avec un anticorps inhibiteur bloqueur de fonction surmonte la résistance au lapatinib de cellules de cancer mammaire cultivées en trois dimensions (Huang et al., 2011a). Des travaux ont analysé le rôle de l'intégrine  $\beta 1$  dans la progression tumorale de patients atteints de cancer mammaire métastatiques, positifs pour HER-2 et traités au trastuzumab (agent ciblant l'EGFR et HER-2). Un fort marquage membranaire de l'intégrine dans des coupes de patients était corrélé à une médiane de survie plus faible et à une diminution du taux de réponse au trastuzumab (Lesniak et al., 2009).

Des études sur des carcinomes pulmonaires ont également établi que l'intégrine  $\beta 1$  potentialise considérablement l'activité oncogénique de l'EGFR et sont responsables de la résistance aux thérapies ciblant le récepteur. Dans un modèle de cancer du poumon non à petites cellules, l'adhérence des cellules à une matrice de fibronectine diminue le potentiel cytotoxique du cetuximab (agent ciblant l'EGFR). L'inhibition du récepteur de la fibronectine, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , restaure la sensibilité des cellules au cetuximab (Eke et al., 2013). La génération de sous-clones cellulaires de cancer pulmonaire résistants à l'erlotinib (TKI ciblant l'EGFR) a souligné une augmentation de l'expression et de l'activation de l'intégrine  $\beta 1$ . La délétion de l'intégrine lève la résistance à l'erlotinib dans ces cellules.

L'étude immunohistochimique d'échantillons tumoraux de patients confirme une augmentation de l'expression de l'intégrine suite à un traitement par erlotinib (Kanda et al., 2013). D'autres travaux montrent que l'intégrine  $\beta 1$  augmente la prolifération, la migration et la résistance aux anti-EGFR des cellules de cancer pulmonaire (Morello et al., 2011). *In vitro*, les cellules sur exprimant l'intégrine  $\beta 1$  sont plus résistantes à l'action cytotoxique du gefitinib sur la croissance des colonies en soft agar.

L'intégrine  $\beta 1$  est donc un régulateur important de la signalisation de l'EGFR et des propriétés tumorigéniques du cancer du poumon. Son inhibition pourrait représenter une approche thérapeutique adjuvante aux thérapies anti-EGFR.

Ces résultats sont confirmés dans des modèles cellulaires de CBNPC avec une mutation de l'EGFR (délétion de l'exon 19 connue pour conférer une sensibilité aux TKI de l'EGFR) (*Ju and Zhou, 2013*). Les auteurs ont montré une co-expression de l'intégrine  $\beta 1$  et de c-Met dans ces cellules. La combinaison de l'inhibition génétique de l'intégrine et de l'inhibition pharmacologique de c-Met, diminue la phosphorylation de l'EGFR et l'activation de ses effecteurs. La surexpression et l'activation (stimulation par la fibronectine) de l'intégrine  $\beta 1$  augmente fortement la résistance au gefitinib (IC50 du gefitinib : 17,5  $\mu\text{M}$  versus 0,08  $\mu\text{M}$  dans les cellules surexprimant ou non l'intégrine respectivement). Ces résultats soulignent une coopération entre c-Met et l'intégrine  $\beta 1$ , qui régule la résistance aux TKI de l'EGFR dans les carcinomes pulmonaires.

### *2.3.3. Le rôle des intégrines $\beta 1$ dans le trafic intracellulaire de l'EGFR*

Comme nous l'avons vu dans un chapitre précédent, les intégrines à la surface des cellules sont continuellement internalisées et recyclées à la membrane plasmique. Ces phénomènes sont sous la dépendance de petites molécules GTPases de la famille des Rab. Les voies du trafic intracellulaire des intégrines impliquant les Rab4 et Rab11 sont aussi décrites dans les cycles d'internalisation et dégradation des RTK.

Caswell et ses collègues ont montré que le cilengitide (agent bloquant l'intégrine  $\alpha\beta 3$ ) favorisait l'association des protéines couplées au Rab (Rab coupling proteins RCP) à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  favorisant le recyclage de l'intégrine à la membrane plasmique. Elle va alors se loger dans des protrusions membranaires.

L'inhibition d' $\alpha\beta 3$  par le cilengitide favorise ainsi la migration des cellules de carcinomes ovariens. Ils ont également montré que les RCP favorisaient le recrutement de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de l'EGFR dans un même complexe physique conduisant à leur recyclage conjoint à la membrane (*Caswell et al., 2008*).

### 2.3.4. Coopération des intégrines $\beta 1$ et de l'EGFR dans les gliomes

Toutes ces données plaident en faveur d'un rôle crucial des protéines de la MEC et de leurs récepteurs, les intégrines, dans la résistance aux thérapies ciblant l'EGFR. Cependant, aucune étude n'a à ce jour, mis en évidence l'implication des intégrines dans les mécanismes de résistance aux anti-EGFR observés en clinique dans le GBM.

Cependant, une étude peu convaincante suggère que le lapatinib pourrait inhiber la formation du complexe  $\beta 1$ /EGFR réduisant ainsi la migration des cellules de gliomes (Dimitropoulos et al., 2010). L'analyse immunohistochimique de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans des coupes de GBM a révélé que les zones de surexpression des récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR et PDGFR) étaient enrichies de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et des composants des protéines de signalisation associées à l'intégrine (FAK, Erk et paxilline) (Riemenschneider et al., 2005). Plus récemment, l'équipe du Dr. Vereb a quantifié par FRET (Förster resonance energy transfer) l'expression de l'hétéro-complexe  $\beta 1$ /EGFR dans des cellules de GBM en culture et dans des coupes de gliomes issues de patients. Le taux de formation du complexe *in vitro* augmente la résistance des cellules à la radiothérapie et *in vivo* le complexe est augmenté dans les astrocytomes de haut grade et constitue un facteur de mauvais pronostic (Petrás et al., 2013).

### LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Le glioblastome multiforme (GBM) est une tumeur cérébrale très invasive et agressive. Elle n'est que très rarement éliminée par résection chirurgicale et développe des résistances aux radio- et chimiothérapies ainsi qu'aux thérapies ciblées actuellement proposées. L'espérance de vie des patients est de 9-15 mois après diagnostic. Le gène HER1/ErbB1/EGFR, codant pour le récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) de l'EGF, est un élément clef de la cancérogénèse du GBM. Les essais cliniques impliquant des drogues ciblant l'EGFR (anticorps antagonistes ou inhibiteurs de TK) se sont révélés peu efficaces. Différents mécanismes de résistances aux anti-EGFR ont déjà été mis à jour mais cela n'a pas abouti à l'amélioration de la prise en charge des patients. Les études *in vitro* montrent que les anti-EGFR bloquent efficacement à la fois l'autophosphorylation du récepteur et les voies de signalisation qui en découlent. En revanche, *in vivo*, seule l'autophosphorylation du récepteur est inhibée. Ces résultats suggèrent l'activation, *in vivo*, de systèmes compensatoires des voies de signalisation pro-tumorales de l'EGFR. Dans ce contexte, le microenvironnement tumoral pourrait tenir une place importante dans la résistance des GBM aux thérapies ciblant l'EGFR.

La fibronectine est l'une des protéines de la matrice extracellulaire les plus surexprimées dans les gliomes. Son rôle dans l'invasion et la progression tumorale du GBM est maintenant bien établi. Notre équipe a montré récemment que l'intégrine  $\alpha5\beta1$ , principal récepteur de la FN, est également impliquée dans la progression des gliomes et constitue une nouvelle cible thérapeutique des GBM. Cependant des travaux contradictoires démontrent que le couple FN/ $\alpha5\beta1$  via son rôle dans la cohésion cellulaire, permettrait de bloquer l'invasion et la dispersion des cellules de GBM. Les intégrines coopèrent avec les RTK et en particulier avec l'EGFR. Des études soulignent que la coopération intégrines/EGFR peut conduire à une résistance aux drogues anti-EGFR dans des modèles de tumeurs pulmonaires, mammaires. Aucune étude à ce jour n'a abordé l'impact potentiel de la surexpression de l'intégrine  $\alpha5$  et de la fibronectine dans la résistance des GBM aux thérapies ciblant l'EGFR.

Ainsi les objectifs principaux de mes travaux de thèse sont :

- 1-** Caractériser le rôle de l'intégrine dans la résistance des cellules de GBM aux thérapies anti-EGFR sur les paramètres conventionnels d'agressivité tumorale *in vitro* (prolifération, survie et potentiel invasif).
- 2-** Evaluer *in vitro* l'efficacité de traitements ciblés visant simultanément l'EGFR et l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .
- 3-** Etudier les mécanismes moléculaires affectant la réponse des cellules de GBM aux anti-EGFR en fonction du taux d'expression de l'intégrine.
- 4-** Comprendre le rôle bivalent de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  qui semble à la fois impliquée dans la cohésion cellulaire et la dispersion des cellules de GBM (résultats résumés dans l'article 1).

# ***MATÉRIEL ET MÉTHODE***

### 1. Modèles cellulaires

Les lignées de cellules tumorales humaines de glioblastome U87MG, U373MG et T98MG (ATCC) sont maintenues dans du milieu EMEM (Lonza) supplémenté à 10% de sérum de veau fœtal (Lonza), 1% de L-glutamine (Lonza), 1% d'acides aminés non essentiels (Lonza) dans un incubateur sous atmosphère humide à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2. Transfection et tri cellulaire

Les cellules U87MG ont été transfectées de manière stable pour sur-exprimer ou sous-exprimer la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine.

Afin de trouver d'améliorer l'efficacité de transfection nous avons fait varier le ratio nombre de cellules/quantité d'ADN et le volume de l'agent de transfection/quantité d'ADN. Les meilleures conditions sont les suivantes : Les cellules U87MG sontensemencées dans une plaque 6 puits à la densité de 400 000 cellules/puits dans du milieu EMEM 24h avant la transfection.

La sous-unité  $\alpha 5$  humain extraite du plasmide pECE- $\alpha 5$  fournie par le Dr Ruoslahti (La Jolla, CA) a été cloné dans un plasmide pcDNA3.1 (Invitrogen). Ce plasmide  $\alpha 5$  pcDNA comporte une séquence de résistance à la gentamicine G418 (utilisée à 1mg/mL). Une quantité de 3 $\mu$ g de plasmide est transfectée grâce à la lipofectamine (4 $\mu$ L) dans un milieu Optimem (Lonza). Les constructions plasmidiques permettant la répression de la sous-unité  $\alpha 5$  et son contrôle ont été obtenu chez OpenBiosystems. Il s'agit de plasmide codant pour des shRNA (2,5 $\mu$ g) ne possédant pas de séquence cible ou un shRNA interagissant avec le gène de l'intégrine  $\alpha 5$  ( $\alpha 5$ pSM2). Ces plasmides sont transfectés grâce à l'Arrest-In (10 $\mu$ L) dans un milieu Optimem. La sélection s'effectue par la puromycine (utilisée à 1 $\mu$ g/mL).

La sélection des populations U87MG surexprimant ou sous-exprimant l'intégrine  $\alpha 5$  se fait par tri cellulaire. A partir d'une suspension cellulaire, cette technique permet d'isoler différentes sous-populations cellulaires en fonction de différents critères comme par exemple l'intensité de fluorescence. Un total de 4 millions de cellules par condition est nécessaire. Les contrôles suivants sont indispensables : une condition de cellules non marquées, pour les marquages indirects il faut préparer une condition uniquement marquée avec l'anticorps secondaire. Les cellules sont incubées avec les anticorps primaires sur la glace pendant 30 minutes puis rincées avec du tampon PBS/BSA 0,5%.

Après centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans la solution d'anticorps secondaires 30 minutes sur glace à l'abri de la lumière. Suite au marquage, les cellules sont gardées en suspension dans la glace dans 4mL de tampon (PBS/BSA 0,5%). Les cellules doivent impérativement être filtrées juste avant le tri (filtre stérile de 50 $\mu$ m) afin d'obtenir une suspension de cellules isolées.

A l'issue du tri (cytomètre en flux ARIA), les cellules sont collectées dans des tubes 5mL stériles (ref 352054) contenant du milieu EMEM supplémenté de 1% de pénicilline/streptomycine (Lonza). Les cellules sélectionnées sont alors amplifiées dans du milieu EMEM contenant les antibiotiques de sélection (généticine ou puromycine). Un contrôle de l'efficacité du tri cellulaire est alors nécessaire par cytométrie en flux. Nous avons dû trier la population cellulaire sous-exprimant l'intégrine (U87  $\alpha$ 5-) deux fois. L'intensité de fluorescence caractérisant l'expression de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 à la surface des cellules triées est mesurée par le logiciel FlowJo (Tree Star Inc).

Anticorps utilisés : anti- $\alpha$ 5 :  $\alpha$ 5-PE (BioLegend) utilisé à 5 $\mu$ g/mL, anti- $\beta$ 1 : hybridome TS2/16-Cy5 utilisé à 10 $\mu$ g/mL, anti-EGFR : cetuximab-Cy5 utilisé à 10 $\mu$ g/mL, anti- $\alpha$ v : hybridome clone 69.6.5 utilisé à 12 $\mu$ g/mL, anticorps secondaire FITC de rat (BD BioSciences) utilisé à 1 $\mu$ g/mL.

### 3. Signalisation et analyse par immunoblot

Les puits d'une plaque 24 puits sont recouverts d'une matrice de fibronectine humaine (Biomedical Technologies) à 10 $\mu$ g/mL O/N à 4°C ou de poly-HEMA (poly (2-hydroxyethyl methacrylate, Sigma). La solution de poly-HEMA est utilisée à 5mg/mL et diluée dans l'éthanol 2h à 60°C sous agitation puis refroidie sur glace. Les puits sont saturés avec une solution de PBS/BSA 0,5% pendant 30 minutes.

Les cellules U87MG sont carencées pendant 3h dans un milieu EMEM sans sérum. Une quantité de 100 000 cellules /puits estensemencée et conservée à l'incubateur pendant 30 minutes. La voie de signalisation de l'EGFR est stimulée avec de l'EGF (10 $\mu$ g/mL) pendant 10 minutes. La suspension de cellules non adhérentes (sur poly-HEMA) est centrifugée et lysée dans un tampon dénaturant Laemli (BioRad). Les cellules adhérentes à la fibronectine sont lysées dans le tampon Laemli directement dans le puits.

Les protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE (Biorad) pré coulé et transférées sur une membrane de PVDF (GE Healthcare). Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires (1/1000) O/N à 4°C puis avec les anticorps secondaires couplés HRP (1/10 000, Promega). Les protéines sont visualisées avec la technique par chimioluminescence (ECL, Biorad) et les quantifications sont réalisées à l'aide du logiciel Image Quant.

Anticorps utilisés : anti- $\alpha$ 5 IIA1 (BD bioSciences), anti- $\alpha$ v antibody sc9969 clone PLW7 (Santa Cruz), specific anti- $\beta$ 1 antibody TS2 produced by the hybridoma cell line TS2/16.2.1 (HB-243, ATCC), pEGFR Y1068 (Cell Signaling), EGFR (Cell Signaling), p44/42 MAPK (Erk1/2) (Cell Signaling), P-p44/42 MAPK T202/Y204 (Cell Signaling), pAkt S473 (Cell Signaling), Akt (Cell Signaling).

#### 4. Test d'adhérence cellulaire

Les puits d'une plaque 96 puits sont recouverts d'une matrice de fibronectine diluée dans du PBS à 0-10 $\mu$ g/mL (50 $\mu$ L/puits) O/N à 4°C (Pr Carreira, Cergy-Pontoise, France). Les puits contrôles négatifs sont recouverts de 50 $\mu$ L de PBS. Les puits contrôles positifs (100% d'adhésion) sont recouverts avec 50 $\mu$ L de Poly-L-Lysine à 50 $\mu$ g/mL (Sigma). Les puits sont ensuite saturés 30 minutes (PBS-BSA 1%).

Les cellules U87MG sont collectées à l'aide de l'EDTA/PBS (2mM),ensemencées à la densité de 50 000 cellules/puits et incubées pendant une période d'une heure à l'incubateur. Les cellules incubent avec les anticorps anti- $\alpha$ 5 (BIIG2 3 $\mu$ g/mL) et anti- $\alpha$ v dans du milieu EMEM/Hepes (Lonza). Les puits sont ensuite rincés trois fois avec du milieu EMEM/Hepes (rinçage mécanique). Les cellules sont fixées avec du glutaraldéhyde 1% (Electron Microscopy Sciences). Le marquage des cellules s'effectue avec une solution de cristal violet 1% pendant 30 minutes. Rincer abondamment à l'eau. Solubiliser le colorant par l'ajout de SDS 1% pendant 30 minutes sous agitation légère. Après dissolution du marquage, l'absorbance est lue à 595nm.

### 5. Test d'étalement cellulaire

Les puits d'une plaque 24 puits sont recouverts d'une matrice de fibronectine à 10µg/mL O/N à 4°C. Comme pour le test d'adhérence, les puits sont saturés avec une solution PBS/BSA 1% pendant 30 minutes.

Les cellules sont ensuiteensemencées dans du milieu EMEM/Hepes à une densité de 25 000 cellules /puits. Les cellules s'étaient sur le coating pendant 20 minutes, 40 minutes, 2h, 4h et 6h dans l'atmosphère contrôlée d'un incubateur. Les cellules sont fixées au glutaraldéhyde 1% à chaque temps. L'aire d'étalement des cellules de chaque champ (photos 10X-microscope EVOS xl Core) est mesurée grâce au module « set measurements-Area » du logiciel ImageJ.

### 6. Prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est évaluée par la méthode MTS (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) qui quantifie la dégradation du sel de tétrazolium en formazan par les enzymes de la chaîne de respiration mitochondriale. Les cellules U87MG sont ensemencées dans une plaque 96 puits (1000 cellules /puits) dans du milieu EMEM supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal et les agents anti-EGFR aux concentrations indiquées (cetuximab et gefitinib). Le MTS est ajouté 3h puis l'absorbance est mesurée à 492nm.

### 7. Test clonogénique en soft agar

Préparer une solution d'agar 0,5% stérile diluée dans du PBS et le chauffer à 42°C puis déposer 500µL/puits (plaque 24 puits) et laisser solidifier à température ambiante. Préparer une deuxième couche d'agar à 0,7% dilué dans du milieu EMEM 0% sérum.

Il faut préparer en parallèle la suspension cellulaire (1000 cellules/mL) dans du milieu EMEM 20% sérum +/- les drogues anti-EGFR et anti-α5 (2X). Pour chaque condition, dispenser 1mL/puits d'un mélange de la solution d'agar et la suspension cellulaire au ratio 1:1 (pour obtenir une solution d'agar à 0,35% et une suspension cellulaire EMEM 10% et drogues 1X). Ajouter 100µL/puits de milieu frais (+/- drogues) par semaine.

Les cellules resteront dans un incubateur à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> jusqu'à ce que les colonies apparaissent (20 jours). Les colonies sont marquées avec une solution de cristal violet 0,005% qui diffuse dans l'agar pour marquer les colonies dans toute l'épaisseur de la gélose. Une photo du puits entier est réalisée grâce à un microscope (Leica Z6 AP0) et les colonies sont ensuite comptées à l'aide d'une macro que l'on a développée sous ImageJ (en collaboration avec la plateforme PIQ de la faculté de Pharmacie, Romain Vauchelles).

### 8. Migration en chambre de Boyden

Dans le cas de la migration par chimiotactisme en chambre de Boyden, les cellules migrent en direction d'un gradient d'une molécule soluble : ici le sérum de veau fœtal.

Une suspension cellulaire de 30 000 cellules est déposée dans chaque insert dans 200µL de milieu EMEM 0% sérum +/- drogues aux concentrations voulues. L'insert est déposé dans un puits d'une plaque 24 puits contenant 500µL de milieu EMEM 10% sérum +/- drogues aux concentrations voulues. La migration des cellules à travers la membrane poreuse de l'insert s'effectue pendant 7h dans un incubateur à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules ayant transmigré sont ensuite fixées au glutaraldéhyde 1% pendant 15 minutes. Les cellules n'ayant pas migré (partie supérieure de la membrane) sont retirées délicatement à l'aide d'un coton-tige.

Les cellules ayant migré sont marquées au DAPI (clone sc-3598, SantaCruz Biotechnology) à 2,5µg/mL pendant 15 minutes. Cinq photos représentatives de la densité cellulaire de tout l'insert sont prises à l'aide d'un microscope à fluorescence (ZEISS-Axio, grossissement 10X) puis les cellules sont quantifiées grâce à une macro que l'on a développée sous ImageJ (en collaboration avec la plateforme PIQ de la faculté de Pharmacie, Romain Vauchelles).

### 9. Formation de sphéroïdes tumoraux

Formation des sphéroïdes : 6g de méthylcellulose (Sigma) sont dissout dans 250mL de milieu EMEM sans sérum de veau fœtal et chauffé à 60°C pendant 1h. Il faut ensuite ajouter 250mL de milieu EMEM supplémenté en sérum 20%, 2% acides aminés non essentiels (NEAA) et 2% sodium pyruvate (NaP) et mixer O/N à 4°C. Centrifuger la solution à 5000g pendant 2h, le surnageant sera aliquoté et conservé à 4°C. La formation des sphères peut s'effectuer selon deux techniques :

- la procédure par « gouttes inversées » : 25µL de suspension cellulaire préparée dans du milieu EMEM 10% sérum, 1% NEAA et NaP (2000 cellules) sont dispensés dans le couvercle d'une boîte de Pétri. Le couvercle est ensuite retourné permettant la création d'une goutte en 48h dans un incubateur à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

- la procédure utilisant des plaques de culture cellulaire à fonds coniques : 100µL de suspensions cellulaire préparée dans du milieu EMEM 10% sérum, 1% NEAA et NaP (2000 cellules) sont ajoutés dans des plaques 96 puits à fonds coniques (Greiner Cellstar U-bottom culture plate)

### 10. Migration collective à partir de sphéroïdes tumoraux

Des sphères de 48h sont déposées dans une plaque 24 puits dans du milieu EMEM +/- drogues sur une matrice de fibronectine à 10µg/mL). Après 18h de migration, les cellules sont pré-fixées avec du glutaraldéhyde 0,5% (Electron Microscopy Sciences) dilué dans le milieu de culture pendant 20 minutes à température ambiante. Une fixation définitive avec du glutaraldéhyde 1% pur est ensuite nécessaire pendant 15 minutes.

Les cellules sont marquées au DAPI (clone sc-3598, SantaCruz Biotechnology) à 2,5µg/mL pendant 15 minutes. Une image en contraste de phase (EVOS xl Core, grossissement 5X) et en fluorescence (ZEISS-Axio, grossissement 5X) sont acquises pour chaque sphère. Le nombre de cellules s'évadant de la sphère est quantifié grâce à une macro que l'on a développée sous ImageJ (en collaboration avec la plateforme PIQ de la faculté de Pharmacie, Romain Vauchelles).

### 11. Immunofluorescence et microscopie confocale

Les sphéroïdes sontensemencés en plaque 24 puits dans du milieu EMEM complet sur des lamelles précédemment coatées avec une matrice de fibronectine (10µg/mL). Après 18h de migration, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde (Electron Microscopy Sciences) à 4% et perméabilisées avec du Triton-X100 à 0,1% (Sigma).

Après 1h d'étape de saturation (TBS/BSA 5%), les cellules sont incubées avec les solutions d'anticorps primaires O/N dilués dans TBS/BSA 5%. Le lendemain, les cellules sont rincées au TBS puis incubées avec les anticorps secondaires pendant 2h à température ambiante à l'abri de la lumière. Les sphéroïdes sont montés entre lame et lamelle à l'aide d'un réactif de

montage (Prolong Gold antifade reagent, InVitrogen). Les images sont réalisées à l'aide d'un microscope confocal (LEICA TCS SPE II, 60x magnification oil-immersion).

Anticorps utilisés : anti- $\alpha$ 5 clone IIA1 (BD Biosciences) à 10 $\mu$ g/mL, anti- $\alpha$ 5 antibody conformation-dépendant SNAKA-51 (Millipore) à 5 $\mu$ g/mL, anti- $\beta$ 1 TS2 produit la lignée d'hybridome TS2/16.2.1 (HB-243, ATCC) à 1 $\mu$ g/mL, anti-  $\beta$ 1 Mab13 (BD Pharmingen) à 0,6 $\mu$ g/mL, pEGFR Y1068 (Cell Signaling), EGFR (Cell Signaling), Dapi clone sc-3598 (SantaCruz Biotechnology) à 2,5 $\mu$ g/mL. Les anticorps secondaires fluorescents proviennent d'InVitrogen: AlexaFLuor 488; 546; 647 à 5 $\mu$ g/mL.

### 12. Analyses statistiques

Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes +/- sem (sauf mention contraire). Les analyses statistiques sont faites par un test One way ANOVA suivis d'un post-test de Bonferroni ou un test T de Student avec le logiciel GraphPad Prism. L'intervalle de confiance de significativité est fixé à 95%.

# ***RÉSULTATS PARTIE 1***

---

*Etude du rôle l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans la résistance des glioblastomes aux thérapies anti-EGFR*

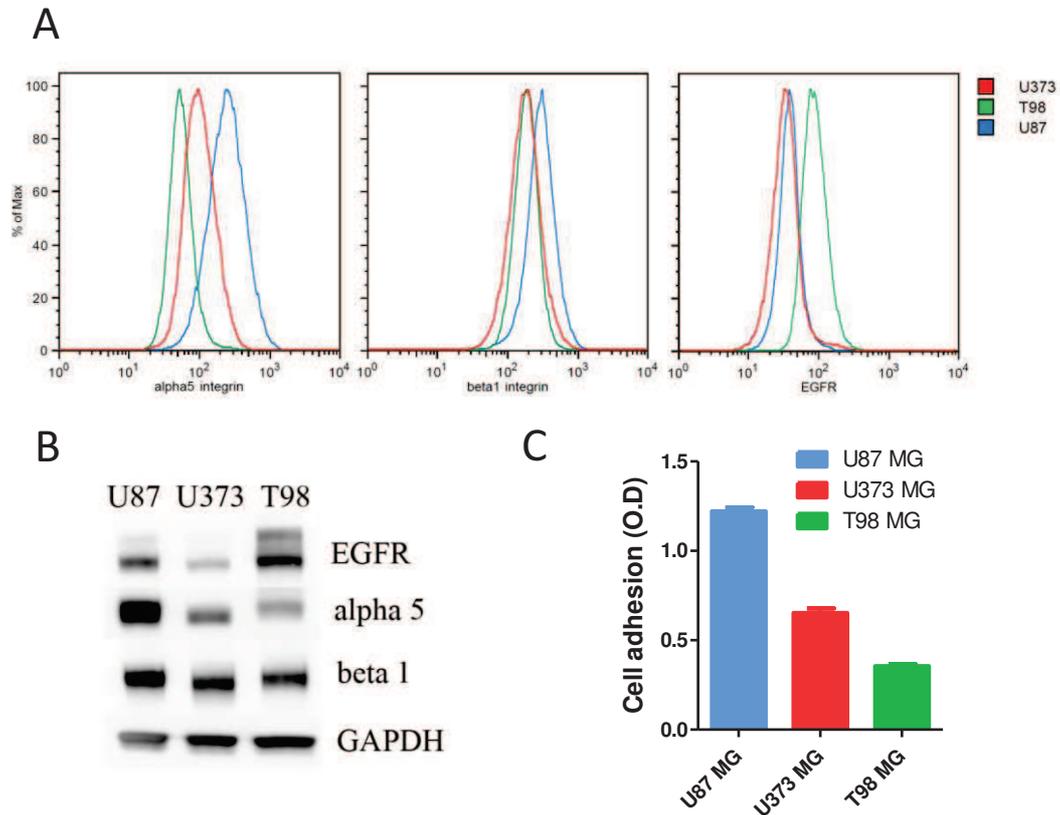
---

La littérature décrit largement la coopération signalétique entre l'EGFR et les intégrines. Certaines études font également le lien entre cette coopération et la résistance aux thérapies anti-EGFR dans les carcinomes mammaires (*Huang et al., 2011a*), pulmonaires (Eke et al., 2013; Morello et al., 2011) et du pancréas (Seguin et al., 2014). Cependant aucune étude n'a, à ce jour, abordé l'impact potentiel de la surexpression de l'intégrine  $\alpha 5$  et de la fibronectine (FN) dans la résistance des GBM aux thérapies ciblant l'EGFR. Dans cette première partie de mon travail de thèse, nous allons donc évaluer l'implication de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans la résistance des GBM aux thérapies ciblant l'EGFR. Nous proposerons également une hypothèse mécanistique permettant d'expliquer cette résistance aux anti-EGFR désormais bien connue en clinique humaine.

### **1. Coopération de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et de l'EGFR dans des lignées cellulaires de glioblastome**

#### 1.1. Expression différentielle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et de l'EGFR dans trois lignées de GBM

Les GBM étant des tumeurs très hétérogènes, nous avons imaginé que notre projet se baserait sur la comparaison de la coopération intégrine  $\alpha 5$ /EGFR dans plusieurs lignées de GBM. Nous avons donc initié notre étude avec l'utilisation de trois lignées de GBM humains provenant de la banque américaine ATCC : U87 MG, U373 MG et T98 MG. L'expression à la surface cellulaire de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de l'EGFR est analysée par cytométrie en flux dans ces trois lignées cellulaires (**Figure 17A**). L'expression totale de ces deux récepteurs est vérifiée par immunoblot (**Figure 17B**). L'expression de surface des sous-unités  $\alpha 5$  et  $\beta 1$  est corrélée avec l'expression totale des protéines dans les trois lignées de GBM.



**Figure 17: Expression différentielle de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  et de l'EGFR dans trois lignées de GBM.**

**A-** Analyse par cytométrie en flux de l'expression en surface des intégrines  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  et de l'EGFR. **B-** Immunoblot de l'expression des protéines  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  et EGFR dans les lignées U87 MG, U373 MG et T98 MG. **C-** L'adhérence des cellules de GBM à une matrice de fibronectine (10 $\mu$ g/mL) est corrélée avec le niveau d'expression d' $\alpha 5$  de chaque lignée.

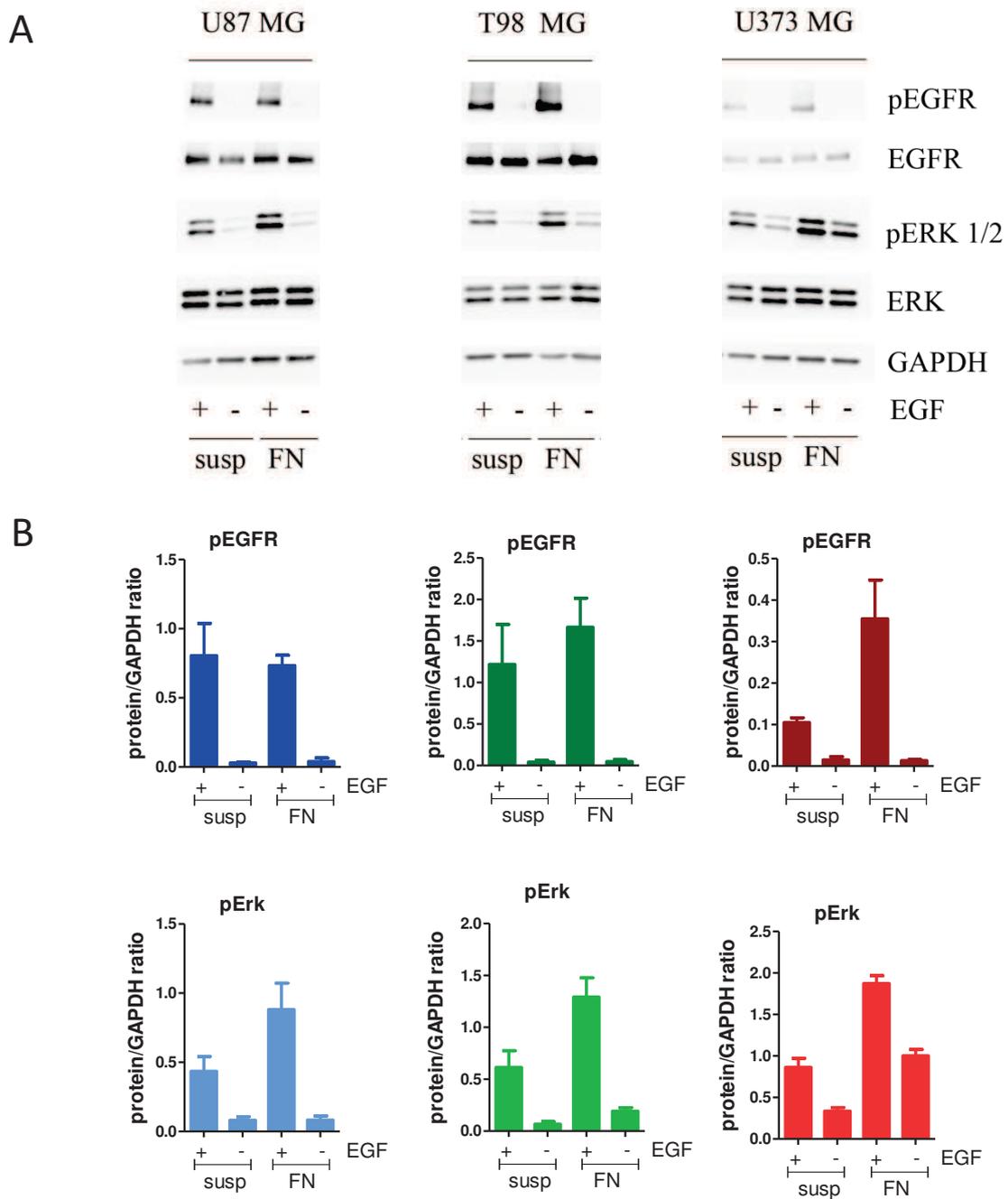
En revanche, les lignées U87 MG et U373 MG expriment la même densité de récepteur à l'EGF en surface mais l'expression totale du récepteur dans ces deux lignées semble plus faible dans la lignée U373MG (**Figure 17A et B**). L'adhérence cellulaire engage un grand nombre d'intégrine mais l'adhérence des cellules à une matrice de fibronectine engage préférentiellement les intégrines  $\alpha 5$  et  $\alpha v$ . Cependant, nous avons montré que le potentiel d'adhésion de trois lignées de GBM à la fibronectine est corrélé avec leur niveau d'expression de l'intégrine  $\alpha 5$  (**Figure 17 C**).

Afin de mettre en évidence une coopération signalétique entre l'EGFR et l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans ces trois lignées de GBM, nous avons déposé les cellules sur une matrice de fibronectine (FN) pour engager l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ou sur une matrice de poly-hema (susp) empêchant l'adhérence cellulaire et ainsi le recrutement de l'intégrine.

### 1.2. L'adhérence des cellules de GBM à la fibronectine augmente la signalisation de l'EGFR

Comme le montre les immunoblots de la **figure 18A**, dans les lignées U87MG et T98MG, l'autophosphorylation de l'EGFR par l'EGF (Tyr 1068, site de recrutement de Grb2) est inchangée que les cellules adhèrent à la fibronectine ou soient en suspension. En revanche, l'attachement des cellules à la fibronectine potentialise l'activation de la voie des MAPK en aval de l'EGFR comme le montre l'augmentation du taux de phosphorylation de la protéine Erk1/2.

La situation des cellules U373MG est différente puisque l'on observe une potentialisation de l'activation de l'EGFR et d'Erk1/2 par l'adhérence des cellules à la fibronectine en comparaison aux cellules en suspension (**Figure 18A-panel de droite**). Les analyses densitométriques du niveau de phosphorylation d'Erk1/2 révèlent qu'en absence de stimulation par l'EGF, la phosphorylation de cette protéine est plus importante dans les cellules adhérentes que dans les cellules conservées en suspension (**Figure 18B-panel de droite**). Ces données soulignent la présence d'une voie d'activation des MAPK dépendante des récepteurs de la fibronectine mais indépendante de l'EGFR.



**Figure 18: L'adhérence des cellules de GBM à la fibronectine augmente la signalisation de l'EGFR.**

**A-** Le recrutement de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans l'adhésion des trois lignées à une matrice de fibronectine (FN) potentialise la phosphorylation d'Erk1/2 en comparaison aux cellules non adhérentes (susp). En revanche, seule la phosphorylation de l'EGFR (sur le résidu 1068) dans les cellules U373 MG est augmentée par le couple  $\alpha 5$ /fibronectine. **B-** Analyse densitométrique du niveau de phosphorylation de l'EGFR et de la kinase Erk1/2 normalisé par rapport à un contrôle interne : la GAPDH.

**En résumé,**

**Nous avons mis en évidence une coopération entre l'EGF et la fibronectine qui potentialise l'activation des voies de signalisation en aval de l'EGFR dans trois lignées de GBM.**

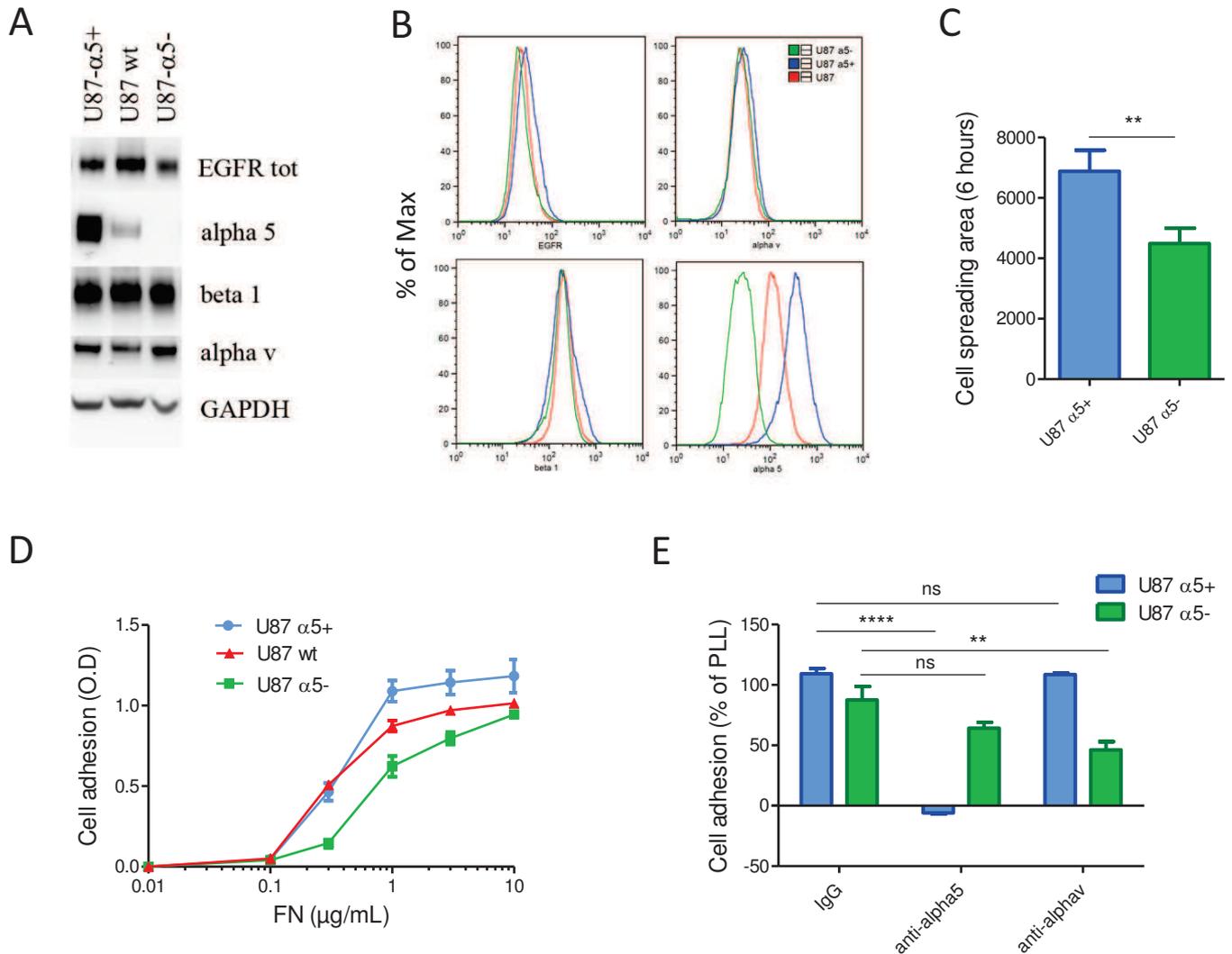
Cependant, l'attachement des cellules de GBM à la fibronectine mobilise l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  mais également les intégrines  $\alpha \beta 3$  et  $\alpha \beta 5$ . Afin de prouver que la coopération entre l'EGF et la fibronectine est strictement dépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , nous avons modifié génétiquement le niveau d'expression d' $\alpha 5\beta 1$  dans ces trois lignées (inhibition de l'expression de la sous-unité  $\alpha 5$  par shRNA et surexpression d' $\alpha 5$  par transfection de cDNA). Des contraintes techniques de difficultés de transfection nous ont contraints à utiliser la lignée U87MG comme unique modèle d'étude.

## ***2. Impact de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur la signalisation de l'EGFR dans les cellules de GBM***

### 2.1. Caractérisation de la lignée U87MG

Nous avons donc initié notre étude par la caractérisation de la lignée de GBM U87MG. Cette lignée cellulaire a été établie à partir d'une lignée d'astrocytome présentant des zones de nécrose (Pontén and Macintyre, 1968).

A l'origine, cette lignée cellulaire était décrite comme ayant une croissance très lente alors que maintenant la littérature s'accorde pour la décrire comme une lignée cellulaire à prolifération rapide, ceci indiquant que les lignées cellulaires changent avec le temps. En effet, cette lignée a été cultivée dans de nombreux laboratoires depuis sa création et l'apparition de nouvelles mutations génétiques ont mis en évidence des sous-populations phénotypiques différentes dans les laboratoires. Pourtant, de manière surprenante, le séquençage du génome de la lignée U87MG a révélé une relative stabilité de ces cellules malgré une large utilisation depuis plus de 40 ans (Clark et al., 2010). Cette stabilité génétique fait donc de la lignée U87MG un modèle de choix dans l'étude *in vitro* des GBM.



**Figure 19: Caractérisation des lignées U87  $\alpha$ 5+ et U87  $\alpha$ 5-.**

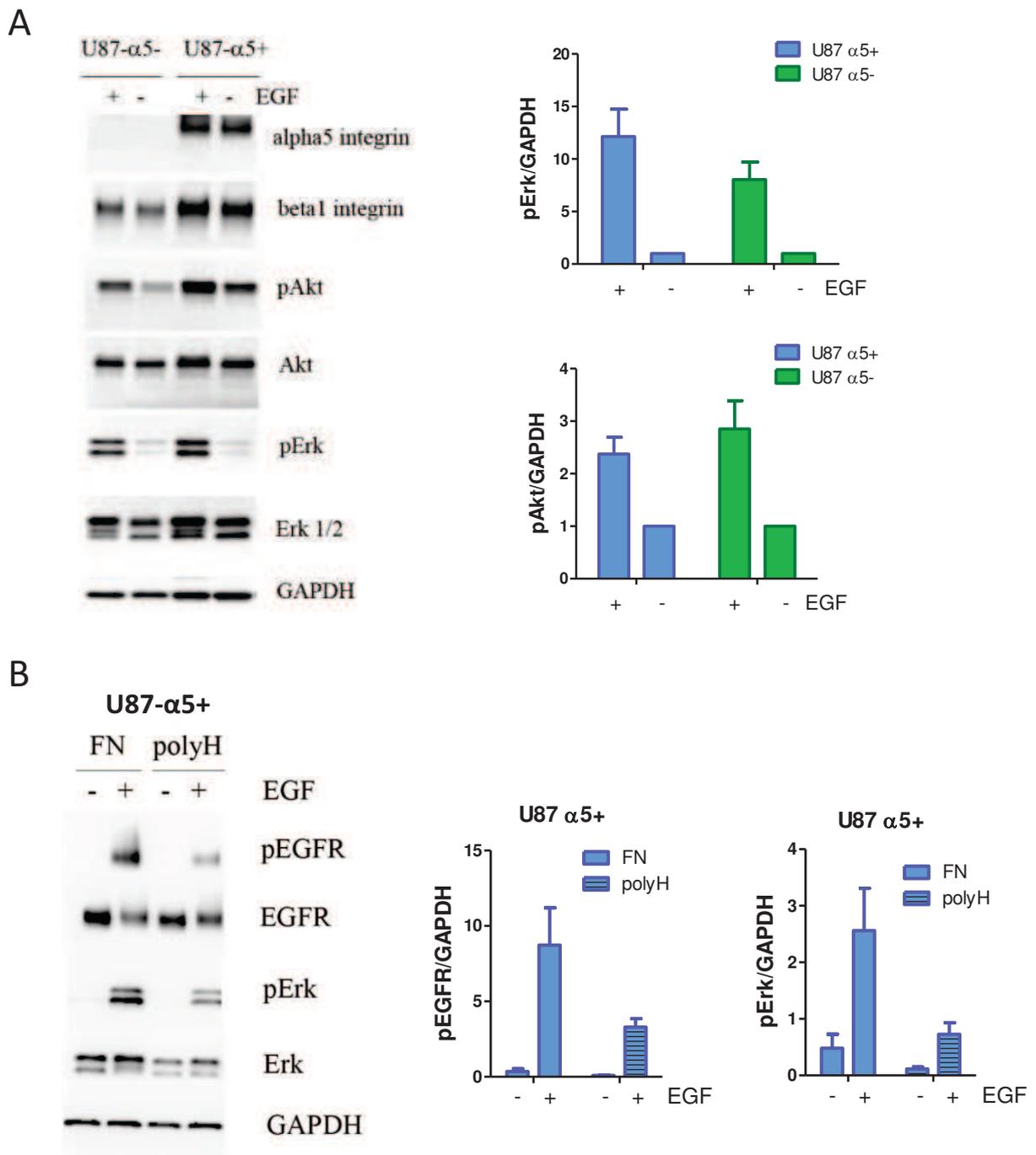
**A-** Analyse par immunoblot de l'expression totale des sous unités  $\alpha$ 5,  $\beta$ 1,  $\alpha$ v et EGFR. **B-** Analyse par cytométrie en flux de l'expression de surface de ces mêmes récepteurs. **C-** La mesure de l'aire d'étalement (ImageJ) des cellules U87 MG 6h après leur ensemencement sur une matrice de fibronectine (10 $\mu$ g/mL) est un phénomène dépendant de l'intégrine  $\alpha$ 5. **D-** L'adhérence des cellules U87 sur une matrice de fibronectine dépend du niveau d'expression d' $\alpha$ 5. **E-** L'adhérence des cellules U87  $\alpha$ 5+ à la fibronectine dépend de l'intégrine  $\alpha$ 5. En revanche, l'adhérence des cellules U87  $\alpha$ 5- à la fibronectine mobilise les intégrines  $\alpha$ 5 et  $\alpha$ v.

La lignée U87MG a été génétiquement modifiée pour sur- (U87- $\alpha$ 5+) ou sous-exprimer (U87- $\alpha$ 5-) l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 en comparaison avec le clone U87 wt exprimant un niveau basal d' $\alpha$ 5. La validation de l'efficacité de transfection est vérifiée par immunoblot (**Figure 19A**). L'expression de l'EGR ou des intégrines  $\beta$ 1 et  $\alpha$ v ne sont pas affectée par la modulation de l'expression d' $\alpha$ 5. L'analyse de l'expression à la surface cellulaire des intégrines  $\alpha$ 5,  $\beta$ 1 et  $\alpha$ v par cytométrie en flux confirme ces résultats (**Figure 19B**).

L'adhésion et l'étalement des cellules sur un substrat solide sont des étapes importantes dans la migration cellulaire. Nous avons ici confirmé que l'aire de contact entre les cellules U87MG et une matrice de fibronectine est corrélée au niveau d'expression de l'intégrine  $\alpha$ 5 dans les cellules (**Figure 19C**). Des tests d'adhérence cellulaire ont révélé que l'augmentation de l'expression d' $\alpha$ 5 $\beta$ 1 renforçait l'attachement des cellules à la fibronectine (**Figure 19D**). L'utilisation d'un anticorps inhibiteur spécifique d' $\alpha$ 5 réduit totalement l'adhérence des cellules U87  $\alpha$ 5+ mais a peu d'impact sur les cellules U87  $\alpha$ 5-. Un anticorps inhibiteur spécifique d' $\alpha$ v est inefficace sur les cellules U87  $\alpha$ 5+ mais réduit fortement l'adhérence des cellules U87  $\alpha$ 5-. Nous pouvons donc conclure que l'attachement des cellules U87- $\alpha$ 5+ sur la fibronectine n'implique que l'intégrine  $\alpha$ 5 alors que l'attachement des cellules U87- $\alpha$ 5- dépend à la fois de l'intégrine  $\alpha$ 5 et de l'intégrine  $\alpha$ v (**Figure 19E**).

## 2.2. L'intégrine $\alpha$ 5 $\beta$ 1 augmente la réponse signalétique des cellules U87MG après stimulation à l'EGF

Afin de déterminer si l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 peut potentialiser la signalisation de l'EGFR initiée par l'EGF, dans les cellules U87MG de GBM, nous avons donc comparé l'activation des voies de l'EGFR par l'EGF dans des cellules U87  $\alpha$ 5+ et U87  $\alpha$ 5- ensemencées sur une matrice de fibronectine (**Figure 20A – panel de gauche**). Les lysats cellulaires sont analysés pour la phosphorylation de l'EGFR et l'activation des voies de signalisation des MAPK et PI3K/Akt. Comme le montre l'analyse densitométrique (**Figure 20A – panel de droite**), la phosphorylation de la kinase Erk1/2 est 1,5 fois moins importante dans les cellules U87  $\alpha$ 5- que dans les cellules U87  $\alpha$ 5+. Le niveau d'expression d' $\alpha$ 5 n'a en revanche pas d'impact sur la phosphorylation d'Akt.



**Figure 20: L'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  augmente la réponse signalétique des cellules U87MG après stimulation à l'EGF.**

**A-** Le niveau d'expression de l'intégrine  $\alpha 5$  n'influence pas la phosphorylation d'Akt mais influence modestement la phosphorylation de la kinase Erk1/2 après stimulation à l'EGF. **B-** L'adhésion des cellules surexprimant l'intégrine  $\alpha 5$  à une matrice de fibronectine (FN) potentialise modestement la voie de l'EGFR au niveau du récepteur lui-même (résidu 1068) et en aval sur la kinase Erk1/2 en comparaison aux cellules non adhérentes (polyH). Les panels de droite dans les figures A et B représentent les analyses densitométriques des niveaux de phosphorylation de l'EGFR et de la protéine Erk normalisés par rapport à la GAPDH.

Même si les écarts de phosphorylation entre les deux lignées sont modérés, nos résultats sont en accord avec les travaux de Morello et ses collègues montrant que l'inhibition de l'expression de l'intégrine  $\beta 1$  dans des cellules de cancer pulmonaire, entraîne une diminution de l'activation de l'EGFR et d'Erk1/2 dans des proportions similaires à nos résultats (Morello et al., 2011).

Suite à la stimulation des cellules U87  $\alpha 5+$  par l'EGF, le taux de phosphorylation de l'EGFR (sur le résidu Tyr1068) et de la kinase Erk1/2 sont augmentés de 2,6 et 3,5 fois respectivement par l'attachement des cellules à la fibronectine (**Figure 20B**). Dans des conditions similaires, la fibronectine n'a pas eu d'impact sur l'activation de l'EGFR par l'EGF dans les cellules U87MG non transfectées (**Figure 18**). De plus, la phosphorylation de la protéine Erk1/2 n'était que 2 fois plus importante dans les cellules adhérentes par rapport aux cellules en suspension. Ainsi, l'augmentation de l'expression d' $\alpha 5$  dans les cellules U87MG renforce la signalisation croisée entre la fibronectine et l'EGF.

### En résumé,

**Nous avons démontré que l'adhésion à la fibronectine médiée par l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  des cellules de GBM, a un rôle important dans la régulation de l'activation de l'EGFR et de ses effecteurs en aval du récepteur.**

### **3. Etude de la coopération $\alpha 5\beta 1$ /EGFR sur la croissance des cellules U87MG**

Notre équipe a mis en évidence pour la première fois le rôle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans l'agressivité des gliomes et la résistance des patients à la chimiothérapie conventionnelle. Une forte expression de l'intégrine  $\alpha 5$  dans les cellules de GBM pourrait contrecarrer l'effet du temozolomide (chimiothérapie de référence des patients atteints de gliomes de haut grade) en perturbant l'activation du gène suppresseur de tumeur P53 (Janouskova et al., 2012).

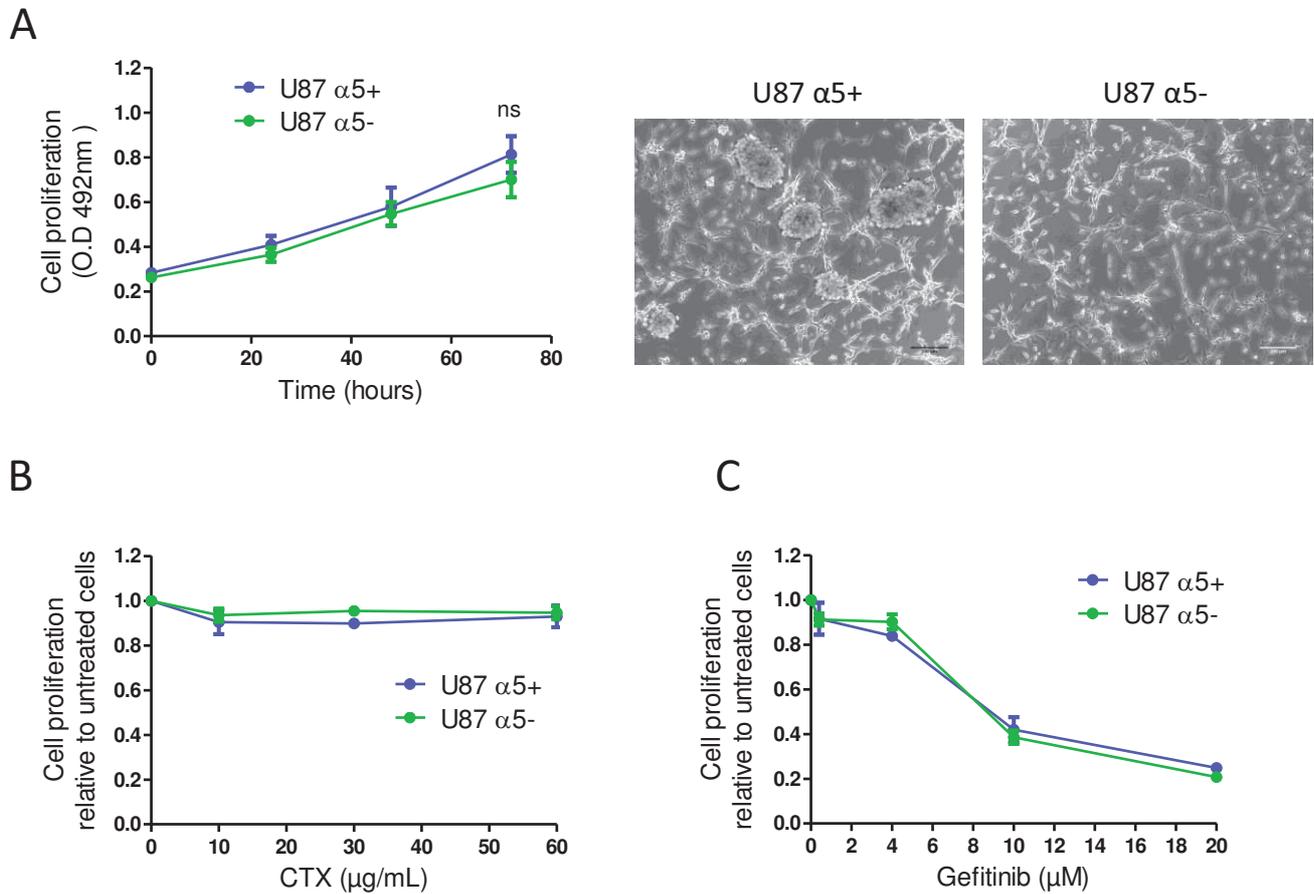
Afin de déterminer si l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  pouvait constituer un facteur de résistance aux thérapies anti-EGFR, nous avons étudié dans un premier temps l'impact de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  sur la prolifération de cellules U87MG traitées avec deux molécules anti-EGFR aux modes d'action très différents: le cetuximab (anticorps monoclonal qui lie le domaine extracellulaire de l'EGFR en compétition avec son ligand l'EGF) et le gefitinib (inhibiteur de tyrosine kinase qui cible le domaine kinase intracellulaire du récepteur).

La prolifération cellulaire est suivie par le dosage de la succinate déshydrogénase lors d'un test MTT. Comme le montre la figure 5, le niveau d'expression de l'intégrine  $\alpha 5$  n'influence pas la croissance cellulaire en 2D sur plastique des cellules U87-GM (**Figure 21A**). Après trois jours de croissance en présence de cetuximab, les 2 lignées sont insensibles à l'action anti proliférative du cetuximab (**Figure 21B**). Il apparaît donc que le manque d'efficacité du cetuximab à inhiber la croissance des cellules de GBM *in vitro* ne soit pas dépendant de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Nous confirmons ainsi des précédents travaux mettant en évidence l'inhibition modeste de la croissance des lignées de GBM (*Hasselbalch et al., 2010a*) ou de cancer colorectal (*Matsuo et al., 2011*) par le cetuximab.

Dans les mêmes conditions expérimentales, le gefitinib inhibe de façon dose dépendante la croissance des cellules U87MG (**Figure 21C**). Ces données sont en accord avec plusieurs études démontrant l'efficacité anti-proliférative du gefitinib dans les cellules U87MG à des doses similaires (*Chang et al., 2014; Yelskaya et al., 2013*). Cependant le profil pharmacologique est identique dans les cellules U87  $\alpha 5+$  et U87  $\alpha 5-$  montrant que la sensibilité au gefitinib n'est pas dépendante du niveau d'expression d' $\alpha 5$ .

### En résumé,

**Nous n'avons pas pu mettre en évidence, sur support 2D, l'existence d'une relation fonctionnelle entre l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et l'EGFR régulant la croissance des cellules.**



**Figure 21: L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  n'influence pas le potentiel cytotoxique des anti-EGFR lors de la croissance sur plastique des cellules U87MG.**

**A-** La modulation de l'expression d' $\alpha 5$  n'influence pas la prolifération en 2D ces cellules U87MG. Les images en contraste de phase (panel de droite) décrivent la capacité des cellules U87  $\alpha 5+$  à former des sphères spontanément en boîte de culture conventionnelle alors que les cellules U87  $\alpha 5-$  ne forment pas d'agrégats multicellulaires. **B-** Le cetuximab n'a aucun effet sur la prolifération sur plastique à 72h des cellules U87MG. **C-** Le gefitinib réduit la prolifération sur plastique à 72h des cellules U87MG quel que soit le niveau d'expression d' $\alpha 5$ .

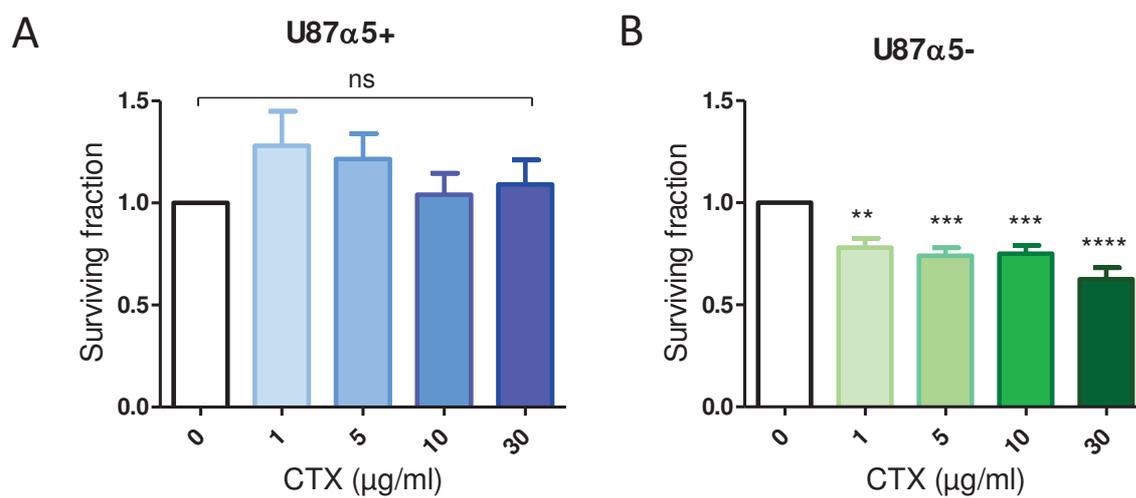
#### 4. Etude de la coopération $\alpha 5\beta 1$ /EGFR lors de la survie des cellules de GBM

L'exploration des paramètres conventionnels d'agressivité tumorale *in vitro* nous a ensuite conduits à tester l'impact du cetuximab sur la survie clonogénique des deux lignées U87MG. L'agressivité des cellules U87MG leur permet de survivre et croître dans un milieu qui ne dépend pas de l'attachement des cellules à un substrat. Nous avons donc évalué l'effet du cetuximab sur la formation de colonies U87  $\alpha 5+$  et U87  $\alpha 5-$  en soft agar à partir d'une suspension de cellules isolées. La survie clonogénique est habituellement exprimée en fraction de survie qui correspond au nombre de colonies formées rapporté au nombre de cellulesensemencées et normalisé par rapport au contrôle.

Les effets du cetuximab sur la survie clonogénique des cellules U87 MG ont déjà été démontrés dans une autre étude dans laquelle le cetuximab réduisait la fraction de survie des cellules de 50% à une dose de 3 $\mu$ g/mL de cetuximab (Combs *et al.*, 2007). Dans nos conditions expérimentales, le cetuximab est incapable de réduire la survie clonogénique des cellules U87  $\alpha 5+$  (**Figure 22A**). En revanche, le cetuximab est efficace pour réduire la fraction de survie des colonies U87  $\alpha 5-$ . Aux doses de 5 $\mu$ g/mL (comparable à la gamme de dose utilisée par Combs *et al.*) et de 30 $\mu$ g/mL de cetuximab, la fraction de survie est diminuée de 26% et 37,4% respectivement par rapport à la condition contrôle (**Figure 22B**). Ces valeurs d'inhibition restent inférieures à celles de travaux de Combs et ses collègues qui n'utilisent cependant pas le même protocole expérimental que celui de notre étude (survie clonogénique sur plastique ou en soft agar, respectivement).

##### En résumé,

Nos données illustrent donc qu'une augmentation de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5$  représente un facteur de résistance à l'inhibition de la survie clonogénique induite par le cetuximab dans les cellules U87MG. Des expériences futures comparant la survie clonogénique des deux lignées U87MG après traitement à des doses variables de gefitinib, nous permettront de déterminer si cette résistance  $\alpha 5\beta 1$ -dépendante est généralisable à différents agents thérapeutiques ciblant l'EGFR.



**Figure 22: La survie clonogénique des cellules U87MG en présence de cetuximab est dépendante du niveau d'expression d' $\alpha$ 5 $\beta$ 1.**

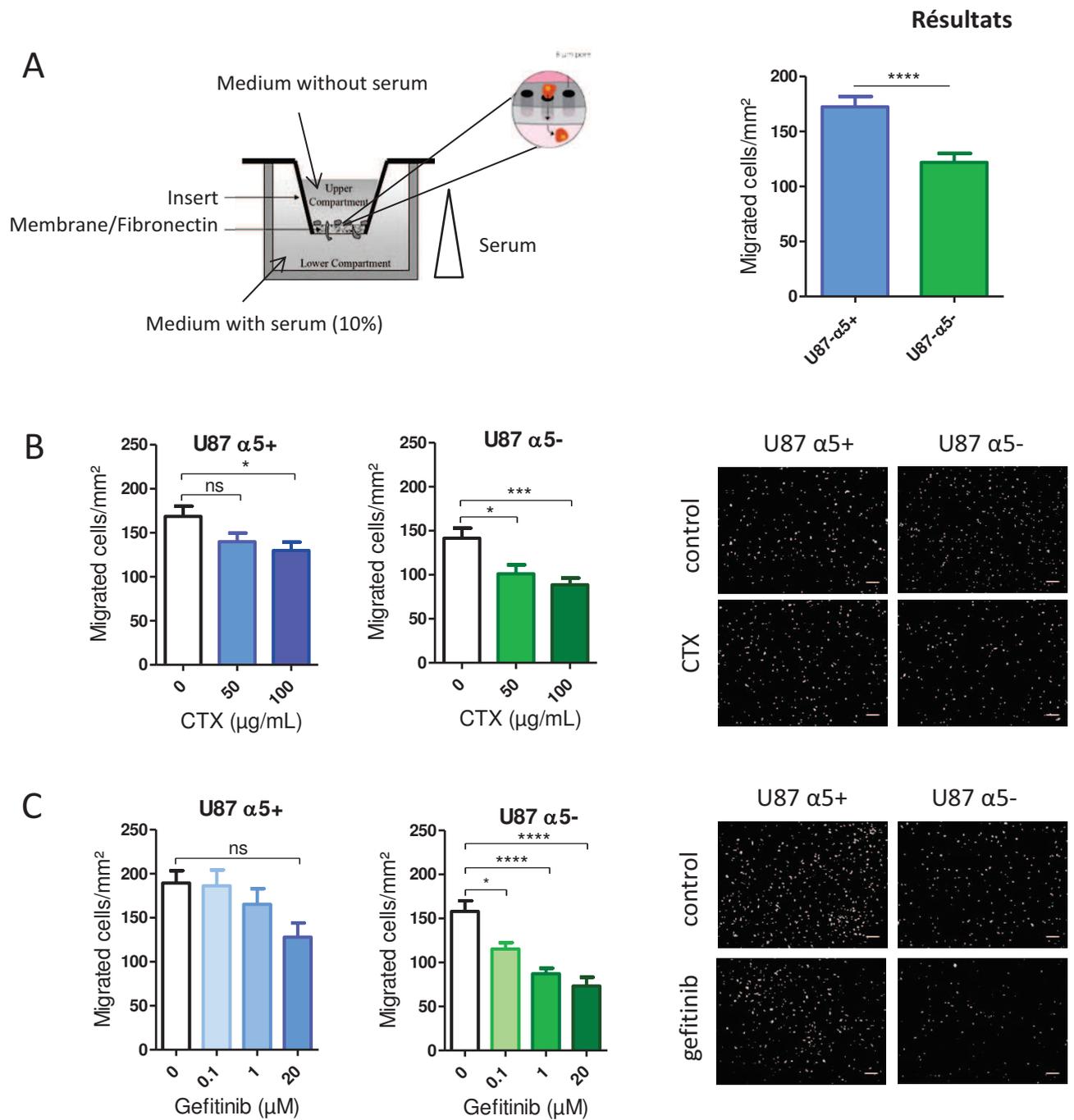
**A-** Après 20 jours de croissance en soft agar en présence de cetuximab, les cellules surexprimant l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 sont totalement résistantes au cetuximab. **B-** En revanche, dans les mêmes conditions, la survie clonogénique des cellules possédant peu l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 est diminuée.

### 5. Etude de la coopération $\alpha 5\beta 1$ /EGFR sur la migration par chimiotactisme des cellules U87MG

Les cellules de GBM possèdent un caractère hautement invasif. Dans des coupes de tumeurs issues de patients, une expression conjointe de l'EGFR et de l'intégrine  $\beta 1$  est retrouvée dans les régions périphériques, invasives du GBM (Riemenschneider et al., 2005). Les travaux sur des lignées de carcinomes pulmonaires, mammaires (Muller et al., 2009) et ovariens (Caswell et al., 2008) montrent que l'axe  $\alpha 5\beta 1$ /EGFR contrôle l'invasion cellulaire. Mais cela n'a à ce jour jamais été décrit dans les tumeurs gliales.

La migration des cellules est un processus complexe mettant en jeu différents mécanismes moléculaires en fonction du type cellulaire mais aussi et surtout des modalités expérimentales. En effet, notre équipe a criblé différents nouveaux composés sélectifs des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha v\beta 3$  lors de la migration des cellules U87MG selon deux approches : un test de « blessure-cicatrisation » et un test de migration en cellules isolées (Ray et al., 2014). Les résultats démontrent que la sélectivité de ces composés pour les intégrines dépend du mécanisme de migration cellulaire étudié. Les résultats mettent également en évidence que la migration isolée des cellules U87MG (vitesse de migration) est dépendante du niveau d'expression d' $\alpha 5\beta 1$  alors que la migration lors d'un test de « blessure-cicatrisation » (pourcentage de recouvrement de la blessure) n'est pas modulée par l'intégrine.

Il est donc important de choisir le test de migration *in vitro* qui permettra au mieux de répondre à l'hypothèse que nous formulons. Dans notre étude, la migration en chambre de Boyden présente plusieurs avantages : il s'agit d'une migration complexe puisque les cellules subissent des contraintes physiques lors du passage à travers les pores de l'insert (diamètre de  $8\mu\text{m}$ ). Les cellules migrent par chimiotactisme en direction des facteurs de croissance incluant l'EGF, contenus dans le sérum. De plus, nous avons modifié la chambre de Boyden par un dépôt de fibronectine sur la membrane poreuse de l'insert afin de mobiliser préférentiellement l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  lors de la migration des cellules U87MG (**Figure 23A-panel de gauche**).



**Figure 23: L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  augmente la migration par chimiotactisme des cellules U87MG et la résistance aux anti-EGFR.**

**A-** Schéma d'une chambre de Boyden modifiée par l'ajout d'une matrice de fibronectine (panel de gauche). La surexpression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  augmente la mobilité de cellules isolées de GBM (panel de droite). **B-** La migration des cellules exprimant peu l'intégrine  $\alpha 5$  (U87  $\alpha 5-$ ) est freinée plus efficacement par le cetuximab que la migration des cellules U87  $\alpha 5+$ . **C-** La résistance à l'action anti-migratoire du gefitinib est corrélée au niveau d'expression de l'intégrine  $\alpha 5$  dans les cellules U87 MG. Les panels de droite pour les figures B et C représentent les noyaux des cellules (marquage DAPI) permettant une quantification du nombre de cellules ayant migré (comptage automatique à l'aide d'une macro ImageJ).

Cependant, les études pharmacologiques sont plus difficiles à mettre en œuvre que dans des tests de migration en cellules isolées ou de « blessure-cicatrisation ». La migration en chambre de Boyden n'est pas adaptée pour le criblage de molécules à haut débit.

Nous avons développé une méthode de quantification semi-automatique utilisant une macro élaborée sous ImageJ (R. Vauchelles, Plateforme PIQ, Faculté de Pharmacie) à partir d'images des noyaux des cellules ayant migré à travers l'insert.

Nous avons comparé l'efficacité de deux anti-EGFR (l'anticorps monoclonal cetuximab et l'inhibiteur de tyrosine kinase gefitinib) à inhiber la migration induite par le sérum des cellules de GBM. Comme le montre la quantification de la migration des cellules U87MG, l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  augmente la migration des cellules U87MG (**Figure 23A-panel de droite**). Nous avons ensuite ajouté deux concentrations différentes de cetuximab dans les deux compartiments de la chambre de Boyden lors de la migration des cellules U87MG. Le cetuximab est plus efficace pour réduire la migration des cellules U87  $\alpha 5^-$  en comparaison aux cellules U87  $\alpha 5^+$  (**Figure 23B**). A la dose de 50 $\mu$ g/mL, le cetuximab n'affecte pas de manière significative le nombre de cellules U87  $\alpha 5^+$  ayant traversé la membrane poreuse, mais il réduit significativement la réponse au chimiotactisme des cellules U87  $\alpha 5^-$  (17 et 29% respectivement). A la dose de cetuximab maximale testée ici (100 $\mu$ g/mL), le cetuximab réduit de manière significative la migration des deux types cellulaires mais il est plus efficace dans les cellules possédant peu l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . En effet, la migration des cellules U87  $\alpha 5^+$  est réduite de 24% et celle des U87  $\alpha 5^-$  est réduite de 38% (**Figure 23B**).

Le profil pharmacologique des deux lignées est encore plus distinct lorsqu'elles sont soumises à des concentrations croissantes de gefitinib. Le gefitinib s'avère peu efficace pour inhiber la migration des cellules U87  $\alpha 5+$  (**Figure 23C**). Nos quantifications montrent bien une tendance dose-dépendante à l'inhibition de la migration, mais sans atteindre de différences réellement significatives. Une dose de 40 $\mu$ M de gefitinib est requise pour inhiber de façon significative la migration des cellules U87  $\alpha 5+$  (datas non montrés). En revanche, les cellules U87  $\alpha 5-$  sont plus sensibles à l'effet anti-migratoire du gefitinib. Une inhibition significative de la migration est obtenue dès une dose de 0,1 $\mu$ M soit une dose 400 fois inférieure à la première dose efficace dans les cellules U87  $\alpha 5+$  (**Figure 23C**).

### En résumé,

**Ces expériences de chimiotactisme en présence de fibronectine, montrent que la surexpression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est un facteur de résistance à l'activité anti-migratoire de deux classes d'agents ciblant l'EGFR.**

## 6. Etude de la potentialisation des co-traitements ciblant l'EGFR et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

### 6.1. Potentialisation des traitements ciblant l'EGFR et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur la survie clonogénique des cellules U87 $\alpha 5+$

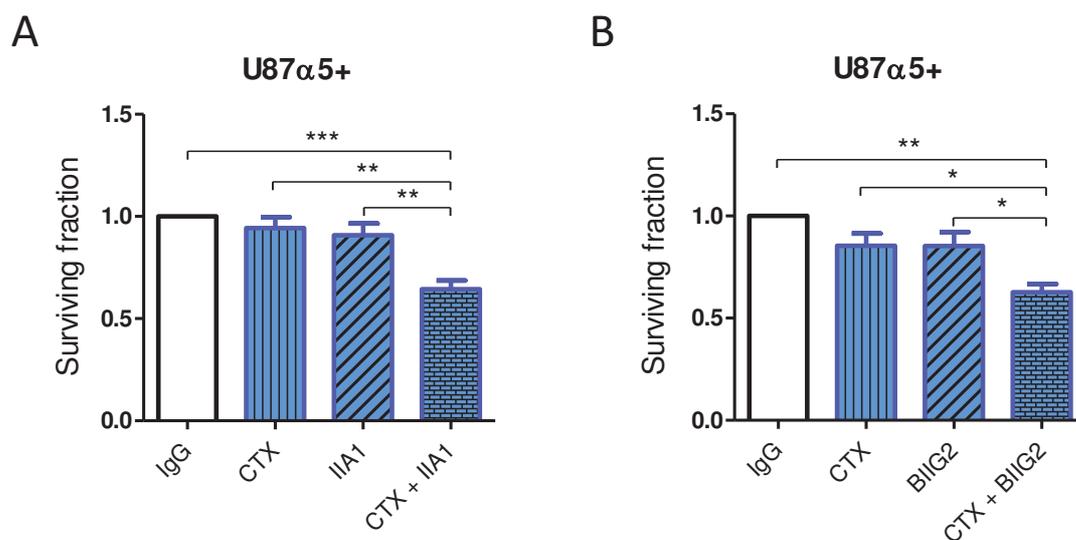
Nous avons jusqu'à présent mis en évidence le rôle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  comme facteur de résistance des cellules de GBM aux thérapies ciblant l'EGFR (survie cellulaire en soft agar, migration isolée). Afin de confirmer ces résultats, nous avons imaginé que l'inhibition fonctionnelle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  pourrait restaurer la sensibilité des cellules U87MG résistantes aux anti-EGFR (U87  $\alpha 5+$ ).

Nous nous sommes interrogés sur l'impact d'une combinaison d'agents thérapeutiques ciblant à la fois l'EGFR (cetuximab) et l'intégrine (anticorps inhibiteurs) sur la survie clonogénique et la migration des cellules de GBM.

Le cetuximab et les anticorps inhibiteurs sont utilisés à des concentrations qui n'inhibent pas les processus cellulaires. Nous avons choisis l'anticorps inhibiteur IIA1 car c'est une version chimérique humanisée du volociximab utilisé en clinique humaine (description plus précise dans l'introduction). L'association du cetuximab et de l'anticorps IIA1 (**Figure 24A**) ou d'un autre anticorps inhibiteur d' $\alpha 5$ , le BIIG2 (**Figure 24B**), réduit de 36 et 38% respectivement la fraction de survie des cellules U87  $\alpha 5+$  par rapport à la condition contrôle (IgG). Si les futures expériences comparant la survie clonogénique des deux lignées U87MG après traitement avec des doses croissantes de gefitinib nous permettent de confirmer le rôle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase, nous testerons l'association thérapeutique du gefitinib et d'un inhibiteur de l'intégrine sur la survie des cellules U87  $\alpha 5+$ .

### En résumé,

**Nous avons mis en évidence une action synergique des traitements ciblant l'EGFR et l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  sur la survie clonogénique des cellules U87  $\alpha 5+$ .**



**Figure 24: Action synergique des traitements ciblant l'EGFR et l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 sur la survie clonogénique des cellules U87  $\alpha$ 5+.**

**A-** L'association d'un anticorps anti- $\alpha$ 5 IIA1 (30 $\mu$ g/mL) et du cetuximab (CTX- 30 $\mu$ g/mL) réduit plus efficacement la survie des colonies U87 MG que les traitements utilisés seuls. **B-** L'utilisation d'un autre anticorps inhibiteur de fonction anti- $\alpha$ 5, le BIIG2 (30 $\mu$ g/mL), et du cetuximab confirme ces résultats.

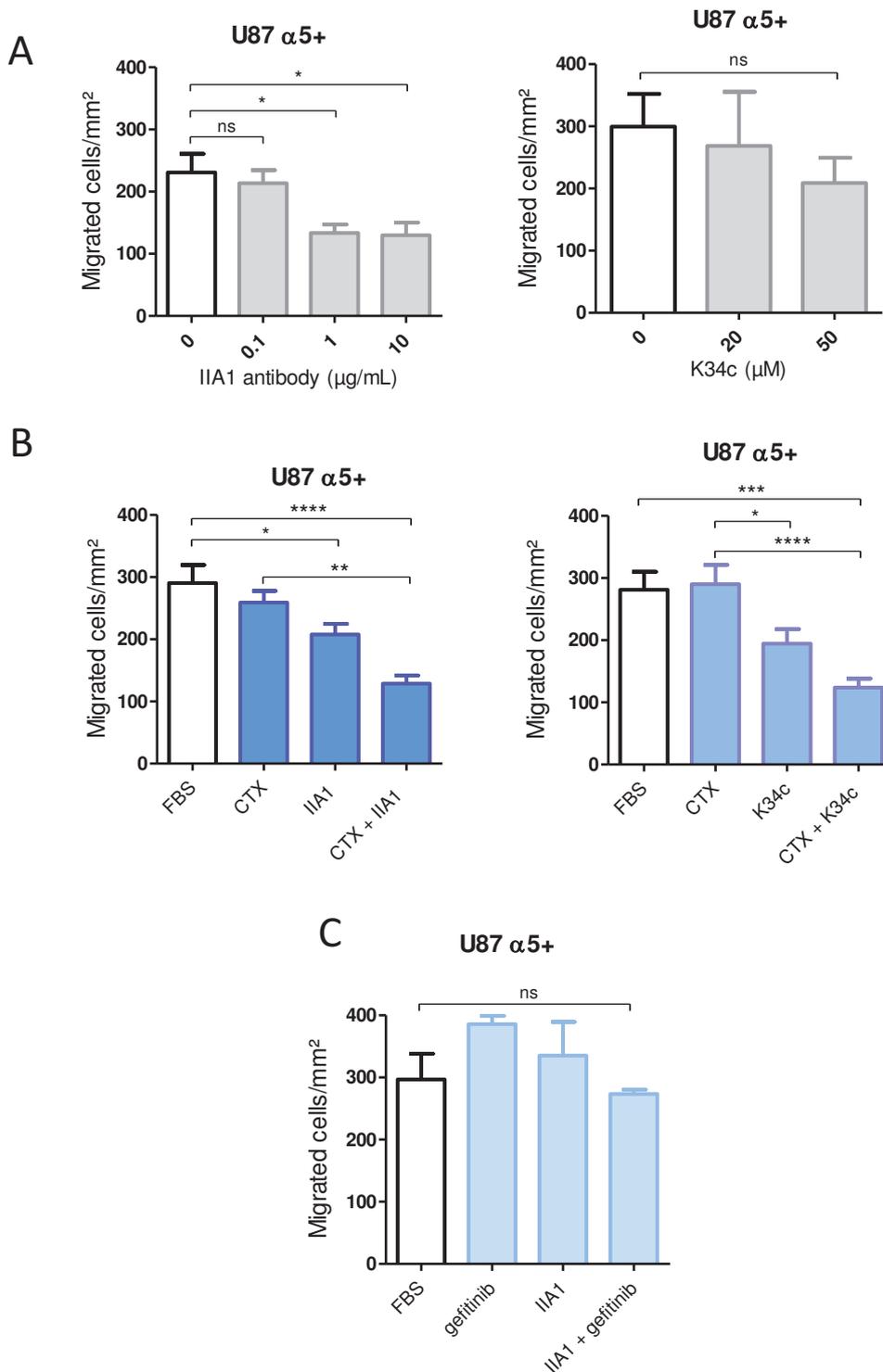
### 6.2. Potentialisation des traitements ciblant l'EGFR et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur la migration des cellules U87 $\alpha 5+$ .

Nous avons ensuite vérifié que le bénéfice à l'utilisation conjointe des deux drogues pouvait également être décrit lors de la migration des cellules U87  $\alpha 5+$ . Nous avons dans un premier temps, effectué un effet dose de l'anticorps IIA1 (**Figure 25A- panel de gauche**) et d'un antagoniste spécifique de l'intégrine  $\alpha 5$  (K34c) (**Figure 25B-panel de droite**) afin de déterminer des doses qui n'inhibent pas significativement la migration en chambre de Boyden des cellules U87  $\alpha 5+$ . L'utilisation du cetuximab (50 $\mu$ g/mL) et de l'anticorps IIA1 (1 $\mu$ g/mL) ou de l'antagoniste K34c (50 $\mu$ M) diminue de 2,25 et 2,26 fois respectivement le nombre de cellules migrant à travers de filtre de l'insert (**Figure 25B**). Des concentrations plus faibles ont été testées (IIA1 à 0,1 $\mu$ g/mL et K34c à 20 $\mu$ M) mais elles ne permettaient pas de potentialiser l'association thérapeutique.

Nous avons donc également testé l'impact de l'inhibition de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  sur la sensibilité des cellules U87  $\alpha 5+$  au gefitinib. La **figure 25C** montre que l'association du gefitinib (1 $\mu$ M) et de l'anticorps IIA1 (1 $\mu$ g/mL) n'inhibe pas significativement la migration collective des cellules U87  $\alpha 5+$  résistantes à cette dose de gefitinib.

#### En résumé,

Les tests de survie clonogénique et de migration par chimiotactisme ont montré que la sensibilité des cellules U87MG au cetuximab et au gefitinib était réduite par la surexpression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Nous avons donc cherché à comprendre les mécanismes biologiques pouvant conduire à cette résistance induite par les intégrines  $\alpha 5\beta 1$ .



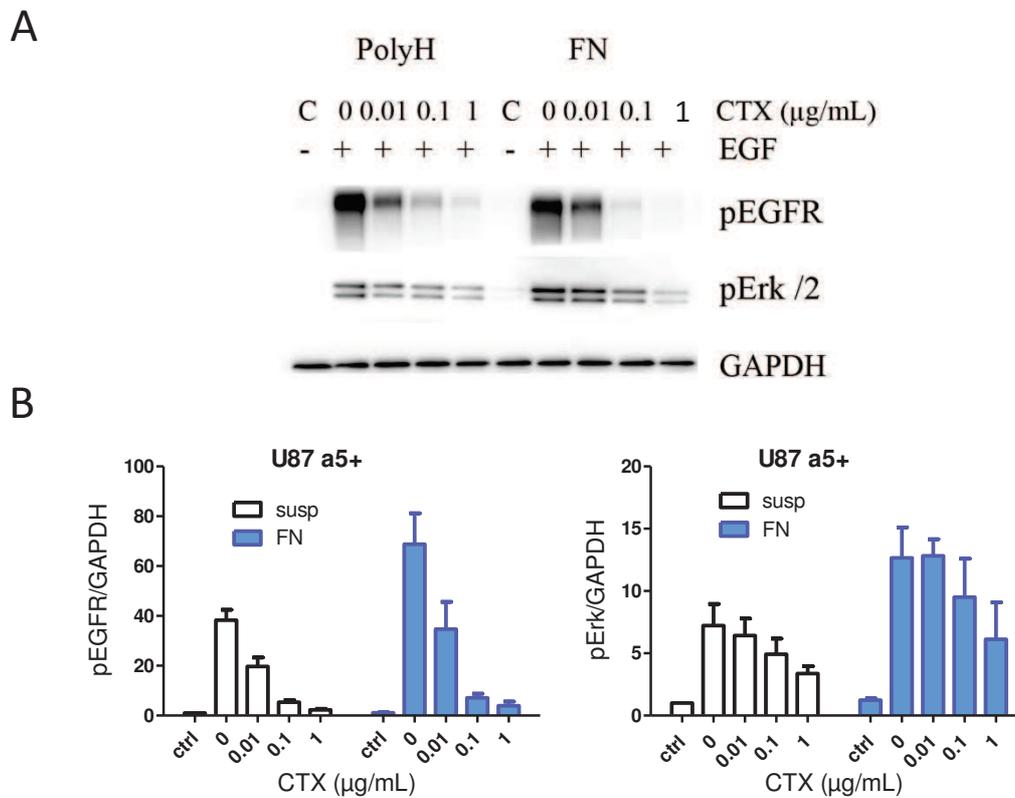
**Figure 25: Action synergique des traitements ciblant l'EGFR et l'intégrine α5β1 sur la migration des cellules U87 α5+.**

**A-Panel de gauche** L'anticorps IIA1 ne freine pas la migration en chambre de Boyden des cellules U87 MG surexprimant l'intégrine. **Panel de droite** Effet dose d'un antagoniste spécifique de l'intégrine α5 (K34c). **B-** L'utilisation conjointe du cetuximab (50μg/mL) et de l'anticorps IIA1 (1μg/mL) (**panel de gauche**) ou du K34c (50μM) (**panel de droite**) renforce leur efficacité anti-migratoire en comparaison à l'utilisation isolée des molécules. **C-** L'inhibition de l'intégrine α5 (IIA1 1μg/mL) n'augmente pas la sensibilité des cellules au gefitinib (1μM).

## 7. Impact des anti-EGFR sur la signalisation croisée $\alpha 5\beta 1$ /EGFR

Nous allons maintenant tenter de comprendre les mécanismes intracellulaires pouvant conduire à une résistance aux anti-EGFR dépendante de l' $\alpha 5\beta 1$  dans les cellules de GBM. Sachant que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  augmente la phosphorylation de la kinase Erk1/2 (Figure 4), nous nous sommes interrogés sur l'efficacité du cetuximab à inhiber la voie de signalisation de l'EGFR dans les mêmes conditions.

Si en absence de cetuximab on retrouve bien la potentialisation de l'autophosphorylation de l'EGFR par l'adhérence à la fibronectine (**Figure 26B- panel de gauche**), en revanche l'action du cetuximab sur la phosphorylation de l'EGFR semble identique dans les cellules adhérentes comme dans les cellules en suspension (**Figure 26A**). A la dose maximale de 1 $\mu$ g/mL de cetuximab, la phosphorylation de l'EGFR (Y1068) est considérablement abolie que les cellules adhèrent à la fibronectine (FN) ou qu'elles soient en suspension (polyH) (**Figure 26B- panel de gauche**). Dans le cas de la kinase Erk, les profils pharmacologiques des cellules adhérentes et des cellules en suspension demeurent très similaires (pas de différence significative entre les conditions) (**Figure 26B- panel de droite**). Dans un modèle de carcinome pulmonaire et selon un protocole similaire au notre, une étude confirme nos résultats puisque les auteurs concluent que l'efficacité du cetuximab à inhiber la voie de signalisation de l'EGFR est indépendante du substrat (*Eke et al., 2013*). On peut également remarquer que le niveau de phosphorylation d'Erk1/2 ne revient jamais à l'état basal contrôle (considéré comme le niveau de phosphorylation en absence de stimulation à l'EGF) (**Figure 26B**). Ces résultats sont en accord avec de précédents travaux montrant que l'effet inhibiteur du cetuximab sur la phosphorylation de l'EGFR dans les cellules de GBM n'aboutissait pas à une inhibition de la voie des MAPK (*Hasselbalch et al., 2010a*).



**Figure 26: Impact de l'adhérence des cellules U87 $\alpha$ 5+ à la fibronectine sur l'efficacité du cetuximab à inhiber la voie de signalisation de l'EGFR.**

**A-** Analyse par immunblot du niveau de phosphorylation de l'EGFR et de la kinase Erk à partir de lysats cellulaires traités au cetuximab pendant 1h et stimulés à l'EGF pendant 10 minutes. Les cellules sont adhérentes à une matrice de fibronectine (FN) ou conservées en suspension (susp). **B-** Analyses densitométriques représentatives de trois expériences indépendantes, réalisées grâce au logiciel ImageQuant.

Des travaux sur des cellules d'adénocarcinomes coliques avaient déjà montré que l'adhérence des cellules surexprimant  $\alpha 5$  sur une matrice de fibronectine empêchait le cetuximab d'inhiber la phosphorylation de la kinase Erk. L'absence de fibronectine restaurait l'efficacité inhibitrice du cetuximab (*Kuwada and Li, 2000*). Cependant le protocole utilisé dans cette étude est différent puisque les voies de signalisation ont été analysées après un traitement de 2 à 5 jours avec le Mab225 (forme murine du cetuximab). Il n'est donc pas impossible que le traitement chronique des cellules U87MG au cetuximab puisse permettre de mieux mettre en évidence une résistance à l'inhibition des voies de signalisation en aval de l'EGFR par le cetuximab qui soit dépendante de l'intégrine.

### **En résumé,**

**Nos résultats suggèrent que l'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par liaison avec son ligand, ne semble pas affecter l'inhibition de la voie des MAPK par le cetuximab.**

**L'impact du gefitinib sur la signalisation de l'EGFR dans les cellules U87MG n'a pas encore été testé. Ces expériences sont nécessaires pour conclure définitivement qu'une surexpression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  pourrait être un facteur de résistance à l'inhibition des voies de signalisation de l'EGFR par des drogues anti-EGFR.**

### 8. Etude de la résistance aux anti-EGFR dans un modèle d'évasion à partir de sphères tumorales

L'analyse par immunoblot des voies de signalisation de l'EGFR n'ayant pas donné de résultats très convaincants, nous avons cherché à développer de nouvelles approches expérimentales pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents à la résistance. Caswell et ses collègues ont démontré qu'une coopération de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et l'EGFR favorisait l'invasion des cellules de carcinome ovarien (Caswell et al., 2008).

Formulant l'hypothèse qu'un complexe  $\alpha 5\beta 1$ /EGFR puisse moduler la migration des cellules de GBM, nous avons alors besoin d'un modèle expérimental nous permettant d'analyser l'impact d'inhibiteurs pharmacologiques de l'EGFR sur la signalisation du récepteur lors de la migration des cellules de GBM. De plus, bien que notre étude soit uniquement basée sur des tests *in vitro*, il était nécessaire de trouver un modèle cellulaire avancé qui puisse mimer au mieux la tumeur *in situ* et nous permettre d'explorer la biologie de la tumeur ou évaluer des réponses pharmacologiques. L'utilisation de sphéroïdes qui dérivent directement de biopsies de GBM est également utilisée pour mettre en évidence le rôle de certains marqueurs dans la chimiorésistance des GBM (Kolenda et al., 2010). Une récente étude a montré que la culture de sphères tumorales dérivant des échantillons de patients atteint de cancer colorectal reflétait les caractéristiques histologiques et mutationnelles de la tumeur d'origine (Lee et al. 2015). Le screening de nouveaux anticancéreux fait encore appel aujourd'hui à la culture conventionnelle de monocouche de cellules en deux dimensions. L'utilisation de ces sphéroïdes tumoraux représentatifs de l'hétérogénéité tumorale caractéristique du GBM serait pourtant une alternative intéressante qui permettrait de réduire l'ampleur des études *in vivo*.

Nous avons donc mis au point un modèle d'étude *in vitro* de la dispersion des cellules de GBM à partir d'une sphère tumorale qui permet de préserver les jonctions intercellulaires semblables à celles retrouvées dans les modèles *in vivo* (Bjerkvig et al., 1990). Ce modèle d'évasion cellulaire à partir d'une sphère tumorale de GBM a déjà été étudié et particulièrement dans une récente étude (Serres et al., 2014).

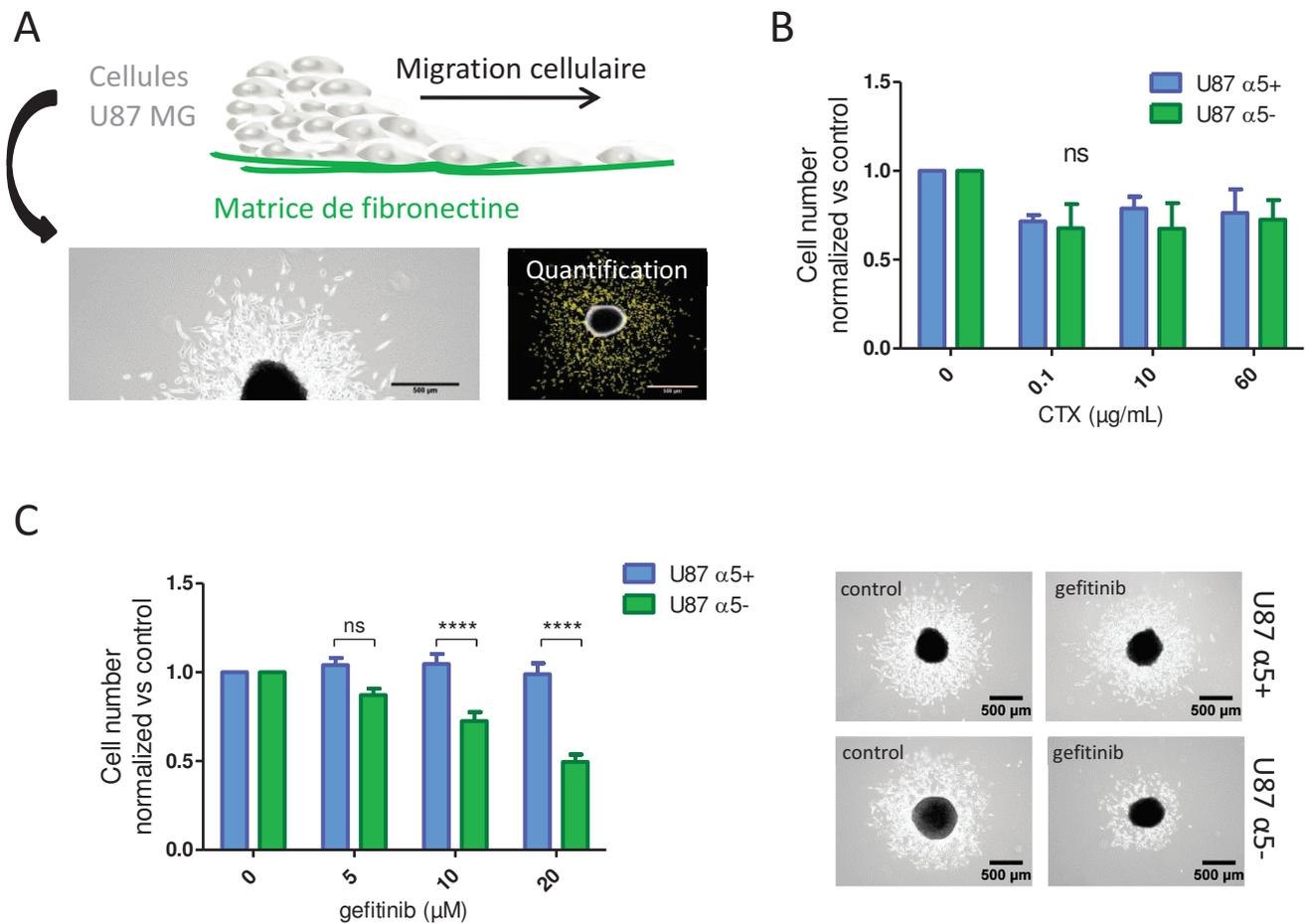
Afin d'analyser les résultats obtenus à partir de ce modèle de migration, nous avons développé une méthode d'analyse quantitative par imagerie. La quantification du nombre de cellules s'étant échappé de la sphère tumorale est permise par l'utilisation d'une macro développée sous le logiciel ImageJ (**Figure 27A**).

La caractérisation de ce modèle d'étude *in vitro* de la migration cellulaire et de l'intégrine  $\alpha 5$  fait l'objet d'une publication en soumission, jointe à ce manuscrit.

Nous avons dans un premier temps souhaité vérifier si l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  réduisait l'efficacité de différentes classes thérapeutiques d'anti-EGFR lors de la migration collective à partir de sphères tumorales U87MG.

La sensibilité au cetuximab des cellules U87MG que l'on observait lors de la migration en chambre de Boyden est perdue dans le modèle de migration en sphères. En effet, même à de fortes doses ( $60\mu\text{g}/\text{mL}$ ) le cetuximab est inefficace pour réduire l'évasion des cellules U87MG quel que soit le niveau d'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans ces cellules (**Figure 27B**).

Nous avons ensuite comparé l'efficacité du gefitinib à inhiber la migration des cellules U87MG. A la concentration de  $20\mu\text{M}$ , le gefitinib réduit de 51% la migration des cellules U87  $\alpha 5^-$  alors qu'il est totalement inefficace sur la lignée U87  $\alpha 5^+$  (**Figure 27C**). Les résultats sont similaires à ceux obtenus en chambre de Boyden confirmant que l'expression d' $\alpha 5$  désensibilise les cellules U87MG au gefitinib. Nous pouvons toutefois noter que le gefitinib est 100 fois plus efficace pour réduire la migration isolée des cellules U87  $\alpha 5^-$  (Figure 7C) que la migration collective des cellules U87  $\alpha 5^-$  ( $0,1\mu\text{M}$  en chambre de Boyden vs  $10\mu\text{M}$  en migration à partir de sphères tumorales).



**Figure 27: L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  module différemment la sensibilité aux anti-EGFR selon la classe thérapeutique d'anti-EGFR utilisée lors de la migration collective des cellules U87MG.**

**A-** Modèle d'évasion cellulaire collective à partir d'une sphère tumorale sur une matrice de fibronectine. La quantification s'effectue à l'aide d'une macro ImageJ comptant le nombre de cellules qui ont migré à partir d'une image en contraste de phase. **B-** Après 18h de migration, le cetuximab n'a pas d'impact sur la migration collective des cellules U87 MG. **C-** L'histogramme (panel de gauche) et les images en contraste de phase (panel de droite) montrent que la sensibilité des U87 MG au gefitinib est sous la dépendance de l'expression d' $\alpha 5\beta 1$ .

Nos résultats montrent donc une forte diminution de l'activité anti-migratoire des anti-EGFR dans le modèle de migration à partir de sphères tumorales, par rapport à la migration en chambre de Boyden.

Les agents anticancéreux montrent souvent une augmentation de leur efficacité en 2D en comparaison à des tests cellulaires *in vitro* en 3D (Ivascu and Kubbies, 2006). Dans un modèle mimant les cellules souches de GBM, une équipe a mis en évidence l'effet protecteur d'un environnement en collagène (3D) vis à vis d'inhibiteurs de tyrosine kinase tels que le sunitinib ou l'imatinib, en comparaison à une matrice de collagène en 2D (Fernandez-Fuente et al., 2014).

Ces résultats ainsi que nos travaux illustrent qu'il pourrait être judicieux que lors de la découverte de nouvelles drogues, celles-ci soient évaluées et sélectionnées selon un test basé sur l'utilisation de sphéroïdes. Il a récemment été montré que des inhibiteurs de l'EGFR (cetuximab et erlotinib) ne réduisaient pas l'évasion des cellules de cancers pulmonaires à partir de sphères tumorales (Ekert et al., 2014). Les auteurs relient cette inefficacité du cetuximab à une diminution du taux d'EGFR exprimé à la surface des cellules cultivées en sphères. Une équipe a montré que l'expression de l'EGFR dans différentes lignées cellulaires de cancer colorectal était réduite en culture de sphéroïdes par comparaison à des cultures de monocouches de cellules (Luca et al., 2013). Il est donc possible que la différence d'efficacité des anti-EGFR dans nos deux tests de migration puisse être reliée à la densité de récepteur à l'EGF disponible.

### En résumé,

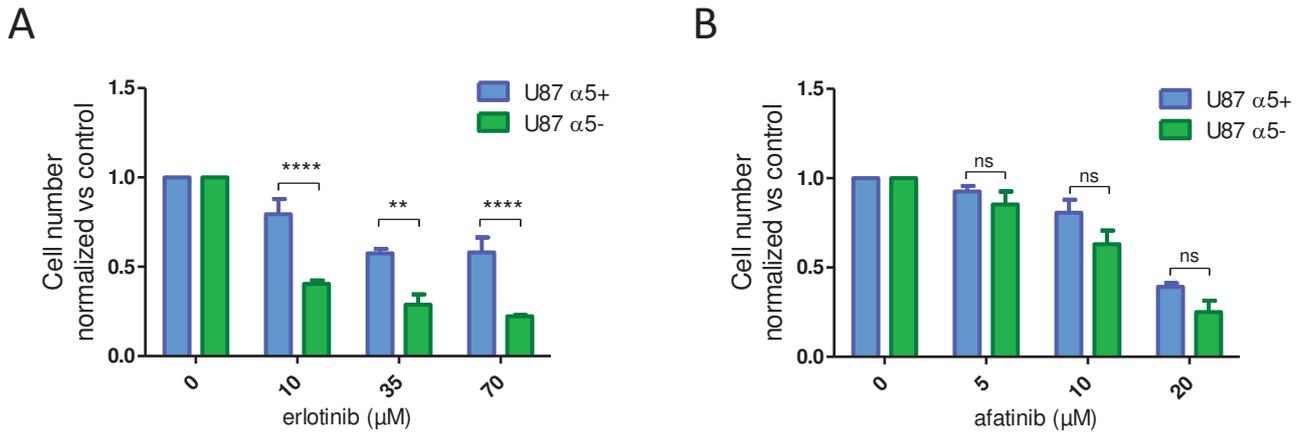
**Nous avons donc validé le modèle d'évasion à partir de sphères tumorales comme un bon outil expérimental pour la comparaison de profils pharmacologiques de différentes drogues inhibant la dissémination des cellules de GBM. Nous avons confirmé dans ce modèle de migration collective, le rôle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans la résistance des cellules de GBM aux thérapies anti-EGFR.**

Nous avons mis à profit ce modèle pour analyser l'impact d'un autre inhibiteur de tyrosine kinase réversible, l'erlotinib, sur la migration collective des cellules U87MG. Les deux lignées U87MG sont sensibles à l'action anti-migratoire de l'erlotinib mais ici encore les cellules U87  $\alpha 5^-$  sont plus sensibles à l'erlotinib que les cellules U87  $\alpha 5^+$  (**Figure 28A**). En effet, dès la dose de 10 $\mu$ M d'erlotinib, la migration des cellules U87  $\alpha 5^-$  est réduite de 60% alors que la migration des cellules U87  $\alpha 5^+$  est réduite de 21%.

Les patients traités avec des TKI de l'EGFR de première génération (réversibles) comme l'erlotinib ou le gefitinib ont développé des résistances acquises à ces drogues. Nous l'avons expliqué dans l'introduction, l'activation compensatoire d'autres membres de la famille ErbB est un des mécanismes de résistance aux anti-EGFR. Il a alors été supposé que le développement de TKI de seconde génération irréversible et non sélectif d'un seul récepteur ErbB, pourrait lever la résistance aux TKI de première génération et prolonger l'efficacité clinique de ces traitements.

L'afatinib est un inhibiteur irréversible de tous les membres de la famille ErbB (*Hirsh, 2015*). Des études précliniques *in vitro* et *in vivo*, ont démontré l'efficacité supérieure des TKI irréversibles en comparaison au gefitinib dans des modèles de cancers pulmonaires (*Kwak et al., 2005; Li et al., 2008*).

Dans ce contexte, nous avons souhaité évaluer l'impact de l'afatinib dans la migration collective des cellules de glioblastome. La courbe effet-dose montre que l'afatinib est efficace quel que soit le niveau d'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (**Figure 28B**). En effet, à la dose maximale testée de 20 $\mu$ M, la migration des lignées U87  $\alpha 5^+$  et U87  $\alpha 5^-$  est réduite de 61 et 75% respectivement. Cette différence entre les deux lignées n'est toutefois pas statistiquement significative.



**Figure 28: L'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  module différemment la sensibilité aux anti-EGFR selon la classe thérapeutique d'anti-EGFR utilisée lors de la migration collective des cellules U87MG.**

**A-** Les cellules exprimant peu l'intégrine  $\alpha 5$  sont plus sensibles à l'effet anti-migratoire de l'erlotinib que les cellules surexprimant l'intégrine  $\alpha 5$ . **B-** L'afatinib est efficace pour réduire l'évasion des U87 MG quel que soit le niveau d'expression d' $\alpha 5$ .

Ainsi, nous venons de montrer que les cellules de GBM surexprimant l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ont développé une résistance aux TKI de l'EGFR de type sélectifs et réversibles (gefitinib et erlotinib) mais cette résistance est levée par l'utilisation d'un TKI non sélectif de l'EGFR et irréversible (afatinib). Afin d'expliquer cette différence d'efficacité, nous pouvons proposer deux hypothèses :

- Nous pouvons imaginer que les anti-EGFR réversibles de première génération, se dissocient du domaine tyrosine kinase de l'EGFR suite à l'internalisation du récepteur et ainsi n'inhibent plus le récepteur. L'EGFR peut alors conserver une activité signalétique dans le compartiment intracellulaire et maintenir l'activation des voies de la survie, de la prolifération et de la migration cellulaire. Les voies de signalisation dont l'activation est dépendante de l'EGFR seraient abolies par les anti-EGFR de seconde génération irréversiblement lié au récepteur.

- D'autre part, il est possible que dans notre modèle cellulaire, l'EGFR ne soit pas le seul récepteur ErbB mobilisé lors de la migration collective des cellules de GBM. Comme cela est décrit dans l'introduction, le gefitinib n'est sélectif que de l'EGFR mais l'afatinib peut inhiber la signalisation de tous les membres de la famille ErbB. Ainsi, dans les cellules U87  $\alpha 5$ -, l'augmentation d'efficacité de l'afatinib pourrait s'expliquer par le fait qu'il inhibe également les voies de signalisation compensatoires émanant des autres récepteurs ErbB.

Ces hypothèses pourraient expliquer en partie les échecs thérapeutiques constatés avec l'utilisation d'anti-EGFR de première génération.

### En résumé,

**Nos résultats mettent en évidence une sensibilité différente des cellules U87MG selon la classe thérapeutique d'anti-EGFR utilisée. Les cellules U87MG sont insensibles à l'action de l'anticorps monoclonal cetuximab alors que les TKI sont efficaces pour réduire la migration cellulaire. En effet, l'efficacité des TKI réversibles et sélectifs de l'EGFR (gefitinib et erlotinib) est diminuée par l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . L'efficacité anti-migratoire des TKI irréversibles non sélectifs de l'EGFR (afatinib) semble moins dépendante de l'intégrine.**

**9. Etude de l'impact du gefitinib sur la localisation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de l'EGFR lors de la migration cellulaire à partir de sphéroïdes tumoraux U87MG**

A partir du modèle de migration en sphères tumorales, nous avons examiné la distribution de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de l'EGFR dans les cellules migrantes situées en périphérie de la zone de dispersion en absence (control) et en présence (GEF) de gefitinib. Les cellules ont été analysées par microscopie confocale après immunomarquage à l'aide d'anticorps reconnaissant l'EGFR et les sous-unités  $\alpha 5$  et  $\beta 1$ .

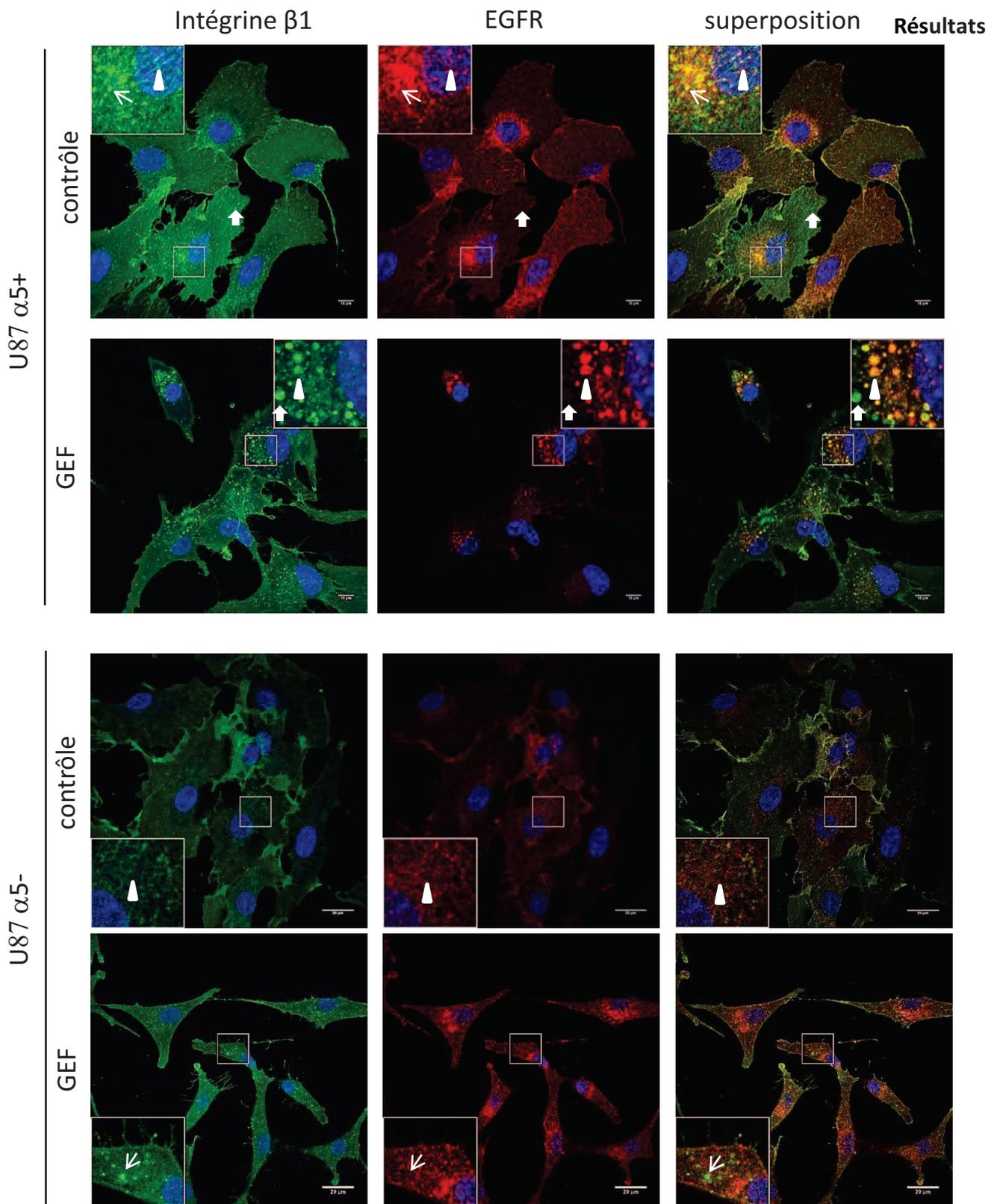
- Dans les cellules U87  $\alpha 5+$  :

En absence de gefitinib, le marquage  $\beta 1$  révèle de petits contacts focaux (flèche pleine) en périphérie des cellules et quelques adhérences fibrillaires (tête de flèche) plus centrales (**Figure 29A**). L'intégrine  $\beta 1$  est également présente dans des vésicules intracellulaires péri-nucléaires (flèche). L'EGFR est majoritairement caractérisé par une distribution diffuse à la surface de la cellule bien que l'on observe aussi de petites vésicules intracellulaires autour du noyau (**Figure 29A**).

La superposition des canaux de fluorescence (**Figure 29A merged**) ne montre pas de co-marquage de l'intégrine et de l'EGFR ni au niveau des adhérences fibrillaires (tête de flèche), ni au niveau des points focaux (flèche pleine). On peut également souligner un co-marquage de l'intégrine  $\beta 1$  et de l'EGFR dans quelques vésicules intracellulaires (**Figure 29A merged**).

Dans un premier temps, nous avons observé que le traitement au gefitinib induit une spectaculaire modification de la morphologie des deux lignées cellulaires qui deviennent fusiformes. Comme en témoignent les têtes de flèche, l'ajout de gefitinib aux cellules U87  $\alpha 5+$  entraîne une diminution des contacts focaux et une augmentation de l'internalisation des intégrines  $\beta 1$  et de l'EGFR dans des vésicules intracellulaires (**Figure 29A**).

Sur l'image de superposition des canaux (**Figure 29A merged**), certaines vésicules contiennent l'intégrine  $\beta 1$  et l'EGFR (tête de flèche) mais d'autres vésicules ne contiennent que l'intégrine  $\beta 1$  (flèche pleine).



**Figure 29: Le gefitinib augmente la localisation intracellulaire de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de l'EGFR lors de la migration des cellules U87MG.**

Images confocales des cellules U87  $\alpha 5+$  et U87  $\alpha 5-$  migrant à partir de sphères tumorales (18h) en absence (control) et en présence (GEF) de gefitinib (20 $\mu$ M). Après fixation, les cellules ont été immunomarquées avec des anticorps dirigés contre l'intégrine  $\beta 1$  et l'EGFR. La superposition des deux images est visualisée sur le panel de droite (merge). Echelle : 20 $\mu$ m.

- Dans les cellules U87  $\alpha 5^-$  :

Dans les conditions contrôles en absence de gefitinib, il y a peu ou pas de contacts focaux contenant l'intégrine  $\beta 1$  et les adhérences fibrillaires (tête de flèche) sont de plus petite taille que dans les cellules U87 $\alpha 5^+$  (**Figure 29B**). Dans ces cellules, on retrouve un marquage diffus de l'EGFR ponctué par un marquage vésiculaire (**Figure 29B**).

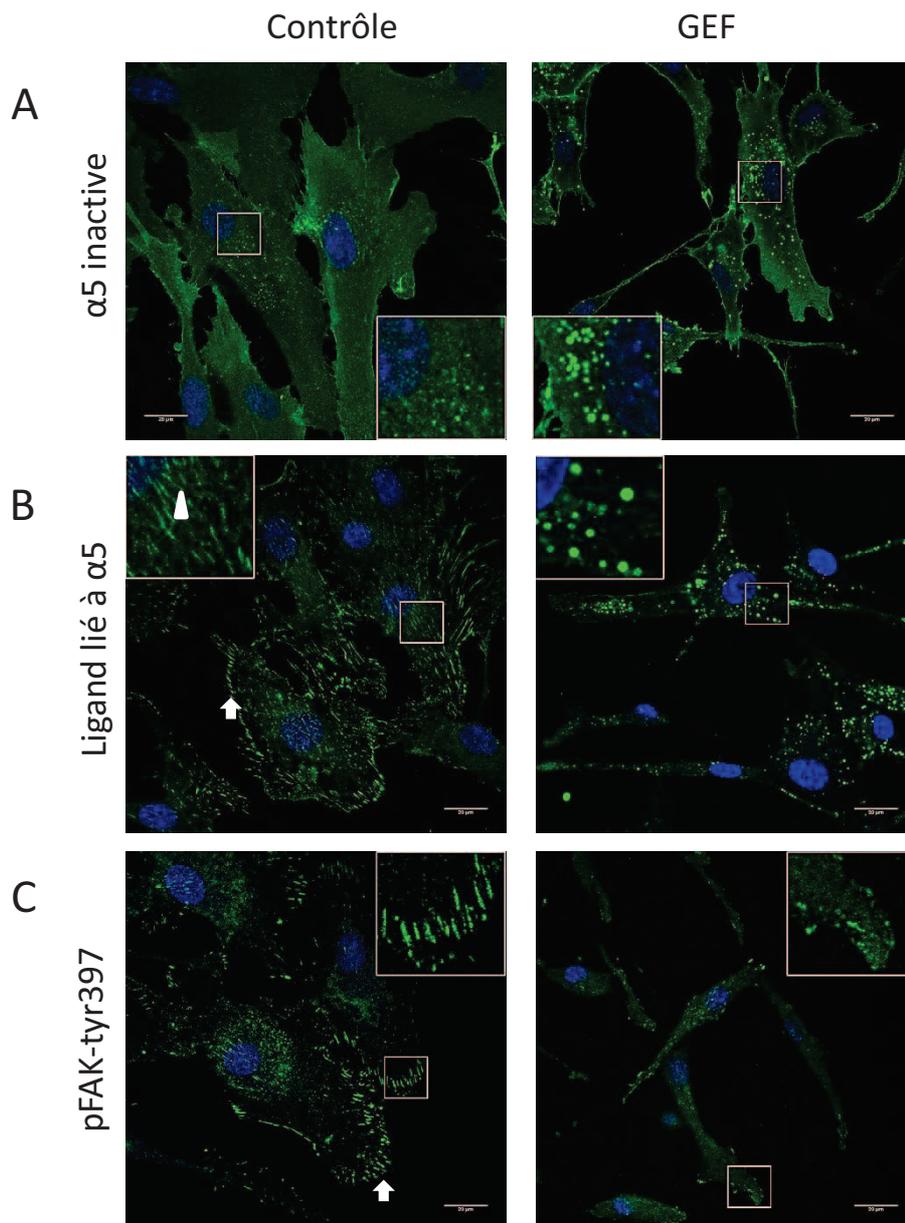
Le gefitinib fait également disparaître les petites adhésions focales contenant l'intégrine  $\beta 1$  mais nous n'observons qu'une modeste délocalisation de l'intégrine dans des vésicules intracellulaires (**Figure 29B**). L'EGFR est internalisé sous l'effet de gefitinib mais bien que nous ne puissions pas pour l'instant identifier ces vésicules intracellulaires positives pour l'EGFR, elles semblent toutefois différentes (en nombre et en taille) de celles observées en présence de gefitinib dans les cellules U87  $\alpha 5^+$ .

Comme le montre les flèches, lors de la superposition des marquages, les vésicules positives pour le marquage  $\beta 1$  ne sont pas positives pour le marquage EGFR (**Figure 29B-merged**) suggérant que l'intégrine  $\alpha 5$  est nécessaire pour assembler l'EGFR et l'intégrine  $\beta 1$  dans les mêmes vésicules intracellulaires.

#### En résumé,

**Le gefitinib induit une internalisation massive de l'intégrine  $\beta 1$  et de l'EGFR lors de la migration des cellules U87  $\alpha 5^+$  à partir de sphères tumorales. Dans les cellules U87  $\alpha 5^+$ , ces vésicules semblent contenir les deux récepteurs alors que dans les vésicules U87  $\alpha 5^-$ , la présence de l'intégrine et de l'EGFR semble mutuellement exclusive. Cela suggère que l'internalisation conjointe de l'intégrine  $\beta 1$  et l'EGFR induite par le gefitinib est un phénomène dépendant de l'intégrine  $\alpha 5$ .**

Les effets du gefitinib sur l'internalisation de l'EGFR ont déjà été décrits dans le cancer du poumon (*Jo et al., 2014*) mais l'effet du gefitinib sur l'endocytose des intégrines n'a jamais été étudié dans le GBM ce qui nous a conduit à étudier l'impact du gefitinib sur la localisation de l'intégrine  $\alpha 5$  lors de la migration des cellules U87  $\alpha 5^+$ .



**Figure 30: Le gefitinib induit une translocation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  des adhésions focales dans des vésicules intracellulaires lors de la migration collective des cellules U87  $\alpha 5+$ .**

Images confocales des cellules U87  $\alpha 5+$  après 18h de migration à partir de sphères tumorales sur une matrice de fibronectine en absence (control) et en présence (GEF) de gefitinib (20 $\mu$ M). Après fixation, les cellules ont été immunomarquées à l'aide d'anticorps dirigés contre la forme inactive d' $\alpha 5$  (Mab IIA1), la forme active d' $\alpha 5$  liée à la fibronectine (SNAKA-51) et la forme active de FAK (Y397). Echelle : 20 $\mu$ m.

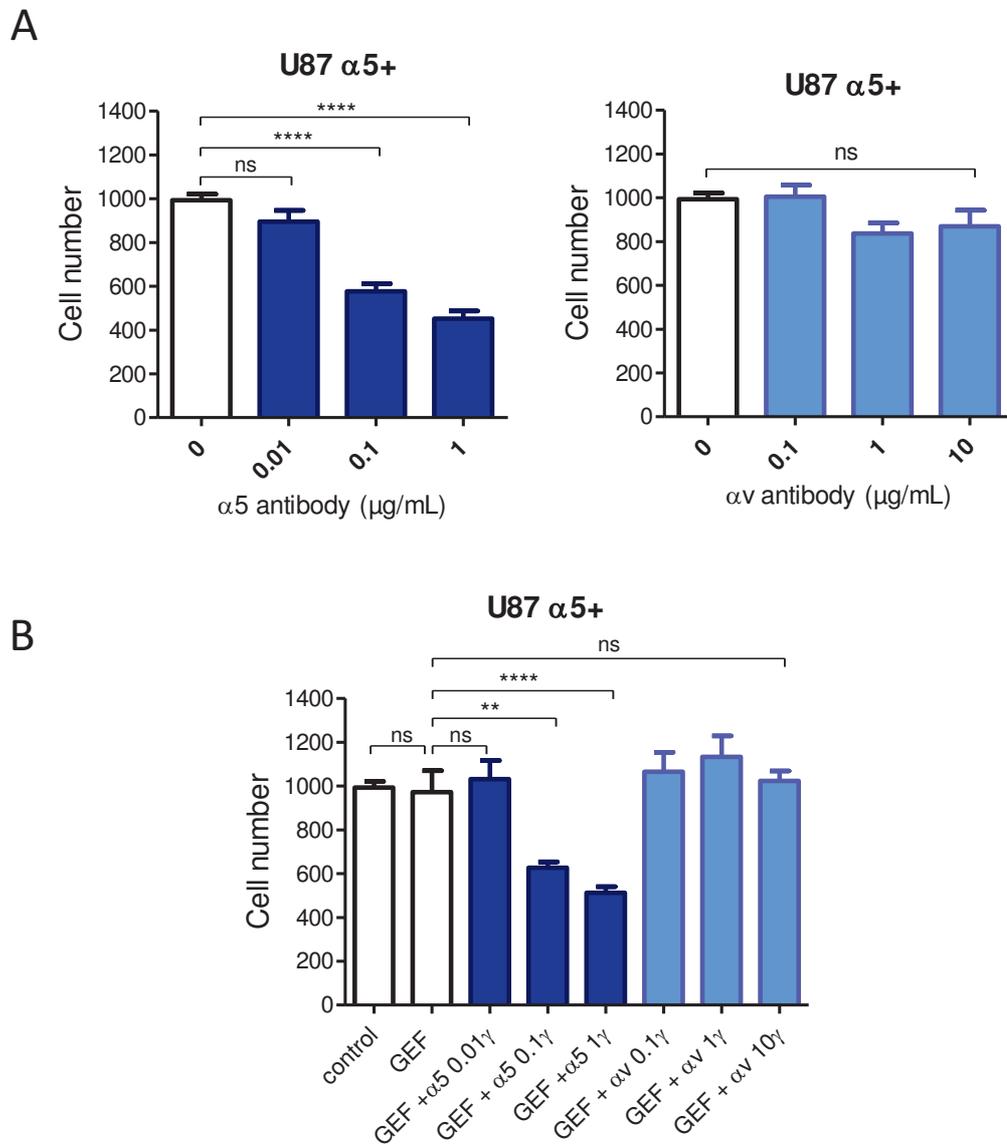
Utilisant des anticorps anti- $\beta 1$  liant spécifiquement les formes actives et inactives de l'intégrine, une équipe a analysé la conformation de l'intégrine  $\beta 1$  selon sa localisation au sein de trois lignées cancéreuses (Arjonen et al., 2012). L'intégrine active serait majoritairement localisée dans des endosomes alors que l'intégrine inactive se logerait préférentiellement dans des protrusions membranaires suggérant que l'état conformationnel des intégrines influence leur trafic intracellulaire. Nous avons donc testé deux types d'anticorps ciblant la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine : l'anticorps IIA1 reconnaissant la conformation inactive de l'intégrine et l'anticorps SNAKA-51 reconnaissant la conformation active de l'intégrine liée à son ligand la fibronectine.

- En absence de gefitinib :

Dans les cellules U87  $\alpha 5+$ , l'intégrine  $\alpha 5$  sous forme inactive présente un marquage diffus à la surface de la cellule (**Figure 30A**). Dans sa conformation inactive l'intégrine est également présente dans de petites vésicules intracellulaires. L'intégrine  $\alpha 5$  liée à la fibronectine se distribue au niveau de plaques d'adhérence fibrillaires (tête de flèche) et des contacts focaux (flèche pleine) en périphérie des cellules (**Figure 30B**). La protéine FAK activée (par la phosphorylation de la Tyr397) présente également un marquage des contacts focaux (flèche pleine) en périphérie de la cellule (**Figure 30C**).

- En présence de gefitinib :

Dans cellules U87  $\alpha 5+$ , le gefitinib augmente la localisation de l'intégrine inactive dans les vésicules intracellulaires (**Figure 30A**). L'ajout de gefitinib entraîne une forte diminution des adhérences fibrillaires et des contacts focaux contenant l'intégrine  $\alpha 5$  active liée à la fibronectine. Ce phénomène s'accompagne d'une internalisation très importante des intégrines  $\alpha 5$  actives dans des vésicules intracellulaires (**Figure 30B**). On observe également une disparition des contacts focaux (marquages pFAK) dans ces cellules suggérant un remodelage des adhésions focales par le gefitinib au cours de la migration des cellules U87  $\alpha 5+$  (**Figure 30C**).



**Figure 31: La migration des cellules U87  $\alpha 5+$  est dépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  en présence de gefitinib.**

**A- panel de gauche-** L'anticorps IIA1 spécifique de l'intégrine  $\alpha 5$  inhibe la migration collective des cellules U87  $\alpha 5+$ . **A- panel de droite-** L'inhibition de l'intégrine  $\alpha v$  par l'anticorps 69.6.5 ne réduit pas la migration collective des cellules U87  $\alpha 5+$ . **B-** L'inhibition des intégrines  $\alpha 5$  et  $\alpha v$  ne rétablit pas l'efficacité du gefitinib à inhiber la migration collective des cellules U87  $\alpha 5+$ .

Le fort remodelage des adhérences focales contenant l'intégrine  $\alpha 5$  associé à une internalisation massive de l'intégrine soulèvent des questions sur le rôle de l'intégrine  $\alpha 5$  dans la migration des cellules U87  $\alpha 5+$  en présence de gefitinib. Nous avons donc inhibé les intégrines  $\alpha 5$  et  $\alpha v$  (récepteurs de la fibronectine) lors de la migration des cellules U87  $\alpha+$  en présence de gefitinib. L'anticorps inhibiteur sélectif d' $\alpha 5$ , le IIA1 réduit de manière dose dépendante la migration cellulaire (**Figure 31A-panel de gauche**). En revanche, un effet dose d'un anticorps sélectif de l'intégrine  $\alpha v$  reste inefficace pour inhiber la migration des cellules U87  $\alpha 5+$  (**Figure 31A- panel de droite**) montrant qu'en absence de gefitinib la migration collective des cellules U87  $\alpha 5+$  sur une matrice de fibronectine est dépendante de l'intégrine  $\alpha 5$ . La combinaison des anticorps inhibiteurs (ciblant l'intégrine  $\alpha 5$  ou  $\alpha v$ ) et du gefitinib à une dose non inhibitrice (10 $\mu$ M) ne révèle pas d'effet synergique pour inhiber la migration collective des cellules U87  $\alpha 5+$  résistantes à cette dose de gefitinib (**Figure 31B**).

Cependant la migration des cellules U87  $\alpha 5+$  en présence de gefitinib est toujours dépendante de l'intégrine  $\alpha 5$  suggérant qu'il n'est pas nécessaire que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  soit localisée dans les adhésions focales pour favoriser la migration des cellules U87MG puisque lorsqu'elle est internalisée dans des vésicules intracellulaires sous l'effet du gefitinib, la migration des cellules U87  $\alpha 5+$  est toujours dépendante de l'intégrine  $\alpha 5$ .

#### En résumé,

**Les différentes conformations des intégrines  $\alpha 5$  sont massivement internalisées sans que l'on puisse déterminer pour le moment s'il s'agit d'une augmentation de l'endocytose ou une diminution du recyclage membranaire. Cette internalisation dépendante du gefitinib s'accompagne d'un fort remodelage des contacts focaux qui suggère un changement de mode de migration des cellules comme en atteste la modification de la forme des cellules après traitement au gefitinib. Dans ce cas la migration demeure dépendante de l'intégrine  $\alpha 5$ .**

**Nous montrons pour la première fois qu'un inhibiteur de tyrosine kinase de l'EGFR, le gefitinib, régule non seulement le trafic membranaire de l'EGFR lui-même, mais aussi celui de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans les cellules de GBM résistantes à l'action du gefitinib (U87  $\alpha 5+$ ).**

# *CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES*

### Contexte biologique et bibliographique:

Le glioblastome multiforme (GBM) est le gliome le plus agressif et le plus fréquent chez l'adulte. Les patients atteints de GBM ont un pronostic très sombre et sont réfractaires aux thérapies actuellement proposées. Le GBM est caractérisé par un fort degré d'hétérogénéité. Une des principales dérégulations géniques observées dans le GBM est une amplification du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR, HER1, ErbB1) retrouvée chez 40% des patients (*Behin et al., 2003*). De nombreuses thérapies ciblant le récepteur se sont développées en clinique mais des résistances innées ou acquises à ces thérapies ciblées viennent contrecarrer l'inhibition de l'EGFR et la portée de cette thérapeutique.

Senseurs du microenvironnement tumoral, les intégrines sont les principaux récepteurs de l'adhérence des cellules aux protéines de la MEC mais elles activent également des voies de signalisation intracellulaire stimulant la prolifération, la survie et le potentiel invasif des cellules tumorales (*Mitra and Schlaepfer, 2006*). Une protéine matricielle, la fibronectine, a été identifiée comme un des cinq gènes fortement exprimés dans les GBM en comparaison à des astrocytomes non invasifs (*Colin et al., 2005*). Cette surexpression augmente la malignité *in vitro* et *in vivo* des GBM (*Serres et al., 2014*). Notre équipe a montré qu'une forte expression du récepteur de la fibronectine, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , chez des patients atteints de gliome était corrélée au grade tumoral et à un plus mauvais pronostic (*Janouskova et al., 2012*). Les intégrines potentialisent l'activité oncogénique de l'EGFR et sont à l'origine de mécanismes de résistances aux thérapies ciblant l'EGFR dans les carcinomes mammaires (*Huang et al., 2011a; Huck et al., 2010; Lesniak et al., 2009*), pulmonaires (*Eke et al., 2013; Kanda et al., 2013; Morello et al., 2011*) et pancréatiques (*Seguin et al., 2014*). Cependant, aucune étude n'a à ce jour, mis en évidence l'implication des intégrines dans les mécanismes de résistance aux anti-EGFR observés en clinique dans le GBM.

Compte tenu de toutes ces données, nous avons formulé l'hypothèse que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , et son ligand la fibronectine, puisse favoriser la malignité du GBM et être un frein à l'efficacité des thérapies ciblant l'EGFR dans le GBM.

### Résumé des résultats obtenus:

Nos travaux sont basés sur l'utilisation d'une lignée de GBM humain manipulée génétiquement pour exprimer des taux variables de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (U87  $\alpha 5+$  et U87  $\alpha 5-$ ). Les résultats présentés dans cette thèse ont mis en évidence que la surexpression de l'intégrine confère aux cellules de GBM, un fort potentiel de résistance aux anti-EGFR utilisés en clinique humaine (l'anticorps monoclonal, cetuximab, et les inhibiteurs de tyrosine kinase, gefitinib et erlotinib) en comparaison aux cellules exprimant peu l'intégrine. Cette résistance affecte la capacité des drogues à inhiber le potentiel migratoire (dans deux systèmes de migration isolée en chambre de Boyden et de migration collective à partir d'une sphère tumorale) et la survie clonogénique en soft agar des cellules de GBM.

De plus, nos données indiquent que l'association d'antagonistes de l'intégrine et de molécules anti-EGFR, est une approche pertinente pour combattre la résistance induite par l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans des processus cellulaires de survie et de migration des cellules de GBM.

Enfin, nous avons analysé par microscopie confocale la distribution de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de l'EGFR dans des cellules U87MG s'échappant d'une sphère tumorale, en présence ou non de gefitinib. Nos résultats révèlent que le traitement des cellules par le gefitinib remodèle les adhérences fibrillaires contenant l'intégrine provoquant son internalisation massive. Par ailleurs, la redistribution intracellulaire de l'EGFR induite par le gefitinib, semble être augmentée par l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .

### Les limites de notre modèle d'étude :

Nous savons que les lignées de GBM entretenues en culture conventionnelle, perdent l'amplification du gène de l'EGFR et ne possèdent pas la mutation de l'EGFR (EGFRvIII) largement décrit dans les GBM (*Schulte et al., 2012*). Nous disposons au laboratoire des lignées U87-EGFR (possédant la surexpression de l'EGFR) et les lignées U87-EGFRvIII (possédant le mutant constitutivement actif nommé EGFRvIII) obtenues du Dr. Furnari. Comme pour la lignée parentale U87MG, le niveau d'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans ces lignées sera modulé par transfection de cDNA et shRNA. Nous pourrions ainsi étudier la coopération  $\alpha 5\beta 1$ /EGFR dans un contexte de surexpression des deux récepteurs permettant de mimer *in vitro* la situation clinique du GBM. Il serait donc important d'étendre nos résultats à d'autres lignées de GBM que la lignée U87MG, afin de vérifier que bien que le GBM soit une tumeur extrêmement hétérogène, l'intégrine persiste comme un bon marqueur de résistance aux thérapies anti-EGFR.

Dans une perspective à plus long terme, je pense qu'il serait judicieux de valider le rôle crucial de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans la diminution de l'efficacité des anti-EGFR sur l'invasion des cellules de GBM, dans un modèle pré-clinique chez le petit animal.

Une étude a comparé le profil invasif de différentes lignées de gliome après transplantation intra crâniale chez l'animal (*Silver et al., 2013*). L'infiltration microscopique des cellules de gliome implantées chez la souris était détectée par visualisation de l'immunomarquage de la Nestine (protéine des filaments intermédiaires exprimés dans les cellules nerveuses). Les résultats de cette étude ont montré que les lignées primaires de GBM présentent un phénotype beaucoup plus invasif que le modèle conventionnel de xénogreffes de lignée de GBM (U87MG). La masse tumorale bien délimitée de la tumeur U87MG est comparable aux xénogreffes de tumeurs astrocytaires de grade II. Tenant compte de ces travaux, la lignée U87MG n'est pas un bon modèle pour étudier *in vivo* le rôle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans la résistance aux anti-EGFR lors de l'invasion intracrâniale des cellules de GBM.

Mais nous pouvons nous tourner vers d'autres modèles de xénogreffes de cellules de GBM. Par exemple, Giannini et ses collègues ont créé un modèle *in vivo* de GBM qui maintient les caractéristiques phénotypiques et moléculaires de la pathologie. Des lignées de GBM ont été établies et amplifiées par greffes sous-cutanées répétées dans les flancs des souris, de tissu tumoral de GBM provenant des patients. Les cellules provenant des greffes sous-cutanées ont été récupérées, carencées et injectées en intracérébral. Les tumeurs intracrânielles générées étaient hautement invasives. De plus, l'amplification et la surexpression de l'EGFR (perdue en culture cellulaire comme nous venons de le voir) était maintenue dans ces tumeurs intracrânielles (Giannini et al., 2005).

Nous pouvons également envisager l'utilisation de greffes de cellules souches de GBM. Nous disposons au laboratoire de plusieurs lignées de cellules souches de GBM dont la lignée NCH 421K qui n'exprime pas l'intégrine  $\alpha 5$  mais qui a été transfectée de manière stable pour exprimer l'intégrine  $\alpha 5$ . Dans le cadre d'un projet collaboratif avec d'autres membres de mon équipe, j'ai participé à des xénogreffes orthotopiques de ces cellules souches chez la souris. N'ayant pas encore effectué de marquages immunohistochimiques sur les biopsies tumorales, nous ne pouvons pas affirmer que cette lignée a envahi le parenchyme cérébral des souris. Cependant l'utilisation de cette lignée, déjà disponible au laboratoire, pourrait être une alternative intéressante pour étudier l'impact de thérapies anti-EGFR sur l'invasion de cellules souches de GBM exprimant l'intégrine  $\alpha 5$ .

### Perspectives envisagées :

#### **Axe 1 : Comprendre l'influence de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ sur la résistance aux thérapies anti-EGFR dans la survie clonogénique des cellules de GBM.**

##### **- *In vitro* :**

Nous ne savons pas comment le cetuximab diminue la survie clonogénique des cellules U87  $\alpha 5^-$ , ni comment la surexpression de l'intégrine (U87  $\alpha 5^+$ ) s'oppose à l'inhibition de l'EGFR par le cetuximab lors des tests clonogéniques en soft agar. Nous avons alors tenté d'identifier les mécanismes mis en jeu par une approche biochimique basée sur l'utilisation de sphères tumorales en suspension (afin de mimer l'agrégation cellulaire des colonies en soft agar).

Notre hypothèse était que le cetuximab pouvait déclencher un phénomène apoptotique dans les cellules U87MG. En effet, de précédentes études avaient déjà montré que le cetuximab induisait l'apoptose dans des cellules de carcinome de la tête et du cou (*Huang et al., 1999*). Dans des modèles de xénogreffes de lignées de GBM, le cetuximab augmente la mort cellulaire par apoptose (*Eller et al., 2002*) et permet également de potentialiser l'effet de la radiothérapie (*Diaz Miqueli et al., 2009*). De plus, notre équipe a démontré que l'inhibition de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  par des antagonistes spécifiques augmentait l'apoptose *in vitro* des cellules U87MG (*Martinkova et al., 2010*).

Nous avons donc mis au point une expérience (reproduite qu'une seule fois) d'exposition des sphères tumorales au cetuximab (à la concentration maximale utilisée lors des tests de survie en soft agar : 30 $\mu$ g/mL) à différents temps (3h, 6h, 9h et 24h). L'activation de la caspase-3 par clivage a ensuite été évaluée par western blot à partir du lysat cellulaire extrait des sphères U87  $\alpha 5^+$  et U87  $\alpha 5^-$ . Quel que soit le niveau d'expression d' $\alpha 5 \beta 1$  dans les sphères, nous n'avons pas observé de clivage (et donc d'activation) de la caspase-3 en présence de cetuximab dans les cellules U87MG (data non montrés). Toutefois nous ne pouvons pas exclure qu'il s'agisse d'un phénomène apoptotique indépendant des caspases.

Nous devons aussi explorer d'autres pistes pour identifier les éléments clefs activés par l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  qui conduisent à diminuer les effets des anti-EGFR sur la survie clonogénique. Les protéines STAT (signal transducers and activators of transcription) jouent un rôle important dans la survie, croissance, prolifération et l'apoptose cellulaire. Un des membres de la famille STAT, la protéine STAT3, interagit physiquement avec l'EGFR à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Shao et al., 2003). Dans des lignées cellulaires de GBM et médulloblastome, des auteurs ont observé une importante co-expression de l'EGFR (et de son mutant VIII) et de STAT3 activée. L'utilisation d'une petite molécule inhibant l'activation de STAT3, augmente la mort cellulaire par apoptose (Lo et al., 2008). De plus, la combinaison de l'inhibiteur de STAT3 et du gefitinib augmente significativement la mort cellulaire dans les cellules exprimant l'EGFR et son mutant, en comparaison aux traitements seuls. Ces résultats peuvent suggérer l'importance de la voie STAT3 dans la résistance des GBM aux thérapies anti-EGFR. Nous savons également que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  module l'activation (phosphorylation) de STAT3 dans les cellules de GBM *in vitro* et *in vivo* en se complexant avec les métalloprotéinases de type II (Kesanakurti et al., 2013b).

Ainsi, l'analyse de la voie de signalisation STAT3 en présence de cetuximab ou de gefitinib dans notre modèle de sphères tumorales de GBM pourrait nous permettre d'expliquer les mécanismes intracellulaires sous-jacents à la résistance des colonies U87  $\alpha 5+$  aux anti-EGFR.

### **- *In vivo* :**

Nous pourrions nous appuyer sur les résultats encourageants des tests *in vitro* de survie clonogénique, pour évaluer l'impact de co-traitements ciblant l'intégrine et l'EGFR sur l'inhibition de la survie et de la croissance tumorale chez l'animal (xénogreffes orthotopiques de cellules U87MG). Ces travaux nous permettraient d'envisager une portée thérapeutique à nos résultats. Les patients atteints d'un GBM surexprimant l'EGFR et l'intégrine seraient de bons candidats pour bénéficier d'un schéma thérapeutique personnalisé associant des inhibiteurs des deux récepteurs.

### Axe 2 : Etudier le rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans le trafic intracellulaire de l'EGFR lors de la migration des cellules de GBM soumises aux thérapies ciblant l'EGFR.

Rappelons que nous avons montré par microscopie confocale que le gefitinib induisait une translocation dans le compartiment intracellulaire de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de l'EGFR dans les cellules résistantes au gefitinib (U87  $\alpha 5+$ ).

La littérature a déjà établi un lien entre le trafic intracellulaire de l'EGFR et la réponse des tumeurs solides aux anti-EGFR mais jamais dans le GBM. Dans un modèle de cancer mammaire, il a été montré que MDGI (mammary derived growth inhibitor) induisait l'internalisation de l'EGFR dans des vésicules dépendantes des cavéoles (Nevo *et al.*, 2009). Ces cellules exprimant MDGI étaient résistantes au cetuximab *in vitro* et *in vivo*. Ainsi les auteurs ont mis en évidence un nouveau mécanisme impliquant une augmentation de l'endocytose de l'EGFR permettant d'expliquer les résistances au cetuximab dans le cancer du sein.

Dans des lignées de cancer bronchique non à petites cellules résistantes au gefitinib, l'ajout d'un inhibiteur de tyrosine kinase irréversible a démontré son efficacité pour réduire la prolifération et la survie clonogénique dans ces cellules (Kwak *et al.*, 2005). De plus, les auteurs ont observé une augmentation de l'internalisation de l'EGFR dans les lignées cellulaires résistantes au gefitinib par rapport aux cellules sensibles à l'anti-EGFR. Ces résultats sont confirmés par une étude plus récente qui démontre que la distribution cellulaire de l'EGFR est corrélée avec la réponse au gefitinib dans des cellules de cancer bronchique (Jo *et al.*, 2014). En effet, dans les lignées sensibles au gefitinib, l'addition du TKI freine l'internalisation de l'EGFR induite par l'EGF. En revanche, dans les cellules résistantes au gefitinib, l'endocytose de l'EGFR induite par l'EGF est maintenue.

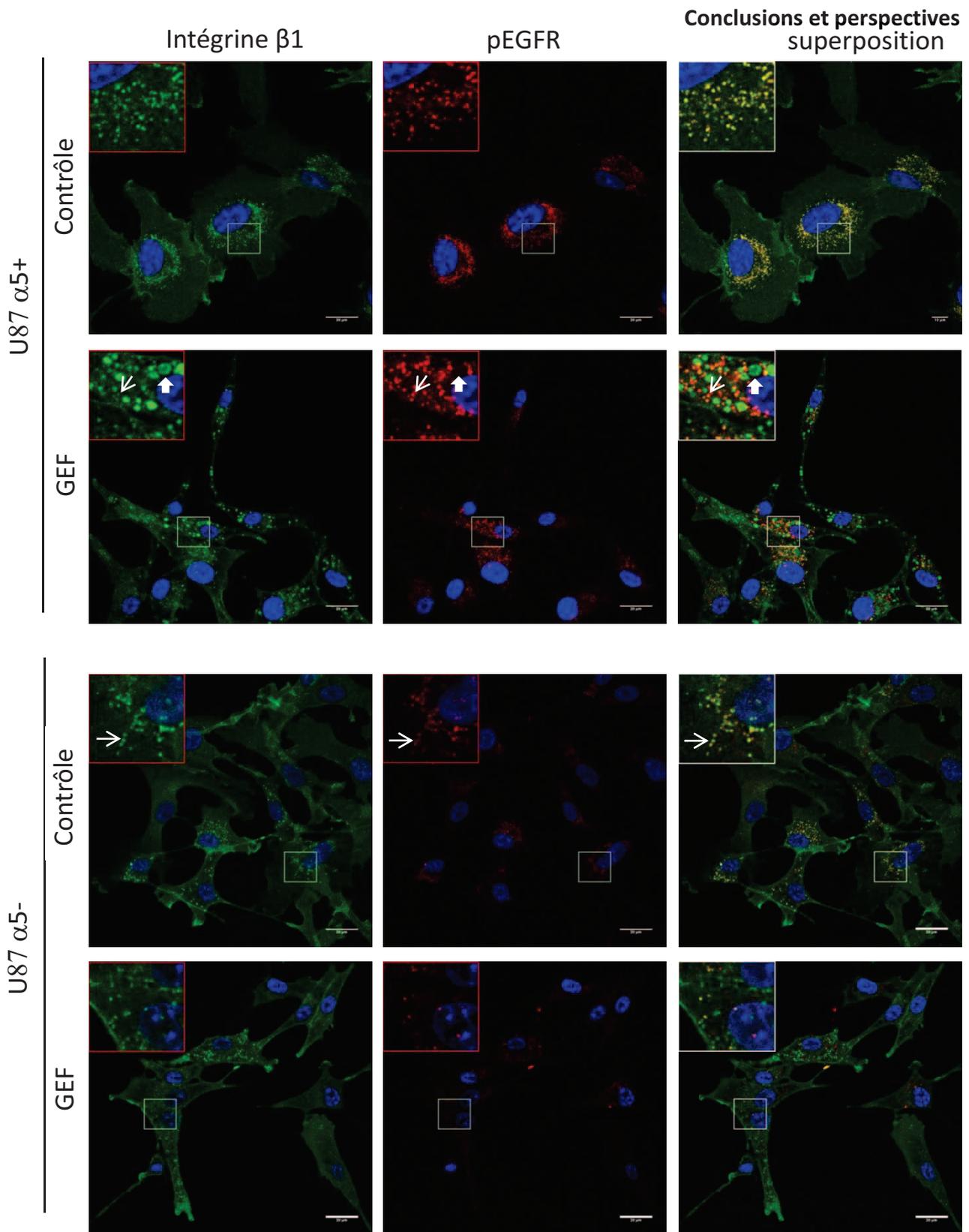
Toutes ces données soulignent un autre mécanisme de résistance aux anti-EGFR médié par une altération du trafic de l'EGFR. Nous nous sommes interrogés sur l'activité de l'EGFR suite à son endocytose dépendante du gefitinib. Si le potentiel signalétique de l'EGFR est maintenu dans le compartiment intracellulaire des cellules U87  $\alpha 5+$ , cela pourrait expliquer la résistance de ces cellules de GBM aux thérapies anti-EGFR.

### - Le devenir de l'EGFR actif dans le compartiment intracellulaire

Pour répondre à cette question, nous avons procédé à une expérience préliminaire de co-marquage de l'intégrine  $\beta 1$  active (un marquage de l'intégrine  $\alpha 5$  serait difficilement observable dans les cellules U87  $\alpha 5^-$ ) et d'une forme phosphorylée active de l'EGFR (Y1068).

Dans les cellules U87  $\alpha 5^+$ , nos résultats soulignent la présence de l'EGFR actif phosphorylé dans des vésicules intracellulaires en présence comme en absence de gefitinib (**Figure 32**). De plus, il existe une forte colocalisation entre  $\beta 1$  et pEGFR (**Figure 32 merge**) au sein des vésicules intracellulaires en présence comme en absence de gefitinib. On notera toutefois que la persistance de cette colocalisation en présence de gefitinib est observée dans les petites vésicules (flèche). D'autres vésicules beaucoup plus grosses ont perdu le double marquage  $\beta 1$ /pEGFR (flèche pleine).

Dans le compartiment intracellulaire des cellules U87  $\alpha 5^-$  contrôles, le marquage de l'EGFR phosphorylé est beaucoup moins visible que dans les cellules U87  $\alpha 5^+$  suggérant que l'intégrine  $\alpha 5$  régule l'internalisation de l'EGFR actif. Comme en témoignent les flèches, on observe également une colocalisation  $\beta 1$ /pEGFR (**Figure 32 merge**) dans des vésicules intracellulaires. Mais l'ajout de gefitinib abolit totalement le marquage de l'EGFR actif dans les vésicules intracellulaires contenant l'intégrine  $\beta 1$  (**Figure 32 merge**). La perte de la colocalisation pEGFR/ $\beta 1$  induite par le gefitinib dans ces cellules U87  $\alpha 5^-$ , confirme que c'est bien l'hétérodimère  $\alpha 5\beta 1$  qui maintient l'activité de l'EGFR dans le compartiment intracellulaire.



**Figure 32: Le gefitinib maintient la coopération de l'EGFR actif et de l'intégrine  $\beta 1$  dans des compartiments intracellulaires lors de la migration des cellules U87 $\alpha 5+$  mais pas lors de la migration des cellules U87 $\alpha 5-$ .** Images confocales des cellules U87  $\alpha 5+$  et U87  $\alpha 5-$  migrant à partir de sphères tumorales (18h) en absence (control) et en présence (GEF) de gefitinib (20 $\mu$ M). Après fixation, les cellules ont été immunomarquées avec des anticorps dirigés contre l'intégrine  $\beta 1$  et l'EGFR actif phosphorylé (Y1068). La superposition des deux images est visualisée sur le panel de droite (merge). Echelle : 20 $\mu$ m.

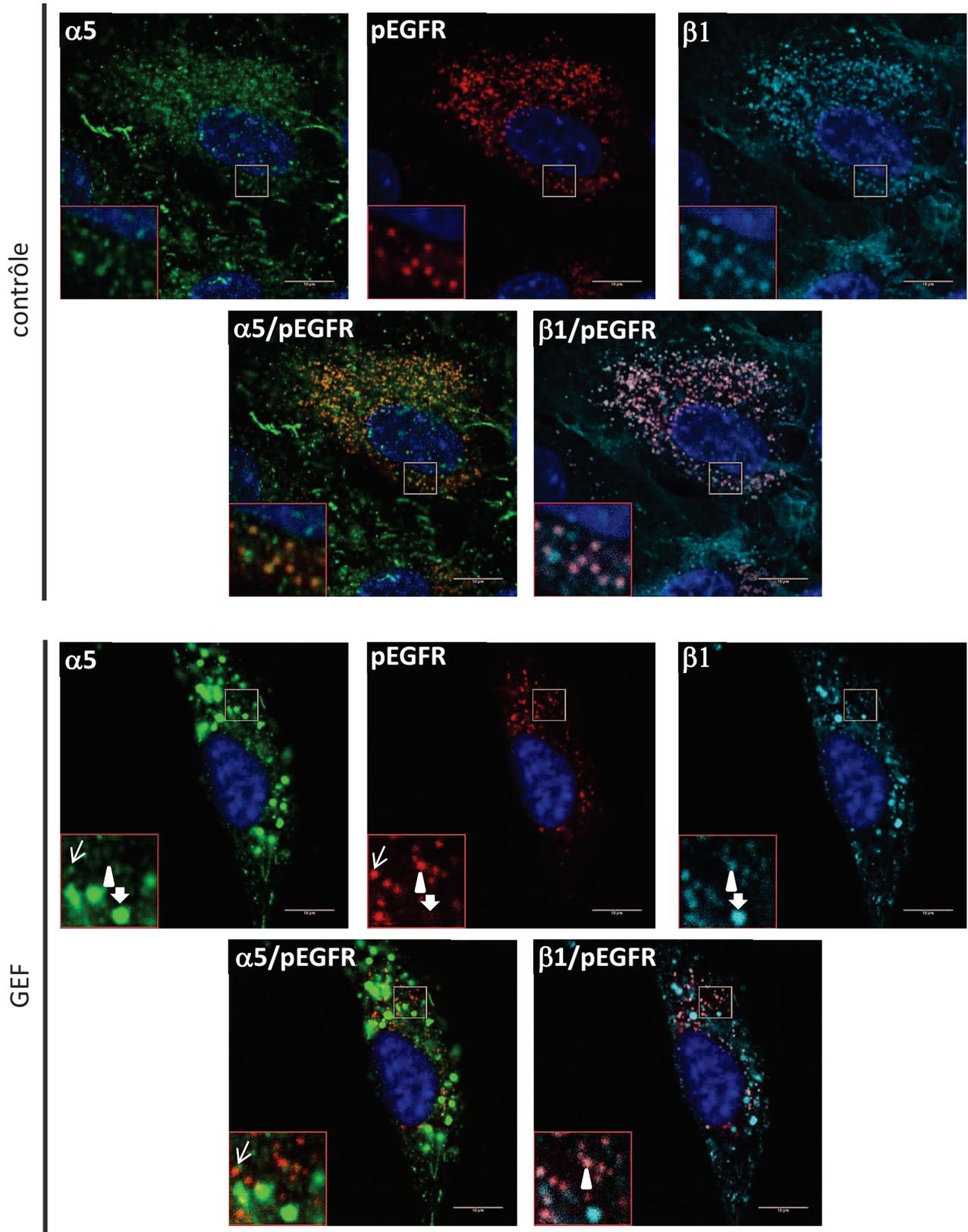
Nous avons confirmé ces résultats par des co-marquages immunofluorescents de l'intégrine  $\alpha 5$  sous sa forme active liée à la fibronectine (anticorps SNAKA-51) et de l'EGFR phosphorylé dans les cellules U87  $\alpha 5+$ . La **figure 33** met en évidence les co-marquages  $\alpha 5\beta 1/pEGFR$  dans de petites vésicules péri-nucléaires en présence comme en absence de gefitinib.

Cependant, à l'ajout de gefitinib, on observe très nettement de grosses vésicules (qui semblent être des compartiments intracellulaires différents de ceux observés en absence de gefitinib) positives pour le marquage  $\alpha 5$  et  $\beta 1$  mais négatives pour le marquage pEGFR (**Figure 33 - flèches pleines**). On observe un co-marquage pEGFR/ $\alpha 5$  uniquement dans de petites vésicules intracellulaires (**Figure 33 - flèches**). Ces petites vésicules sont également positives pour pEGFR et  $\beta 1$  (**Figure 33 - têtes de flèches**) mais on ne semble pas observer de colocalisation  $\alpha 5/\beta 1$  ce qui suggère que dans ces vésicules l'intégrine  $\beta 1$  est liée à d'autres partenaires ou liée à l'intégrine  $\alpha 5$  mais pas dans sa conformation liée à la fibronectine.

Ces résultats très intéressants indiquent un maintien de l'activité signalétique de l'EGFR dans le compartiment intracellulaire des cellules U87  $\alpha 5+$  (malgré l'inhibition pharmacologique de l'EGFR par le gefitinib), alors que le gefitinib est efficace pour supprimer l'activité de l'EGFR (pour le résidu tyrosine testé) dans les vésicules intracellulaires des cellules U87  $\alpha 5-$ .

### - L'impact d'un TKI irréversible : l'afatinib

Nous avons démontré que l'afatinib permettait de lever la résistance au gefitinib des cellules U87  $\alpha 5+$  lors de la migration cellulaire à partir de sphères tumorales. Nous pouvons alors supposer que la migration des cellules U87  $\alpha 5+$  est un phénomène indépendant de l'EGFR puisqu'un TKI sélectif de l'EGFR (gefitinib) n'inhibe pas leur migration alors qu'un TKI ayant une affinité pour tous les membres de la famille ErbB (afatinib) réduit efficacement leur migration. Pour répondre à cette interrogation, nous pourrions tester l'impact d'une thérapie ciblée sélective d'un autre membre de la famille ErbB (tel que l'anticorps monoclonal Trastuzumab, sélectif d'HER-2) sur la migration collective des cellules U87  $\alpha 5+$ .



**Figure 33: Le gefitinib maintient la coopération de l'EGFR actif et de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans des vésicules intracellulaires de petite taille en périphérie du noyau cellulaire.** Images confocales à plus fort grossissement des co-marquages de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de l'EGFR phosphorylé (Y1068) dans des vésicules intracellulaires lors de la migration des cellules U87  $\alpha 5+$  en absence (control) et en présence (GEF) de gefitinib (20 $\mu$ M). Echelle : 20 $\mu$ m.

De plus, nous observons aussi une augmentation de la localisation intracellulaire de l'EGFR dans les cellules résistantes au gefitinib par comparaison aux cellules sensibles au gefitinib. Une des perspectives de ce travail serait d'étudier le trafic intracellulaire de l'EGFR en présence d'afatinib lors de la migration cellulaire à partir des sphères tumorales U87MG. Une diminution de l'internalisation de l'EGFR dans les cellules U87  $\alpha 5+$  sous l'effet de l'afatinib (en comparaison à l'internalisation massive du récepteur dépendante du gefitinib) nous permettrait de confirmer que la résistance aux anti-EGFR dans le GBM est favorisée par une modulation du trafic de l'EGFR par l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .

### - Trafic intracellulaire : endocytose ou recyclage ?

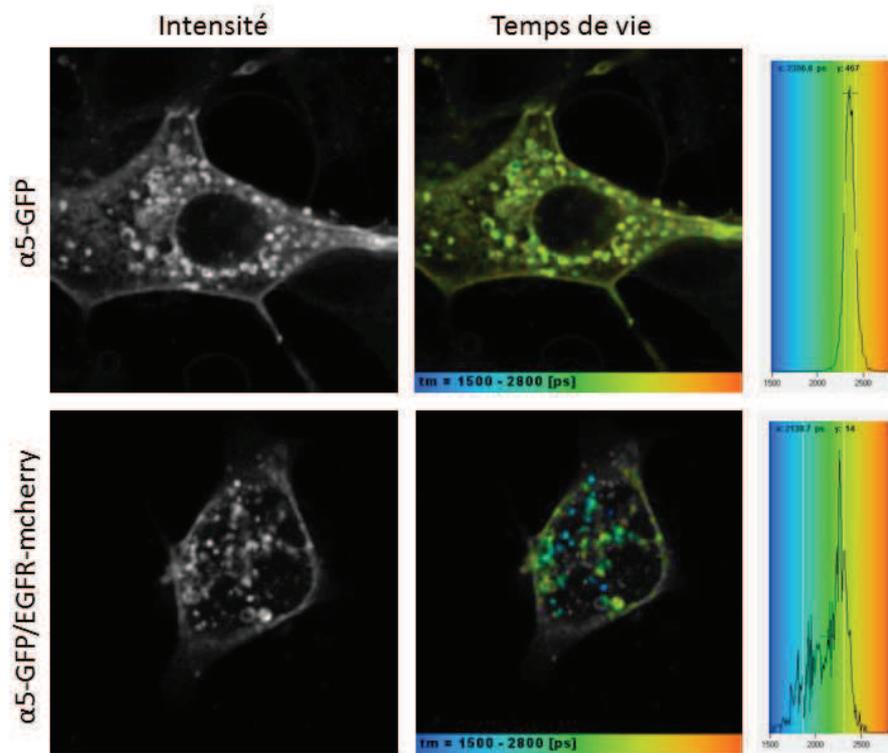
Il nous semble maintenant indispensable d'identifier la nature des vésicules intracellulaires dans lesquelles s'accumulent l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , l'EGFR et pEGFR lors de la migration collective des cellules U87MG en présence ou non de gefitinib. Grâce à la microscopie confocale, nous pourrions discriminer si ce sont les voies d'endocytose ou de recyclage (ou les deux) des intégrines qui sont impliquées dans la résistance aux anti-EGFR. Nous suggérons d'analyser les co-localisations de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de l'EGFR avec des marqueurs classiques des compartiments intracellulaires : EEA1 (early endosome antigen 1) et Rab21 comme marqueur des endosomes précoces, Lamp1 comme marqueur des lysosomes, Rab11 et Rab4 comme marqueur du recyclage membranaire ou la calnexine comme marqueur du réticulum endoplasmique. Selon les résultats de ces expériences, nous pourrions inhiber pharmacologiquement le recyclage des intégrines à l'aide de la primaquine, ou l'endocytose par le dynasore (inhibiteur de la dynamine qui contrôle le recyclage des intégrines). L'utilisation de ces agents pourrait restaurer la sensibilité des cellules U87  $\alpha 5+$  au gefitinib lors de la migration cellulaire à partir de sphères tumorales. Dans un modèle de xénogreffes de cellules de cancer pulmonaire résistantes au gefitinib, une équipe a déjà montré l'effet synergique anti-tumoral de l'association d'un inhibiteur du recyclage de l'EGFR (dynasore) et du gefitinib (Jo et al., 2014).

### Axe 3 : Mettre en évidence l'existence d'un complexe physique $\alpha 5\beta 1$ /EGFR comme marqueur de la résistance des GBM aux thérapies anti-EGFR

La littérature a déjà étudié les interactions moléculaires entre l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et l'EGFR dans certaines tumeurs solides mais cela n'a jamais été démontré dans le GBM. Par des approches biochimiques (co-immunoprécipitation), des auteurs ont montré que l'inhibition de l'intégrine  $\alpha v\beta 3$  par le cilengitide favorisait le recyclage de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de l'EGFR dans un même complexe physique lors la migration cellulaire de carcinome ovarien (*Caswell et al., 2008*). Les résultats de l'axe 2 mettant en évidence une proximité de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de l'EGFR dans des vésicules intracellulaires de cellules de GBM, nous avons soulevé l'hypothèse que ces deux récepteurs pourraient s'associer pour transiter dans le compartiment intracellulaire.

Le FRET (Förster Resonance Energy Transfer) permet de mesurer des variations d'intensité de fluorescence entre deux fluorophores (donneur et accepteur) couplés aux deux protéines d'intérêt. Le FRET peut être analysé précisément par FLIM (Fluorescence Lifetime imaging microscopy) qui consiste à mesurer le déclin de temps de vie de fluorescence du donneur au cours du temps. Plus le transfert d'énergie entre les deux protéines est important et plus le déclin de fluorescence du donneur sera rapide. Ce transfert d'énergie n'étant possible que si la proximité entre les deux récepteurs est inférieure à 10nm (*Broussard et al., 2013*), le FRET est une technique de choix pour étudier les interactions moléculaires et la formation de complexes homo- ou hétérodimériques dans les cellules.

Afin de mettre en évidence l'existence d'un complexe moléculaire  $\alpha 5\beta 1$ /EGFR dans les cellules de GBM, nous avons initié des expériences préliminaires de FRET par mesure du temps de vie au sein de cellules transfectées avec  $\alpha 5$ -GFP (donneur) et EGFR-mcherry (accepteur).



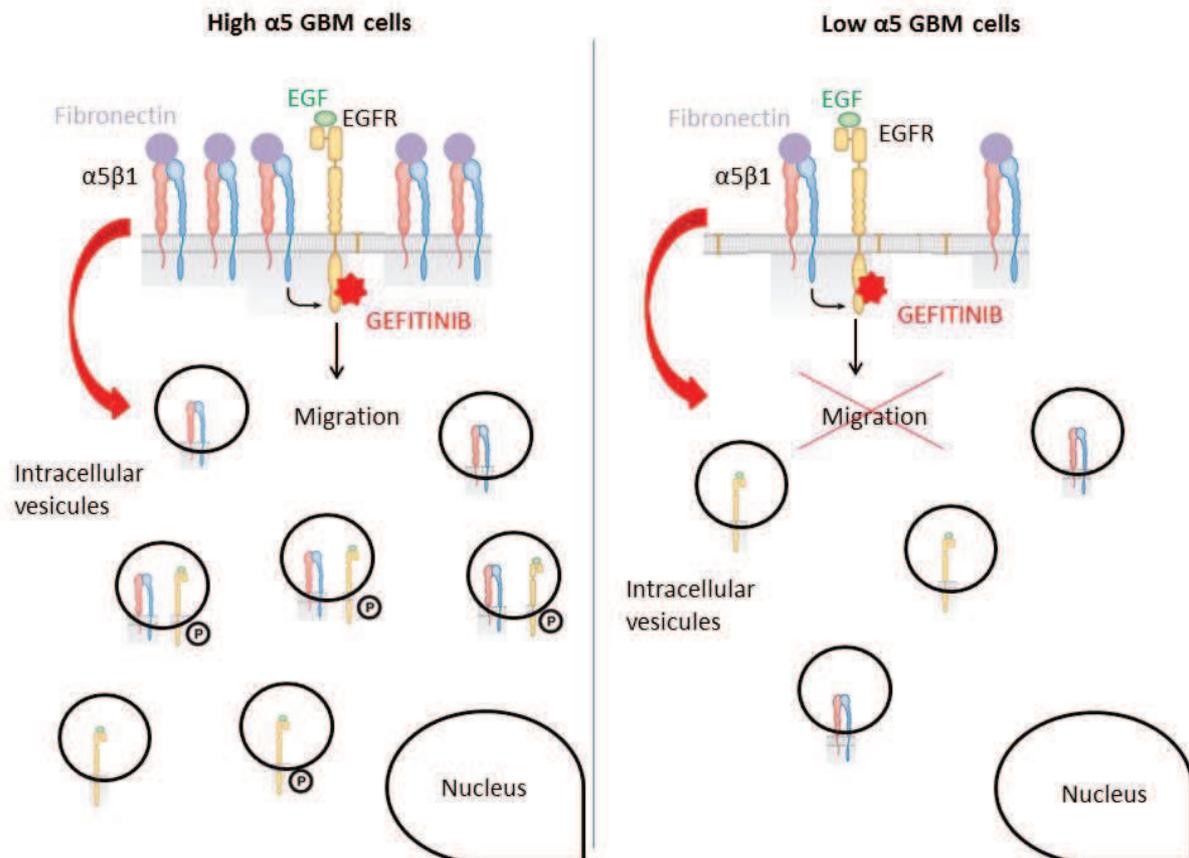
**Figure 34: Existence d'un complexe  $\alpha 5$ /EGFR dans des compartiments intracellulaires des cellules U87MG.**

Images de FRET-FLIM montrant la mesure de temps de vie de la GFP fusionnée à l'intégrine  $\alpha 5$  dans des cellules U87MG exprimant l'intégrine  $\alpha 5$ -GFP ou l'intégrine  $\alpha 5$ -GFP et l'EGFR couplé au fluorochrome mcherry. La présence de l'EGFR-mcherry à proximité de l' $\alpha 5$ -GFP entraîne une diminution du temps de vie de la GFP dans des vésicules intracellulaires (pixels bleus).

Les premières expériences confirment nos résultats de co-marquages de l'intégrine et de l'EGFR dans des vésicules intracellulaires puisque nous montrons la présence de complexes  $\alpha 5\beta 1$ /EGFR dans des vésicules intracellulaires (**Figure 34**). En effet, la diminution de la moyenne de temps de vie de la GFP à la surface globale de la cellule (2,356 à 2,138 nanosecondes) reflète un transfert d'énergie entre l'intégrine et l'EGFR suggérant que les deux récepteurs sont distants de moins de 10nm. Cet effet de FRET est particulièrement marqué dans les vésicules intracellulaires puisque dans ces compartiments, le temps de vie de la GFP est passé de 2,400nsec (index colorimétrique vert-jaune) à 1,500nsec (index colorimétrique bleu).

Bien que ces résultats soient encourageants, cette technique limite nos travaux à l'étude de la formation du complexe  $\alpha 5\beta 1$ /EGFR *in vitro* sur cellules vivantes. Nous avons débuté une collaboration avec le Dr. Vereb (Université de Debrecen-Hongrie) en vue de développer une technique d'imagerie quantitative basée sur une approche de FRET par photoblanchiment, mais utilisant des anticorps couplés à des fluorochromes dirigés contre l'intégrine et l'EGFR. Le groupe du Dr. Vereb a identifié, grâce à cette technique, un complexe  $\beta 1$ /EGFR dans des lignées cellulaires de GBM et dans des échantillons tumoraux provenant de patients atteints de gliomes (*Petrás et al., 2013*). Le taux de formation du complexe est augmenté dans les astrocytomes de grade IV (GBM) et constitue un facteur de mauvais pronostic. Cette technique est particulièrement intéressante puisqu'elle nous permettrait d'étudier l'expression du complexe  $\alpha 5\beta 1$ /EGFR sur des biopsies tumorales provenant de xénogreffes de souris. Nous pourrions analyser l'impact des antagonistes de l'intégrine sur la formation du complexe ce qui nous permettra d'établir s'il y a une relation entre le taux d'expression du complexe et la résistance aux anti-EGFR.

A plus long terme, nous pouvons également imaginer translater cette étude sur des prélèvements cliniques de patients atteints de gliomes et réfractaires aux thérapies ciblées. Nous pourrions ainsi proposer l'existence du complexe  $\alpha 5\beta 1$ /EGFR comme marqueur prédictif de la résistance aux thérapies anti-EGFR chez le patient.



**Figure 35: Modèle proposé des mécanismes moléculaires pouvant expliquer le rôle de l'intégrine  $\alpha5\beta1$  dans la résistance des cellules U87MG aux anti-EGFR.**

Dans les cellules exprimant l'intégrine  $\alpha5$  (**panel de gauche**), l'inhibition de l'EGFR par le gefitinib ne permet pas de freiner la migration cellulaire activée par l'EGFR. D'autre part, le gefitinib induit une endocytose conjointe de l'intégrine  $\alpha5\beta1$  et de l'EGFR. L'EGFR demeure actif (phosphorylé Y1068) dans le compartiment intracellulaire et peut ainsi probablement poursuivre l'activation des voies de signalisation de la migration cellulaire. Dans les cellules possédant peu l'intégrine  $\alpha5$  (**panel de droite**), la migration cellulaire est diminuée sous l'effet du gefitinib. De plus, le gefitinib n'induit qu'une modeste endocytose de l'intégrine et de l'EGFR. Le récepteur internalisé n'est plus phosphorylé et ne peut potentiellement plus maintenir l'activation de la migration cellulaire.

### En résumé,

Ces travaux de thèse nous ont permis de définir un nouveau mode de résistance des cellules de GBM aux thérapies anti-EGFR. L'expression de l'intégrine bloque l'activité anti-migratoire du gefitinib par le maintien de l'activité oncogénique de l'EGFR dans le compartiment intracellulaire (Figure 35). Ces découvertes démontrent comment l'expression d'une seule intégrine peut favoriser la progression tumorale et la résistance aux thérapies

## ***RÉSULTATS PARTIE 2 : ARTICLE***

---

*Modélisation in vitro du rôle de l'intégrine  $\alpha5\beta1$   
dans le potentiel invasif du glioblastome*

---

## Article: “Glioma sphere evasion model revealed a dual function for $\alpha5$ integrin”

### Introduction

Nous avons mis en place un modèle d'étude in vitro de l'évasion cellulaire à partir d'une sphère tumorale qui puisse mimer au mieux la tumeur in situ et nous permettre d'explorer la biologie de la tumeur ou d'évaluer des réponses pharmacologiques. L'utilisation de ce modèle nous a ainsi permis de mieux appréhender les relations entre l'intégrine  $\alpha5\beta1$  et l'EGFR notamment durant la dissémination cellulaire. Nous avons ainsi pu étudier le rôle de l'intégrine  $\alpha5\beta1$  sur l'efficacité de différents inhibiteurs pharmacologiques de l'EGFR lors de la migration des cellules de GBM, et proposer une hypothèse décrivant les mécanismes intracellulaires pouvant se mettre en place lors de la résistance des GBM aux thérapies ciblant l'EGFR.

Un des avantages des sphéroïdes tumoraux est de préserver les jonctions intercellulaires lors de l'agrégation des cellules pour former la sphère (Bjerkvig et al., 1990). C'est donc un excellent modèle pour étudier les interactions cellule-cellule et cellule-substrat lors de la création d'une tumeur in vitro. De nombreuses études ont alors abordé le rôle des protéines matricielles et de leurs récepteurs les intégrines, lors de l'invasion tumorale dans le contexte clinique des tumeurs cérébrales.

Mais l'utilisation de ce modèle a soulevé des questions dans la littérature. En effet, il a été mis en évidence des fonctions contradictoires du couple  $\alpha5\beta1$ /fibronectine qui, dans certaines études, favoriserait la stabilisation des interactions cellule-cellule et ainsi la cohésion cellulaire au sein de la sphère (Robinson et al., 2003; Sabari et al., 2011) et dans d'autres études, contribuerait à la dispersion des cellules tumorales (Janouskova et al., 2012; Ray et al., 2014; Serres et al., 2014).

Ainsi, tout l'objet de cette partie de mon travail de thèse, résumé dans l'article suivant, était de clarifier ce rôle bivalent de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans la lignée cellulaire U87 de GBM. L'inhibition pharmacologique (à l'aide d'anticorps inhibiteurs) ou génétique par shRNA (U87  $\alpha 5$ -) de l'intégrine  $\alpha 5$  nous a permis de souligner son rôle central dans la formation des sphères de GBM. L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est nécessaire à l'assemblage des fibrilles de fibronectine (fibrillogénèse) dans la sphère tumorale de GBM et favorise ainsi la cohésion intercellulaire.

Nous avons ensuite testé l'hypothèse selon laquelle la teneur en fibronectine dans le microenvironnement tumoral pourrait influencer l'agrégation cellulaire au sein des sphéroïdes de GBM. Nos résultats ont montré que la dissémination des cellules de GBM sur un substrat non matriciel était indépendante de l'intégrine  $\alpha 5$  mais dépendante de l'intégrine  $\alpha v$ . En revanche, l'ajout d'une matrice de fibronectine augmente fortement la dissémination des cellules U87  $\alpha 5+$  de la sphère. Ces résultats suggèrent que selon la concentration en fibronectine disponible, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  pourra soit, favoriser les interactions cellule-cellule et ainsi la cohésion de la masse tumorale, soit favoriser les adhésions cellule-matrice et ainsi l'échappement des cellules de GBM.

Nous avons ensuite souhaité examiner les différentes structures cellulaires qui permettaient à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  de remplir ces deux fonctions opposées. Utilisant notre modèle de sphères tumorales U87MG, nos résultats montrent que les jonctions cellule-cellule au sein de la sphère sont caractérisées par la présence de marquages fibrillaires d'  $\alpha 5$  semblables aux fibrilles de fibronectine. En revanche, au cours de la migration cellulaire, on observe d'une part, un remodelage des fibrilles de fibronectine qui ne sont plus visibles et d'autre part, une apparition progressive des contacts focaux riches en  $\alpha 5$ , dont la nature est soulignée par la présence de la protéine FAK activée, marqueur des adhésions focales.

Le développement de ce modèle d'étude in vitro de la dispersion des cellules tumorales nous a permis de mieux aborder la complexité du rôle de l'intégrine  $\alpha 5$  et de la fibronectine dans le GBM. Ainsi, nos résultats mettent en évidence une évolution du rôle et de l'activité d' $\alpha 5$  qui semble à la fois pro- et anti- tumorale au cours de la dissémination de cellules de GBM à partir d'une sphère.

## Glioma sphere evasion model revealed a dual function for $\alpha 5$ integrin

Anne-Florence BLANDIN, Guillaume RENNER, Laurence CHOULIER, Romain VAUCHELLES, Philippe RONDE, Fanny NOULET, Nelly ETIENNE-SELLOUM, Gyorgy VEREB<sup>1</sup> Isabelle LELONG-REBEL, Sophie MARTIN, Monique DONTENWILL and Maxime LEHMANN\*

UMR7213 CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France

Affiliation : UMR 7213 CNRS, LBP, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie,

1 : Dept. of Biophysics and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Hungary

\* **Corresponding author:** Pr Maxime Lehmann, UMR 7213 CNRS, LBP, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France. Tel. (0033)368854267; Fax (0033)368854313; Email: [Maxime.lehmann@unistra.fr](mailto:Maxime.lehmann@unistra.fr)

### Abstract:

$\alpha 5$  integrin is pertinent therapeutic target in glioblastoma multiforme, the most common and most aggressive primary brain tumor. Involvement of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in glioma adhesion and invasion has been studied in 2D culture system. Here, we investigated the role of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in glioma spheroid formation and cell dispersion from the spheroid, a 3D culture system that integrates cell-cell and cell-substratum interaction. We used function blocking antibodies and shRNA-mediated depletion to confirm the role of  $\alpha 5$  in cell-cell adhesion and spheroid formation. In the absence of fibronectin in the spheroid microenvironment, glioma cell dispersion was compromised by  $\alpha 5$  integrin expression and function. The presence of fibronectin in the substratum restored  $\alpha 5$ -dependent evasion and migration. Confocal microscopy showed that glioma cells emerged as multilayer of cells linked by 3D-fibrillar adhesion, made of assembled fibronectin and activated  $\alpha 5$  integrin. 3D-fibrillar adhesions were dismantled in region of weak cell-cell interaction while cells migrate away from the sphere. Moreover, we showed that activated focal adhesion kinase (FAK-pY397) was not localized in 3D-fibrillar adhesion and that focal contacts, characterized by the presence of activated  $\alpha 5$  integrin and FAK-pY397, were progressively formed as a function of the migratory distance from the spheroid. Taken together, our data indicate that  $\alpha 5$  integrin

may have dual function in GBM depending of its engagement in cell-cell or cell-substratum adhesion. These  $\alpha 5$  adhesions opposed to each other in the regulation of cell dispersion from tumor spheroid. As GBM contain high density of fibronectin,  $\alpha 5$  integrin is most likely stimulating glioma cell dissemination from the tumor mass. In this respect,  $\alpha 5$ -integrin antagonists may be useful to limit GBM invasion in brain parenchyma.

## Introduction

Glioblastoma multiform (GBM, grade IV astrocytoma) is the most frequent and most aggressive brain cancer. Despite surgical resection, radiotherapy and concomitant chemotherapy, median survival for patient with high grade glioma does not exceed 15 months. GBM is characterized by a diffuse infiltration of the brain tissue by tumor cells. This highly invasive phenotype prevents complete surgical resection, limits the efficiency of radiotherapy and is a critical prognostic factor for primary brain tumors. Therefore, the establishment of efficient therapies requires a better understanding of the infiltrative behavior of glioma cells and the development of new strategies targeting cell invasion (Vehlow and Cordes, 2013). In a murine syngeneic model, glioma cells individually infiltrate brain tissue either by migrating along the blood vessels or by invading the parenchymal tissue (Hirata et al., 2012). Invasion is modulated by regional expression of extracellular matrix (ECM) molecules that can facilitate or impair glioma cell migration and invasion (Bellail et al., 2004; Silver et al., 2013). Some ECM proteins are overexpressed in human brain tumors and their upregulation correlates with disease progression and worse prognosis. Comparison of gene expression in invasive GBM versus non-invasive pilocytic astrocytoma using suppressive hybridization identified fibronectin (FN) as one of the most overexpressed gene in GBM (Lal et al., 1999). FN accumulates around neovasculature (Castellani et al., 2002; Mahesparan et al., 2003) and into tumor ECM (Serres et al., 2014; Ohnishi et al., 1998; Yuan et al., 2007). FN supports tumor growth (Sengupta et al., 2010) and is unequivocally capable of mediating glioma cell motility and promoting invasion (Ohnishi et al., 1997, 1998; Serres et al., 2014).

As primary receptors involved in cell–matrix adhesion, integrins bidirectionally link the ECM with the intracellular signaling network. They profoundly impact on tumor cell proliferation, survival and invasion, and trigger resistance to radio and chemotherapy (Desgrosellier and Cheresh, 2010). In human brain, the FN receptor,  $\alpha 5\beta 1$  integrin, is

expressed at significantly higher level in GBM than in adjacent normal tissue suggesting that it might play a role in glioma development or progression (Gingras et al., 1995). We (Cosset et al., 2012; Janouskova et al., 2012a) and others (Holmes et al., 2012) recently confirmed these data in larger cohorts of patients and showed that a high expression of  $\alpha 5\beta 1$  integrin is associated with a worse prognosis for patients with glioma. Preclinical data support the ability of  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists to disrupt integrin signaling pathways leading to inhibition of angiogenesis and/or tumor growth but also to sensitization towards therapies (Schaffner et al., 2013). Depletion of  $\alpha 5$  integrin increased p53 activity and sensitized cells to chemotherapeutic agents (Janouskova et al., 2012a), moreover  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists facilitated chemotherapy-induced apoptosis in human glioma cells (Martinkova et al., 2010). Collectively, these data establish  $\alpha 5\beta 1$  integrin as a promising target in GBM.

Integrin expression is elevated in GBM tumors samples concomitantly with the upregulation of pro-invasive ECM proteins and numerous studies support the role of integrin in GBM invasion. (Vehlow and Cordes, 2013). In human GBM,  $\alpha 5\beta 1$  integrin is expressed in cells surrounding FN-rich perivascular regions (Riemenschneider et al., 2005) and is associated with glioma cell invasiveness (. The transcription factor ETS-1 controls  $\alpha 5$  integrin subunit at the mRNA level to promote glioma cell line migration on FN (Kita et al., 2001). Using single cell tracking assays, we showed that expression of  $\alpha 5$  integrin in U87MG cells increased cell migration speed (Ray et al., 2014). In addition, the importance of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in glioma cell migration and invasion was confirmed by the use of specific non-peptidic antagonists of  $\alpha 5\beta 1$  integrin (Ray et al., 2014 ; Martin et al., 2009). Altogether, the data strongly argue in favor of a critical role of  $\alpha 5\beta 1$  integrin and fibronectin in glioma cell migration and invasion. However, several reports showed that FN fibrillogenesis (self-assembly of FN) mediates strong cell/cell cohesion in various tissue (Robinson et al., 2004; Singh and Schwarzbauer, 2014) including glioma cells (Sabari et al., 2011; Serres et al., 2014). Conflicting data emerged from these 2 later studies. One study indicated that FN-mediated U87 cell cohesion may impair the first step of cancer cell invasion by suppression of cell dispersion (Sabari et al., 2011), while the other demonstrated that loss of FN expression impaired U87 invasion (Serres et al., 2014). Finally,  $\alpha 5\beta 1$  has been implicated in FN-dependent cell clustering in fibroblasts and epithelial cells (Robinson et al., 2003; Robinson et al., 2004; da Rocha-Azevedo et al., 2013). This observation point out for a potential anti-

invasive role for  $\alpha 5\beta 1$  and cell-mediated FN assembly. This may raise an important issue concerning the development of anti-invasive therapeutic strategies that target  $\alpha 5\beta 1$  integrin.

To clarify this ambiguity, we compared cell dispersion from glioma spheroid in function of  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression level. We first confirmed that  $\alpha 5$  integrin plays an important role in cell-cell cohesion.  $\alpha 5$  integrin-mediated cell-cell adhesion limit cell evasion in the absence of FN in the tumor sphere micro-environment. However, addition of exogenous FN restore the pro-invasive function of  $\alpha 5$  integrin. Using confocal microscopy and image quantification, we showed that in promoting cell-cell adhesion, ligand-occupied  $\alpha 5$  integrins decorated plasma membrane in a fibrillary pattern, stimulated FN fibrillogenesis, and was not associated with pFAK-tyr397. As cells moved away from the spheroids,  $\alpha 5$  became strictly engaged in cell-substratum adhesion sites, where it progressively recruited and activated pFAK-tyr397. We thus highlighted in glioma cells the existence of a 3D-fibrillar adhesion in which  $\alpha 5$  integrin promote cell-cell adhesion and illustrated the dynamic change in  $\alpha 5$  integrin adhesion during glioma cell migration from a tumor sphere. Importantly, we showed that glioma cell invasion is regulated by the balance between cell-cell and cell-ECM mediated by  $\alpha 5$  integrin.

## Results

### $\alpha 5$ Integrin and FN are involved in U87MG cell cohesion

Multicellular tumor spheroid is an in vitro model used in numerous studies to mimic micro-tumors (Hirschhaeuser et al., 2010). FN assembly can promotes cell adhesion and foster spheroid formation in various cell types (Jia et al., 2012; Salmenperä et al., 2008) including U87MG glioma cells (Serres et al., 2014; Sabari et al., 2011). In CHO cells, this process involves the  $\alpha 5\beta 1$  integrin (Robinson, 2004, Robinson, 2002). Using U87MG cells expressing high (U87 $\alpha 5+$ ) and low (U87 $\alpha 5-$ ) level of  $\alpha 5$  integrin (Ray et al., 2014), we first aimed to confirm the involvement of the this integrin in spheroid formation. To this end, we compared the multicellular organization of U87MG expressing different levels of integrin. Under conventional culture condition, U87 $\alpha 5+$  cells spontaneously formed spheroid-like domes upon reaching high density; by contrast, stable depletion of  $\alpha 5$  integrin impaired this multicellular organization (figure 1A). During 4 days of culture,  $\alpha 5$  expression had little impact on cell proliferation (figure 1B), thus the absence of spheroids in U87 $\alpha 5-$  cell culture

is not due to decreased cell density. We next challenged U87 $\alpha$ 5+ and U87 $\alpha$ 5- cells in spheroid formation assay using the hanging-drop method. We monitored the kinetics of spheroid formation to assess the role of  $\alpha$ 5 integrin in cell aggregation and tissue compaction. Quantitative imaging using phase-contrast microscopy allowed us to monitor spheroid area and spherical form (roundness) (figure 1C). As shown in Figure 1C, cell aggregates were formed after 6 hours of incubation and were not dependent on  $\alpha$ 5 expression level. Over the next 24 hours, U87 $\alpha$ 5+ cells increased their compaction and adopted a regular circular shape.  $\alpha$ 5 depletion delayed cell compaction and spheroid formation. The central role of  $\alpha$ 5 integrin in U87 spheroid formation was further confirmed by its antibody-mediated inhibition (figure 1D). Finally, confocal microscopy was used to reveal the distribution of  $\alpha$ 5 integrin,  $\beta$ 1 integrin and FN on 2-day-old spheroids. For staining  $\alpha$ 5 integrin, we used a monoclonal antibody (clone Snaka51) that recognizes a LIBS (ligand-induced binding site) epitope on the cal $\alpha$ 1/cal $\alpha$ 2 domain of  $\alpha$ 5 integrin and that is a reporter of  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin activation and its binding to FN (Clark et al., 2005). Confocal images of U87 $\alpha$ 5+ spheroids clearly show the localization of the ligand-occupied  $\alpha$ 5 integrin at the cell/cell contact and in vesicular-like intracellular structures (figure 2). Low-level  $\alpha$ 5 expressing cells present a faint staining, with some remaining cell surface labelling in only a fraction of the cells. Anti- $\beta$ 1 integrin antibody stained the cell membrane similarly in both cell lines. FN labelling revealed a dense fibrillar network of assembled FN between U87 $\alpha$ 5+ cells. In U87 $\alpha$ 5- spheroids, FN was mostly intracellular and FN fibrillogenesis was hardly observed, showing that FN fibrils were assembled in U87 spheroid by the  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin dimer. Thus, consistent with previous published data (Serres et al., 2014; Robinson et al., 2003; Robinson et al., 2004; Jia et al., 2012), our results support the model in which  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin mediates FN fibrillogenesis in tumor sphere to promote cell-cell adhesion via  $\alpha$ 5 $\beta$ 1/FN-mediated bridges.

### **Balance between $\alpha$ 5-mediated cell-cell vs cell-substratum adhesion directs U87 evasion**

FN-mediated cell/cell cohesion has been associated with a decrease in cell dispersion from prostate tumor spheroids, suggesting that  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 may have anti-invasive function (Sabari et al., 2011). We thus examined the effect of  $\alpha$ 5 integrin expression on cell dispersion and collective migration of glioma cells by plating U87 spheroids on a 2D substratum. In a first set of experiments, U87 spheroids were deposited onto poly-L-Lysine coated plates. Evading

cells were detected using wide-field fluorescent microscopy of DAPI-labelled nuclei and counted using image analysis software to assess cell evasion. In parallel, the extent of cell migration was determined by measuring the distance between each nucleus and the spheroid. Phase contrast images (Figure 3A) and image analysis show that  $\alpha 5$  integrin depletion significantly increased the number of evading cells (Figure 3B) and had no effect on the mean distance of migration (Figure 3C). Functional inhibition of  $\alpha 5$  integrin increased cell evasion, further demonstrating the central role of  $\alpha 5$  integrin in cell-cell cohesion. However, cell motility, as judged from the migration distance, was not affected by anti- $\alpha 5$  antibody, indicating an  $\alpha 5$ -independent migration on poly-L-lys. Inhibition of  $\alpha v$  integrin suppressed U87 cell evasion and migration in all experimental conditions. Since  $\alpha v$  inhibition had no impact on spheroid formation (Figure 1C), these data suggested that migration on poly-L-lys was  $\alpha v$ -dependent. Taken together, these data are in line with those from Sabari et al., 2011, suggesting that  $\alpha 5$  integrin/FN mediated cell-cell adhesion may impede cell dispersion from tumor mass.

However, such results would be in conflict with the well-described pro-invasive function of  $\alpha 5$  integrin. This ambiguity may be resolved by taking into account that cell dispersion from multicellular aggregates is regulated by opposing forces produced by cell-cell adhesion and ECM mediated cell migration (da Rocha-Azevedo et al., 2013; Ryan et al., 2001). In such a case, the presence of FN at high concentration in the spheroid microenvironment would challenge FN-mediated cell-cell adhesion in the spheroid. To test this hypothesis, we examined cell dispersion of U87 spheres plated on substratum coated with increasing amounts of FN (Figure 4). Phase-contrast images (Figure 4A) and image quantification (Figure 4B and 4C) show that tumor sphere spreading of U87 $\alpha 5^+$  cells is dependent on FN concentration. By contrast, evasion and migration of U87 $\alpha 5^-$  cells is not stimulated by the presence of FN in spheroid microenvironment. U87 $\alpha 5^+$  cell evasion and migration were strongly inhibited by function-blocking antibodies targeting  $\alpha 5$  and  $\beta 1$ , but not by anti- $\alpha v$  antibody. (Figure 4D, left panels). Using the same approach, we showed that U87 $\alpha 5^-$  cells evasion is mainly dependent on  $\alpha v$  integrin and to a less extent on  $\alpha 5\beta 1$  integrin (Figure 4D, upper right panel). However, U87 $\alpha 5^-$  migration on FN substratum is  $\alpha v$  integrin dependent as shown by the decrease of the distance of migration induced by anti- $\alpha v$  antibody (Figure 4D, lower right panel). Altogether, these experiments highlight that change in FN

concentration in the tumor sphere microenvironment regulates the balance between  $\alpha 5$  integrin-mediated cell-cell vs cell-substratum adhesion, and as a consequence, U87 cell dispersion.

### **Remodeling of $\alpha 5$ integrin adhesion during cell evasion from spheroid**

During their dispersion from tumor spheroids, U87 cells emerged as a multicellular layer and maintained strong cell-cell interactions in a 3D environment. As they moved away from the spheroid, they attached to FN substratum and migrated as a cell monolayer on 2D environment, progressively losing their contact with their neighbors. This may require dynamic reorganization of  $\alpha 5$  adhesion sites to shift from 3D cell-cell to 2D cell-substratum adhesion. To gain insight into this process, we compared, by confocal microscopy, the distribution of FN-occupied  $\alpha 5$  integrin and its ligand in 3 different zones of astrocytoma cells migrating away from a tumor sphere.

In the first series of images (figure 5A), focal planes were selected at a distance of  $5\mu\text{m}$  above the coverslips at the margin of the spheroid (indicated by the dashes line in the figures), allowing us to examine protein localization at cell-cell contacts. As U87 $\alpha 5+$  cells emerged from the spheroid, ligand-occupied  $\alpha 5$  was distributed as thin and long fibrils surrounding the cell body. Moreover, a dense fibrillary network of assembled FN was clearly visible.  $\alpha 5$ -depleted glioma cells evaded from the spheroid without forming any FN network, however intracellular FN could be intracellularly detected in some cells (Figure 5A). These observations indicated that, in evading cells, 3D-fibrillar adhesion formed by  $\alpha 5$  integrin cluster was involved in cell-cell interaction and FN fibrillogenesis. To examine the organization of  $\alpha 5$  integrin and of its ligand at the cell-substratum level, a second series of confocal images was taken on the same microscopic field, but at a focal plane corresponding to the cell-substratum interface (Figure 5B). Matrix-bound  $\alpha 5$  integrin exhibited a pattern clearly distinguishable to that of 3D-fibrillar adhesions. The integrin was distributed in thin dots with some elongated labelling resembling small fibrils (arrow heads). These integrin adhesion sites were morphologically distinct from classical focal adhesions (FAs, Figure 5C). The presence of thin and short FN fibrils (arrow heads) indicated a strong decrease in fibrillogenesis at the substratum level. In our experimental settings, FN used for coating the substratum was also immunodetected. We observed an important remodeling of the coated

FN as evidenced by decreased immunoreactivity under the spheroid and under the evading cells. In U87 $\alpha$ 5- cells, coated-FN remodeling was a lot less intense, and FN assembly was further decreased. Finally, we examined integrin and FN distribution in cells that migrated away from the sphere in 2D environment (Figure 5C).  $\alpha$ 5 was regrouped in classical focal contacts (FAs, arrows) that were not observed in cells closer to the spheroid (Figure 5B).  $\alpha$ 5 was also present in some classical fibrillar adhesions in the more central part of the cells (arrow head). In cells that have migrated at distance from the spheroid,  $\alpha$ 5 integrin expression lead to an intense remodeling of substrate coated FN. This remodeling not only delineated FAs (arrows) and fibrillar adhesions (arrow head) but was also markedly pronounced beneath the nuclei (Figure 5C). We observed that, these cells have lost most of their contact with their neighbor and that FN fibrils have also mostly disappeared. Together, these experiments show important changes in  $\alpha$ 5 integrin distribution and FN remodeling during cell evasion and migration from glioma spheroids. FN fibrillogenesis and fibril-like distribution of  $\alpha$ 5 was a hallmark of 3D-fibrillar adhesion, a  $\alpha$ 5-mediated cell-cell adhesion in regions of high cell density.

### **$\alpha$ 5 integrin does not recruit pFAK-tyr397 at cell-cell adhesion site**

The cytoplasmic domain of integrins is connected to the cytoskeleton and signaling molecules constituting a signaling network called adhesome. The  $\alpha$ 5 integrin distribution remodeling during glioma cell evasion from spheroids may reflect dynamics modification of its adhesome composition and signaling activity. The non-receptor tyrosine kinase FAK (focal adhesion kinase) is an essential marker of the focal adhesion. FAK is phosphorylated on tyr397 upon its recruitment by integrin (Hamadi et al., 2005). To gain further insight into  $\alpha$ 5 adhesome dynamics during U87 $\alpha$ 5+ cells evasion, we examined by confocal microscopy  $\alpha$ 5 and pFAK-tyr397 colocalisation. Surprisingly, in 3D-fibrillar adhesion, pFAK-tyr397 was distributed as punctate intracellular clusters (Figure 6A). According to the image quantification (Figure 6D), these clusters were of smaller size than the classical FAs (Figure 6C) and they did not colocalize with FN-bound  $\alpha$ 5 integrin (Figure 6E). We confirmed these observation on suspended spheroids, (Supplementary data Figure 1). At the substratum level of glioma cells close to spheroids (Figure 6B), pFAK-tyr397 was also found in small punctate cluster (Figure 6D) that did not colocalize with  $\alpha$ 5 integrin and (Figure 6E). Classical labelling of FAs and strong colocalisation between  $\alpha$ 5 integrin and pFAK-tyr397 were easily observed

in cells that had migrated to long distances from the tumor sphere (Figure 6C arrow heads and Figure 6E).  $\alpha 5$  integrin was also detected thin classical fibrillar adhesions characterized by the absence of pFAK-tyr397. (Figure 6C, arrows). We further examined the reorganization of integrin  $\alpha 5$  adhesions at the substratum level using total internal reflection microscopy (TIRF). Dual color wide field TIRF experiments confirmed the presence of a punctate pFAK-tyr397 staining in cells localized beneath and in close proximity of the spheroid, suggesting that they are not able to assemble mature FAs. Integrin  $\alpha 5$  did not colocalize with these punctate structures but was rather associated with cell-cell contacts and/or fibronectin fibrils as suggested by the elongated form of the staining (Figure 7A, B). On the other hand, when cells migrated away from the spheroid, colocalisation of integrin  $\alpha 5$  and pFAK-tyr397 at focal complexes and focal adhesions could be observed (Figure 7C). Thus, our data showed that 3D-fibrillar adhesion did not contained activated FAK and that classical  $\alpha 5$ -containing FAs are progressively formed during the process of cell migration.

## Discussion

Highly efficient infiltration in the surrounding brain parenchyma is a hallmark of glioblastoma cells and a major cause of therapy failure. Therefore, a better understanding of GBM cell invasive behavior is urgently needed to improve therapeutic approaches to fight these tumors (Vehlow and Cordes, 2013). In the present work, we intended to clarify the function of  $\alpha 5$  integrin, the fibronectin receptor, in GBM spheroid formation and in cell dispersion. Using overexpression and loss-of function studies, we confirmed that  $\alpha 5$  integrin is involved in 3D-fibrillar adhesion that mediated cell-cell adhesion and sphere formation. Furthermore, we showed that cell evasion from tumor sphere is regulated by a balance between cell-cell adhesion and cell-ECM interaction, both mediated by  $\alpha 5$  integrin. Our results exemplify the molecular and morphological diversity and the plasticity of  $\alpha 5$  adhesions during the transition between 3D and 2D environments. In clinical situation, GBM frequently overexpressed FN will promote  $\alpha 5\beta 1$ -mediated glioma cell dissemination from the tumor mass and in such case patients would thus benefit from anti- $\alpha 5$  integrin therapy.

Multicellular tumor spheroids are three dimensional (3D) architecture that mimic avascular tumor areas comprising the establishment of diffusion gradients, reduced proliferation rates and increased drug resistance. They are increasingly used as an improvement of

conventional 2D culture systems as they offer a 3D vivo-like environment as well as cell-ECM and cell-cell interactions. The presence of fibrillary ECM proteins in multicellular spheroid derived from tumor cell lines was demonstrated decades ago (Nederman et al., 1984). Only recently, has emerged fibrillar FN as an ECM protein involved in cell-cell interaction and spheroid formation (Casey et al., 2001; Robinson et al., 2003, 2004; Salmenperä et al., 2008; Serres et al., 2014, Singh and Schwarzbauer, 2014). Spheroid formation from a cell suspension is a multistep process that required cell aggregation and tension force mediated cell compaction (Weiswald et al., 2015). The present work and others published data (Sabari et al., 2011) clearly established that  $\alpha 5\beta 1$  and FN fibrillogenesis play a pivotal role in glioma spheroid formation. In line with other works (Ivascu and Kubbies, 2007; Saias et al., 2015), our kinetics experiments showed that  $\alpha 5\beta 1$  is not involved in cell aggregation but rather promotes the condensation phase of the spheroid formation.

Matrix assembly into fibrils by  $\alpha 5\beta 1$  integrin is an essential process that can modulate cell morphology growth and motility (Schwarzbauer and DeSimone, 2011). In GBM clinical samples, FN is frequently expressed at high level and found in fibrillar deposit in the tumor (Yuan et al., 2007). An important observation of our work is that in glioma sphere  $\alpha 5$  integrins are distributed in 3D cell-cell adhesion and stimulate fibrillogenesis to form a 3D-fibrillar adhesion. Current knowledges on fibrillogenesis are primarily based on in vitro studies on normal fibroblast and endothelial cells. On 2D cell culture, fibrillogenesis is initiated by  $\alpha 5\beta 1$  integrin in fibrillar adhesion (FBs) that are characterized by the absence of phosphoprotein (especially FAK-pY397) and the presence on tensin, a integrin-binding protein essential form FN assembly (Katz et al., 2000; Pankov et al., 2000).  $\alpha 5$  integrin adhesions has also been studied and characterized on fibroblast cells imbedded in 3D matrix (Cukierman et al., 2001). These peculiar adhesions differ from the classical FBs as they shared several intracellular components with FAs (paxillin, vinculin and FAK), excluding the FAK-pY397 (Cukierman et al., 2001). Here, we showed that the 3D-fibrillar adhesions engaged in cell-cell interaction did not contained FAK-pY397, but further molecular characterization are required to assert the molecular and functional homologies or differences between these 3D adhesion sites.

In our experiments we detected the presence of assembled FN during U87 collective evasion from the spheroid as long as cells maintained contacts with their neighbor. Glioma cell

evasion required thus a profound and dynamics remodeling of 3D-fibrillary adhesion. Little is known about the intracellular pathways that regulate FN matrix assembly and turnover. RhoA family GTPases and upstream regulators (integrin-linked kinase and FAK) play a pivotal role by controlling the cytoskeletal generated acto-myosin contractility (Fernandez-Sauze et al., 2009; Zhong et al., 1998; Vouret-Craviari et al., 2004; Ilić et al., 2004). More recently, an acting regulating protein localized in FAs, inverted formin 2 (INF2), has been shown to promote fibrillary adhesion and FN matrix assembly in mouse embryonic fibroblasts (Skau et al., 2015). Conversely, the RAS-RAF signaling pathway has been shown to inhibit FN fibrillogenesis (Winters et al., 2006). FN fibrils are also regulated by extracellular proteins such as transglutaminase 2, a protein crosslinker that stimulates fibril formation (Yuan et al., 2007). On the other side, fibril turnover required the membrane type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) that mediates FN fibril proteolysis (Shi and Sottile, 2011; Takino et al., 2011). FN fragments are subsequently endocytosed by a caveolin-1 dependent pathway (Sottile and Chandler, 2005). In line with our own observations, cells in 3D environment consistently showed a stronger fibrillogenesis activity compared to cells in 2D environment (Mao and Schwarzbauer, 2005; Cukierman et al., 2001; Winters et al., 2006). As U87 as cell migrate away from the sphere and transit from a 3D to 2D environment, they lost 3D-fibrillar adhesion, illustrating their dynamics remodeling. Further experiments will help to decipher if the evocated molecular pathways are involved in 3D-fibrillary adhesion turnover during glioma cell evasion

In the present work, we defined 3D-fibrillar adhesions as  $\alpha 5$  adhesions involved in glioma cell-cell interactions and illustrated their involvement in the regulation of cell dissemination from a tumor sphere. Although they enhanced cell-cell cohesion, dynamics remodeling of 3D-fibrillar adhesion is permissive for cell evasion. Drug-mediated inhibition of FN fibrillogenesis sensitizes glioma cells to chemotherapy in vitro and in vivo (Yuan et al., 2007). Fibrillar FN/ $\alpha 5$  axis is thus playing a pivotal role in glioma invasion and resistance to therapy. An improved knowledge of the composition, the regulation and the function of 3D-fibrillar adhesions should be helpful for the design of new effective strategies for fighting GBM.

## Material and Methods

### Reagents

Function blocking antibodies directed against  $\alpha 5$  integrin, clone IIA1 was from BD Biosciences and against  $\alpha v$  integrin, clone 69.6.5 was produced and purified as described in (Lehmann et al., 1994). Following antibodies were used for confocal microscopy. Conformation dependent LIBS anti- $\alpha 5$  antibody clone SNAKA-51 was from Millipore, anti- $\beta 1$  antibody clone TS2/16 produced from the hybridoma cell line TS2/16.2.1 (HB-243, ATCC) and purified on protein-G-sepharose column (Pierce). Anti- $\alpha v$  antibody, clone PLW7 from Santa Cruz, anti-fibronectin antibody, clone 10 was from BD Biosciences, anti-FAK-pY397, clone 141-9 from Life Technologies. Fluorescently labelled secondary antibodies were purchased from Invitrogen (AlexaFLuor 488; 546; 647). Dapi sc-3598 was purchased from SantaCruz Biotechnology. Human fibronectin stabilized solution was purchased from Biomedical Technologies and poly-L-Lysine solution 0.1% from Sigma-Aldrich. Cell culture medium and reagents were from Lonza. All other reagents were of molecular biology quality.

### Cell culture

The human glioblastoma cell line U87MG was obtained from ATCC. U87MG cells were maintained in Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine and 1% non-essential amino-acid, in a 37°C humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>. U87MG cells manipulated to overexpress or repress the  $\alpha 5$  integrin subunit have been obtained and characterized as described in (Janouskova et al., 2012b; Ray et al., 2014a)

### Proliferation assay

Cells were plated (1000 cells/well) onto 96-well plate in EMEM supplemented with 10% FBS. At the indicated time, cell viability was determined using tetrazolium compound [3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS assay - CellTiter 96 AQueous One Solution Cell proliferation assay from Promega).

### Spheroid formation

Six grams of methylcellulose were dissolved in 250mL of EMEM and heated at 60°C for 1h. After addition of 250mL of EMEM and the solution was kept at 4°C under agitation for 18 hours. The solution was cleared by centrifugation (5000g, 2h). Single cell suspension was generated from trypsinized monolayers and diluted at the desired cell density. Cell suspension was mixed in EMEM/10%FBS containing 20% of methylcellulose. All the spheroids were made with 2000 cells. Cell spheroid were formed by hanging drop methods (25µl, 2000 cells per sphere) or on U-bottom 96 well plate (Greiner Cellstar U-bottom culture plate) (100µl, 2000 cells).

### Spheroid organization

Spherical organization of 20 spheroids/condition was followed regularly from 0 to 48hours on phase-contrast images (EVOS xl Core, 20x magnification). Circularity measurements (roundness) were measured using shape descriptors of ImageJ software ((Schneider et al., 2012). When indicated function blocking anti-integrin antibodies (anti- $\alpha$ 5, clone IIa1; anti- $\alpha$ v, clone 69.6.5) at 10µg/mL in the cell suspension.

### Spheroid migration assays

Plastic dishes were coated with poly-L-lysine (10µg/mL) or fibronectin (indicated concentration) in PBS solution for 2h at 37°C. Two-day-old spheroids were allowed to adhere to 24-well plates in complete medium (EMEM, 10% FBS). Eighteen hours later, cells were fixed with paraformaldehyde 3.7% (Electron Microscopy Sciences) and stained with DAPI. Phase-contrast images (EVOS xl Core, 5x magnification) were acquired. Cell number was quantified with a home-made macro using ImageJ software.

### Confocal microscopy and image analysis

Coverslips were coated with fibronectin (10µg/mL in PBS). Two-day old spheroids were seeded in complete medium for 18 hours. Cells were then fixed in 3.7% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.1% Triton-X100. After a 1hour blocking step using TBS-BSA 5% solution, cells were incubated with primary antibodies O/N at 4°C (2µg/mL each in TBS-BSA 3%). Cells were incubated with appropriate secondary antibodies (1µg/mL in TBS-BSA 3%) and DAPI for 1 hour. Spheroids were mounted on microscope slides using Permafluor

Aqueous Mounting Medium (Fisher). Images were acquired using a confocal microscope (LEICA TCS SPE II, 60x magnification oil-immersion). Feret's diameter used as adhesion site criteria were quantified using ImageJ plugin developed in the lab. Pearson correlation coefficient was calculated using JACop plugin ImageJ software (Bolte and Cordelières, 2006).

### Statistical analysis

Data are reported as mean +/- S.E.M. unless otherwise stated. Statistical analysis between samples was done by one way analysis of the variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-test with the GraphPad Prism program. Significance level is controlled by 95% confidence interval.

## References

- Bellail, A.C., Hunter, S.B., Brat, D.J., Tan, C., and Van Meir, E.G. (2004). Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1046–1069.
- Bolte, S., and Cordelières, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232.
- Casey, R.C., Bureson, K.M., Skubitz, K.M., Pambuccian, S.E., Oegema Jr., T.R., Ruff, L.E., and Skubitz, A.P.N. (2001).  $\beta 1$ -Integrins Regulate the Formation and Adhesion of Ovarian Carcinoma Multicellular Spheroids. *Am. J. Pathol.* 159, 2071–2080.
- Castellani, P., Borsi, L., Carnemolla, B., Birò, A., Dorcaratto, A., Viale, G.L., Neri, D., and Zardj, L. (2002). Differentiation between high- and low-grade astrocytoma using a human recombinant antibody to the extra domain-B of fibronectin. *Am. J. Pathol.* 161, 1695–1700.
- Clark, K., Pankov, R., Travis, M.A., Askari, J.A., Mould, A.P., Craig, S.E., Newham, P., Yamada, K.M., and Humphries, M.J. (2005). A specific  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin conformation promotes directional integrin translocation and fibronectin matrix formation. *J. Cell Sci.* 118, 291–300.
- Cosset, E.C., Godet, J., Entz-Werlé, N., Guérin, E., Guenot, D., Froelich, S., Bonnet, D., Pinel, S., Plenat, F., Chastagner, P., et al. (2012). Involvement of the TGF $\beta$  pathway in the regulation of  $\alpha(5) \beta(1)$  integrins by caveolin-1 in human glioblastoma. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 131, 601–611.
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R., and Yamada, K.M. (2001). Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science* 294, 1708–1712.
- Desgrosellier, J.S., and Cheresh, D.A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 10, 9–22.
- Fernandez-Sauze, S., Grall, D., Cseh, B., and Van Obberghen-Schilling, E. (2009). Regulation of fibronectin matrix assembly and capillary morphogenesis in endothelial cells by Rho family GTPases. *Exp. Cell Res.* 315, 2092–2104.
- Gingras, M.C., Roussel, E., Bruner, J.M., Branch, C.D., and Moser, R.P. (1995). Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J. Neuroimmunol.* 57, 143–153.
- Hamadi, A., Bouali, M., Dontenwill, M., Stoeckel, H., Takeda, K., and Rondé, P. (2005). Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. *J. Cell Sci.* 118, 4415–4425.
- Hirata, E., Yukinaga, H., Kamioka, Y., Arakawa, Y., Miyamoto, S., Okada, T., Sahai, E., and Matsuda, M. (2012). In vivo fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion. *J. Cell Sci.* 125, 858–868.
- Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., and Kunz-Schughart, L.A. (2010). Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* 148, 3–15.
- Holmes, K.M., Annala, M., Chua, C.Y.X., Dunlap, S.M., Liu, Y., Huguen, N., Moore, L.M., Cogdell, D., Hu, L., Nykter, M., et al. (2012). Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 2-Driven Glioma Progression Is Prevented by Blocking a Clinically Significant Integrin, Integrin-Linked Kinase, and NF- $\kappa$ B Network. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 3475–3480.
- Ilić, D., Kovačič, B., Johkura, K., Schlaepfer, D.D., Tomašević, N., Han, Q., Kim, J.-B., Howerton, K., Baumbusch, C., Ogiwara, N., et al. (2004). FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. *J. Cell Sci.* 117, 177–187.

- Ivascu, A., and Kubbies, M. (2007). Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *Int. J. Oncol.* 31, 1403–1413.
- Janouskova, H., Maglott, A., Leger, D.Y., Bossert, C., Noulet, F., Guerin, E., Guenot, D., Pinel, S., Chastagner, P., Plenat, F., et al. (2012a). Integrin  $\alpha 5\beta 1$  plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma. *Cancer Res.* 72, 3463–3470.
- Janouskova, H., Maglott, A., Leger, D.Y., Bossert, C., Noulet, F., Guerin, E., Guenot, D., Pinel, S., Chastagner, P., Plenat, F., et al. (2012b). Integrin  $\alpha 5\beta 1$  Plays a Critical Role in Resistance to Temozolomide by Interfering with the p53 Pathway in High-Grade Glioma. *Cancer Res.* 72, 3463–3470.
- Jia, D., Entersz, I., Butler, C., and Foty, R.A. (2012). Fibronectin matrix-mediated cohesion suppresses invasion of prostate cancer cells. *BMC Cancer* 12, 94.
- Katz, B.-Z., Zamir, E., Bershady, A., Kam, Z., Yamada, K.M., and Geiger, B. (2000). Physical State of the Extracellular Matrix Regulates the Structure and Molecular Composition of Cell-Matrix Adhesions. *Mol. Biol. Cell* 11, 1047–1060.
- Kita, D., Takino, T., Nakada, M., Takahashi, T., Yamashita, J., and Sato, H. (2001). Expression of Dominant-Negative Form of Ets-1 Suppresses Fibronectin-Stimulated Cell Adhesion and Migration Through Down-Regulation of Integrin A5 Expression in U251 Glioma Cell Line. *Cancer Res.* 61, 7985–7991.
- Lal, A., Lash, A.E., Altschul, S.F., Velculescu, V., Zhang, L., McLendon, R.E., Marra, M.A., Prange, C., Morin, P.J., Polyak, K., et al. (1999). A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res.* 59, 5403–5407.
- Lehmann, M., Rabenandrasana, C., Tamura, R., Lissitzky, J.-C., Quaranta, V., Pichon, J., and Marvaldi, J. (1994). A Monoclonal Antibody Inhibits Adhesion to Fibronectin and Vitronectin of a Colon Carcinoma Cell Line and Recognizes the Integrins  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ , and  $\alpha v\beta 6$ . *Cancer Res.* 54, 2102–2107.
- Mahesparan, R., Read, T.-A., Lund-Johansen, M., Skaftnesmo, K., Bjerkvig, R., and Engebraaten, O. (2003). Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 105, 49–57.
- Mao, Y., and Schwarzbauer, J.E. (2005). Stimulatory effects of a three-dimensional microenvironment on cell-mediated fibronectin fibrillogenesis. *J. Cell Sci.* 118, 4427–4436.
- Martin, S., Cosset, E.C., Terrand, J., Maglott, A., Takeda, K., and Dontenwill, M. (2009). Caveolin-1 regulates glioblastoma aggressiveness through the control of  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression and modulates glioblastoma responsiveness to SJ749, an  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonist. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 354–367.
- Martinkova, E., Maglott, A., Leger, D.Y., Bonnet, D., Stiborova, M., Takeda, K., Martin, S., and Dontenwill, M. (2010).  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells. *Int. J. Cancer* 127, 1240–1248.
- Nederman, T., Norling, B., Glimelius, B., Carlsson, J., and Brunk, U. (1984). Demonstration of an Extracellular Matrix in Multicellular Tumor Spheroids. *Cancer Res.* 44, 3090–3097.
- Ohnishi, T., Arita, N., Hiraga, S., Taki, T., Izumoto, S., Fukushima, Y., and Hayakawa, T. (1997). Fibronectin-mediated cell migration promotes glioma cell invasion through chemokinetic activity. *Clin. Exp. Metastasis* 15, 538–546.
- Ohnishi, T., Hiraga, S., Izumoto, S., Matsumura, H., Kanemura, Y., Arita, N., and Hayakawa, T. (1998). Role of fibronectin-stimulated tumor cell migration in glioma invasion in vivo: clinical significance of fibronectin and fibronectin receptor expressed in human glioma tissues. *Clin. Exp. Metastasis* 16, 729–741.

- Pankov, R., Cukierman, E., Katz, B.-Z., Matsumoto, K., Lin, D.C., Lin, S., Hahn, C., and Yamada, K.M. (2000). Integrin Dynamics and Matrix Assembly Tensin-Dependent Translocation of  $\alpha 5 \beta 1$  Integrins Promotes Early Fibronectin Fibrillogenesis. *J. Cell Biol.* 148, 1075–1090.
- Ray, A.-M., Schaffner, F., Janouskova, H., Noulet, F., Rognan, D., Lelong-Rebel, I., Choulier, L., Blandin, A.-F., Lehmann, M., Martin, S., et al. (2014a). Single cell tracking assay reveals an opposite effect of selective small non-peptidic  $\alpha 5 \beta 1$  or  $\alpha v \beta 3 / \beta 5$  integrin antagonists in U87MG glioma cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1840, 2978–2987.
- Ray, A.-M., Schaffner, F., Janouskova, H., Noulet, F., Rognan, D., Lelong-Rebel, I., Choulier, L., Blandin, A.-F., Lehmann, M., Martin, S., et al. (2014b). Single cell tracking assay reveals an opposite effect of selective small non-peptidic  $\alpha 5 \beta 1$  or  $\alpha v \beta 3 / \beta 5$  integrin antagonists in U87MG glioma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 2978–2987.
- Riemenschneider, M.J., Mueller, W., Betensky, R.A., Mohapatra, G., and Louis, D.N. (2005). In situ analysis of integrin and growth factor receptor signaling pathways in human glioblastomas suggests overlapping relationships with focal adhesion kinase activation. *Am. J. Pathol.* 167, 1379–1387.
- Robinson, E.E., Zazzali, K.M., Corbett, S.A., and Foty, R.A. (2003).  $\alpha 5 \beta 1$  integrin mediates strong tissue cohesion. *J. Cell Sci.* 116, 377–386.
- Robinson, E.E., Foty, R.A., and Corbett, S.A. (2004a). Fibronectin Matrix Assembly Regulates  $\alpha 5 \beta 1$ -mediated Cell Cohesion. *Mol. Biol. Cell* 15, 973–981.
- Robinson, E.E., Foty, R.A., and Corbett, S.A. (2004b). Fibronectin Matrix Assembly Regulates  $\alpha 5 \beta 1$ -mediated Cell Cohesion. *Mol. Biol. Cell* 15, 973–981.
- da Rocha-Azevedo, B., Ho, C.-H., and Grinnell, F. (2013). Fibroblast cluster formation on 3D collagen matrices requires cell contraction dependent fibronectin matrix organization. *Exp. Cell Res.* 319, 546–555.
- Ryan, P.L., Foty, R.A., Kohn, J., and Steinberg, M.S. (2001). Tissue spreading on implantable substrates is a competitive outcome of cell–cell vs. cell–substratum adhesivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4323–4327.
- Sabari, J., Lax, D., Connors, D., Brotman, I., Mindrebo, E., Butler, C., Entersz, I., Jia, D., and Foty, R.A. (2011). Fibronectin Matrix Assembly Suppresses Dispersal of Glioblastoma Cells. *PLoS ONE* 6, e24810.
- Saias, L., Gomes, A., Cazales, M., Ducommun, B., and Lobjois, V. (2015). Cell–Cell Adhesion and Cytoskeleton Tension Oppose Each Other in Regulating Tumor Cell Aggregation. *Cancer Res.* 75, 2426–2433.
- Salmenperä, P., Kankuri, E., Bizik, J., Sirén, V., Virtanen, I., Takahashi, S., Leiss, M., Fässler, R., and Vaheri, A. (2008). Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin–integrin interaction. *Exp. Cell Res.* 314, 3444–3452.
- Schaffner, F., Ray, A.M., and Dontenwill, M. (2013). Integrin  $\alpha 5 \beta 1$ , the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors. *Cancers* 5, 27–47.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
- Schwarzbauer, J.E., and DeSimone, D.W. (2011). Fibronectins, Their Fibrillogenesis, and In Vivo Functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a005041.
- Sengupta, S., Nandi, S., Hindi, E.S., Wainwright, D.A., Han, Y., and Lesniak, M.S. (2010). Short Hairpin RNA-Mediated Fibronectin Knockdown Delays Tumor Growth in a Mouse Glioma Model. *Neoplasia N. Y. N* 12, 837.

Serres, E., Debarbieux, F., Stanchi, F., Maggiorella, L., Grall, D., Turchi, L., Burel-Vandenbos, F., Figarella-Branger, D., Virolle, T., Rougon, G., et al. (2013). Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane in vitro and orthotopic tumor growth in mice. *Oncogene*.

Serres, E., Debarbieux, F., Stanchi, F., Maggiorella, L., Grall, D., Turchi, L., Burel-Vandenbos, F., Figarella-Branger, D., Virolle, T., Rougon, G., et al. (2014). Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane in vitro and orthotopic tumor growth in mice. *Oncogene* 33, 3451–3462.

Shi, F., and Sottile, J. (2011). MT1-MMP regulates the turnover and endocytosis of extracellular matrix fibronectin. *J. Cell Sci.* 124, 4039–4050.

Silver, D.J., Siebzehnrbul, F.A., Schildts, M.J., Yachnis, A.T., Smith, G.M., Smith, A.A., Scheffler, B., Reynolds, B.A., Silver, J., and Steindler, D.A. (2013). Chondroitin Sulfate Proteoglycans Potently Inhibit Invasion and Serve as a Central Organizer of the Brain Tumor Microenvironment. *J. Neurosci.* 33, 15603–15617.

Singh, P., and Schwarzbauer, J.E. (2014). Fibronectin matrix assembly is essential for cell condensation during chondrogenesis. *J. Cell Sci.* 127, 4420–4428.

Skau, C.T., Plotnikov, S.V., Doyle, A.D., and Waterman, C.M. (2015). Inverted formin 2 in focal adhesions promotes dorsal stress fiber and fibrillar adhesion formation to drive extracellular matrix assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E2447–E2456.

Sottile, J., and Chandler, J. (2005). Fibronectin Matrix Turnover Occurs through a Caveolin-1–dependent Process. *Mol. Biol. Cell* 16, 757–768.

Takino, T., Nagao, R., Manabe, R., Domoto, T., Sekiguchi, K., and Sato, H. (2011). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates fibronectin assembly to promote cell motility. *FEBS Lett.* 585, 3378–3384.

Vehlow, A., and Cordes, N. (2013). Invasion as target for therapy of glioblastoma multiforme. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1836, 236–244.

Vouret-Craviari, V., Boulter, E., Grall, D., Matthews, C., and Obberghen-Schilling, E.V. (2004). ILK is required for the assembly of matrix-forming adhesions and capillary morphogenesis in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 117, 4559–4569.

Weiswald, L.-B., Bellet, D., and Dangles-Marie, V. (2015). Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia* 17, 1–15.

Winters, B.S., Raj, B.M., Robinson, E.E., Foty, R.A., and Corbett, S.A. (2006). Three-dimensional culture regulates Raf-1 expression to modulate fibronectin matrix assembly. *Mol. Biol. Cell* 17, 3386–3396.

Yuan, L., Siegel, M., Choi, K., Khosla, C., Miller, C.R., Jackson, E.N., Piwnica-Worms, D., and Rich, K.M. (2007). Transglutaminase 2 inhibitor, KCC009, disrupts fibronectin assembly in the extracellular matrix and sensitizes orthotopic glioblastomas to chemotherapy. *Oncogene* 26, 2563–2573.

Zhong, C., Chrzanowska-Wodnicka, M., Brown, J., Shaub, A., Belkin, A.M., and Burridge, K. (1998). Rho-mediated Contractility Exposes a Cryptic Site in Fibronectin and Induces Fibronectin Matrix Assembly. *J. Cell Biol.* 141, 539–551.

## Legend to the figures

**Figure 1:** U87 cells expressing high (U87 $\alpha$ 5+) or low (U87 $\alpha$ 5-) amount of  $\alpha$ 5 integrin were analyzed to show the involvement of  $\alpha$ 5 in cell-cell adhesion **A)** Phase contrast images of U87 cells cultured for 4 days under conventional conditions. Scale bar: 200 $\mu$ m. The number of cell clusters per field was manually counted. Data presented are the mean $\pm$  s.e.m. of 3 different experiments (4 fields/experiments). **B)** U87 cells were cultured for 4 days and 2D plastic dishes and cell growth was monitored as described in Material and Methods. **C)** Left panel-Phase contrast images of U87 cell spheroid cultures for the indicated period of times in non-adherent U-shaped wells (1000 cells/well). Morphological parameters (area and roundness) of each spheroid were measured using ImageJ software. **D)** Spheroids were formed for 18h in the presence of irrelevant IgG or function-blocking antibodies targeting  $\alpha$ 5 or  $\alpha$ v integrins (10 $\mu$ g/ml each) and spheroid roundness was monitored. Data are the mean  $\pm$  s.e.m of 15-20 spheroids from 3 independent experiments. \*= $p$ <0.05, \*\*= $p$ <0.01, \*\*\*= $p$ <0.001, \*\*\*\*= $p$ <0.0001

**Figure 2:** Distribution of  $\alpha$ 5 and  $\beta$ 1 integrins and of fibronectin in U87 cell spheroids. Suspended spheroids were immunolabelled as described in Material and Methods. Confocal images were taken at an optical section between 10 $\mu$ m and 20 $\mu$ m above the base of the spheroid. Nuclei were stained with DAPI. Bar= 20 $\mu$ m

**Figure 3:** Two-days old spheroids were plated onto poly-L-lysine coated plastic dishes in the presence of irrelevant IgG or function-blocking antibodies targeting  $\alpha$ 5 or  $\alpha$ v integrins (10 $\mu$ g/ml each). **A)** Phase contrast image of representative spheroids after 24 hours of migration. Scale bar=100 $\mu$ m **B)** After DAPI staining, the number of evading cells were quantified by automated counting of nuclei using ImageJ software and plotted as the mean  $\pm$  s.e.m. **C)** The distance of migration from the spheroid was measured for each cell and the mean distance was calculated for each spheroid. Data are plotted as Tukey box and whiskers. 15 spheroids from 3 independent experiments were used per condition. \*\* $p$ <0.05; \*\*\* $p$ <0.001

**Figure 4:** **A)** Two-day-old spheroids were plated on plastic dishes coated with the indicated amount of fibronectin (FN). Phase contrast images were taken 24 hours after seeding of the

spheroids. Scale bar=200 $\mu$ m **B)** After DAPI staining, cell evasion was quantified and mean number of evading cells was plotted +/- s.e.m. **C)** The distance of migration from the spheroid was measured for each cell and the mean distance was calculated for each spheroid. Data are plotted as box and whiskers (min to max) **D)** Spheroids were plated on plastic dishes coated with fibronectin (10 $\mu$ g/ml) in the presence of irrelevant IgG or function-blocking antibodies targeting  $\alpha$ 5,  $\beta$ 1 or  $\alpha$ v integrins (10 $\mu$ g/ml each). Data are the mean cell number +/- s.e.m. and the mean distance of cell migration per spheroid plotted as box and whiskers (min to max) – 12 to 18 spheroids from 4 independent experiments were analyzed. \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001

**Figure 5:** Two-day-old spheroids were plated on FN-coated (10 $\mu$ g/ml) glass coverslips. 18 hours later, cells were fixed and immunolabelled to detect ligand-occupied  $\alpha$ 5 integrin ( $\alpha$ 5) and fibronectin (FN) as described in Material and Methods. Confocal images were taken at 3 different zones as depicted in the diagrams to examine **A)** cells emerging from the tumor sphere at a focal plane 5 $\mu$ m above the coverslips **B)** same microscopic field but at a focal plane corresponding to the substratum and **C)** cell/substratum interface of cells that migrate away from the sphere. Orange dotted lines indicate the border of the spheroid. Arrow heads = fibrillar adhesion; arrows = focal contacts. Scale bar= 10 $\mu$ m.

**Figure 6:** Two-day-old U87 $\alpha$ 5+ spheroids were plated on FN-coated (10 $\mu$ g/ml) glass coverslips. 18 hours later, cells were fixed and ligand-occupied  $\alpha$ 5 integrin ( $\alpha$ 5) and pFAK-tyr397 (pFAK) were immunodetected. Confocal images were taken at 3 different zones as depicted in the diagrams to examine **A)** cells emerging from the tumor sphere at a focal plane 5 $\mu$ m above the coverslips **B)** same microscopic field but at a focal plane corresponding to the substratum and **C)** cell/substratum interface of cells that migrate away from the sphere. **D)** Quantitative image analysis of pFAK clusters was performed as described in Materials and methods. Data are presented as the mean Feret diameters of each individual image (n=8 to 12) from 2 independent experiments. **E)** Integrin/pFAK colocalisation was evaluated using Pearson's correlation coefficient. 10 to 12 images from 2 experiments were used. \*\*\*\* $p$ <0.0001. Orange dotted lines indicate the border of spheroids. Arrow heads = fibrillar adhesion; arrows = focal contacts. Scale bar= 10 $\mu$ m.

**Figure 7:** Two-day-old U87 $\alpha$ 5+ spheroids were plated on FN-coated (10 $\mu$ g/ml) glass coverslips in complete medium for 18 hours. Fixed cells were immunolabelled using anti- $\alpha$ 5, and rabbit anti-pFAKtyr397 antibodies. Dual color wide field TIRF images were acquired at increasing distances from the spheroid.

Figure 1

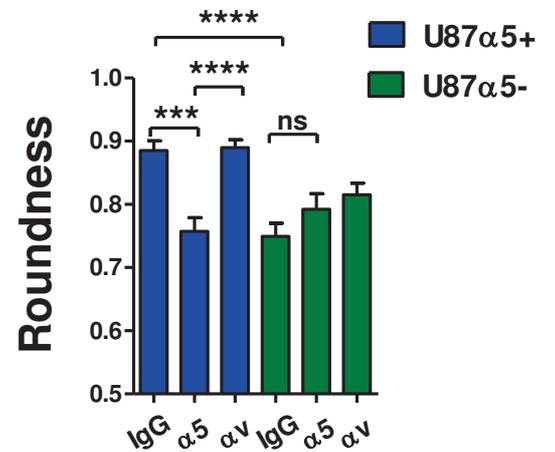
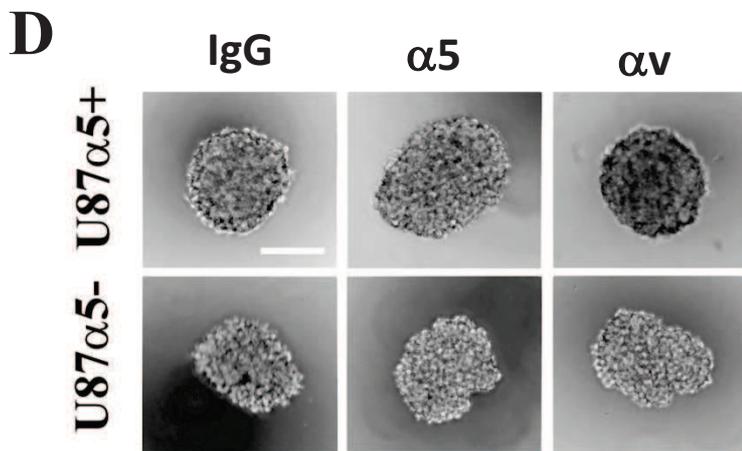
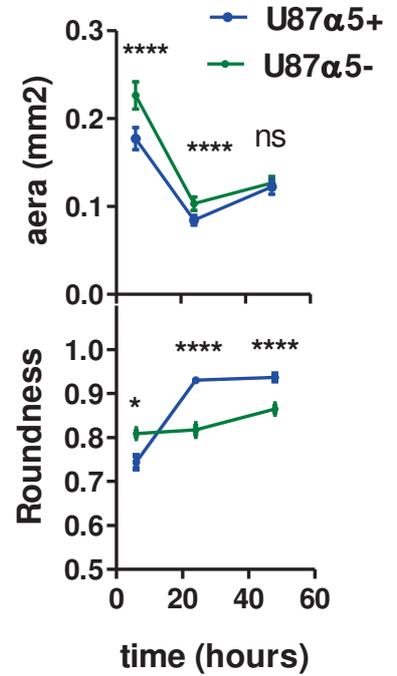
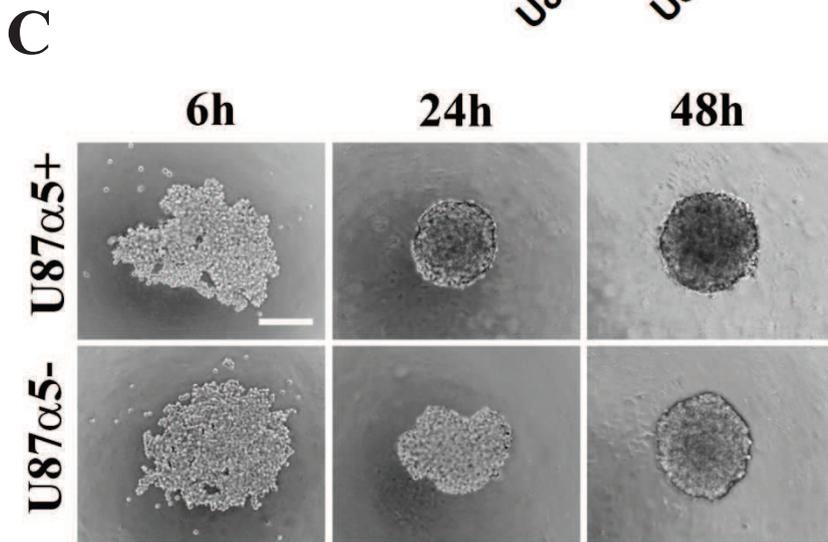
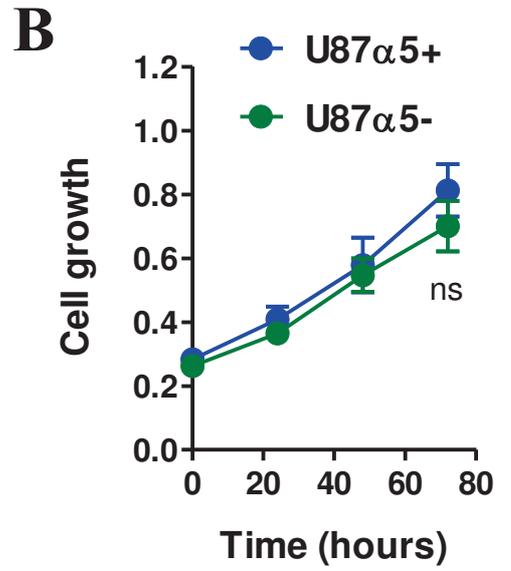
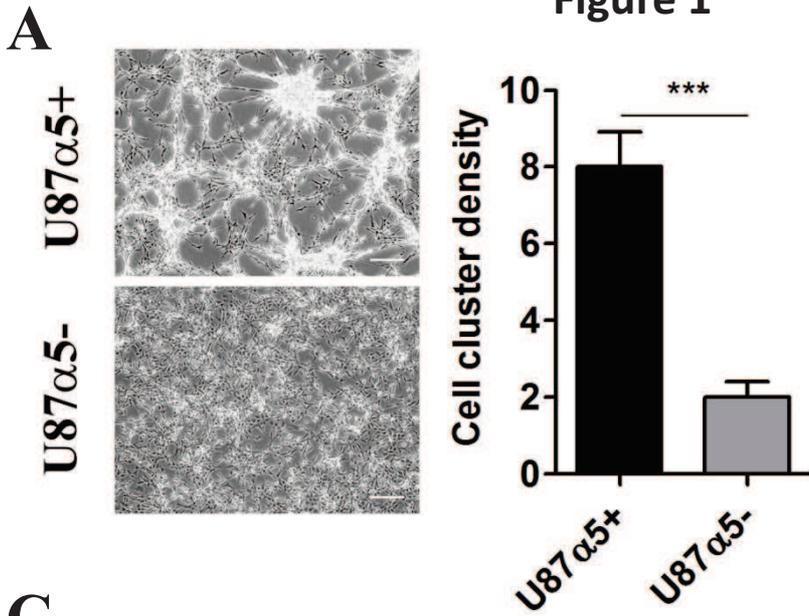


Figure 2

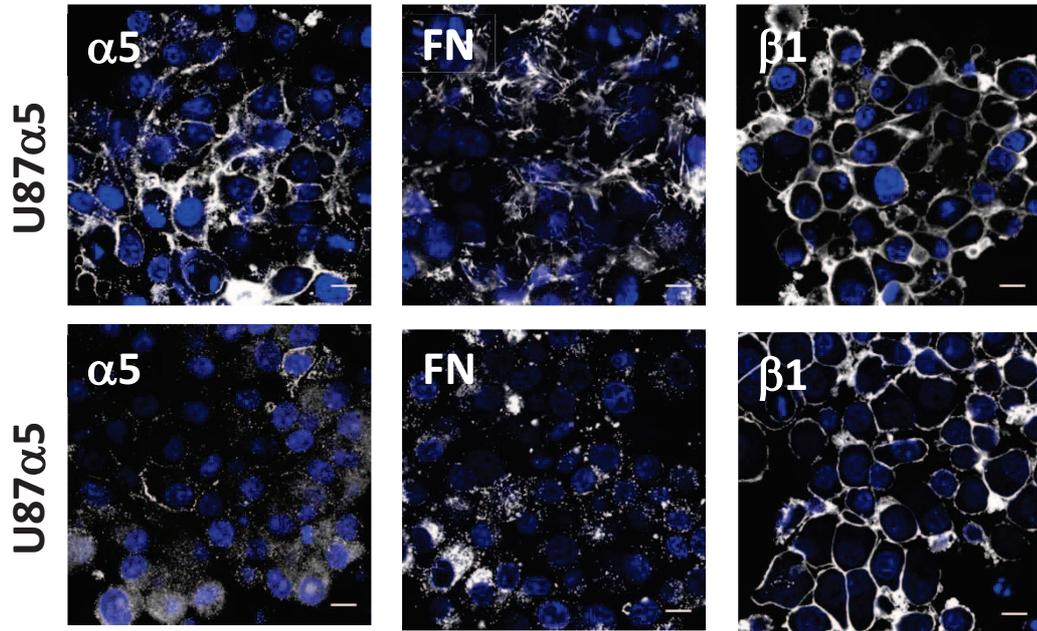
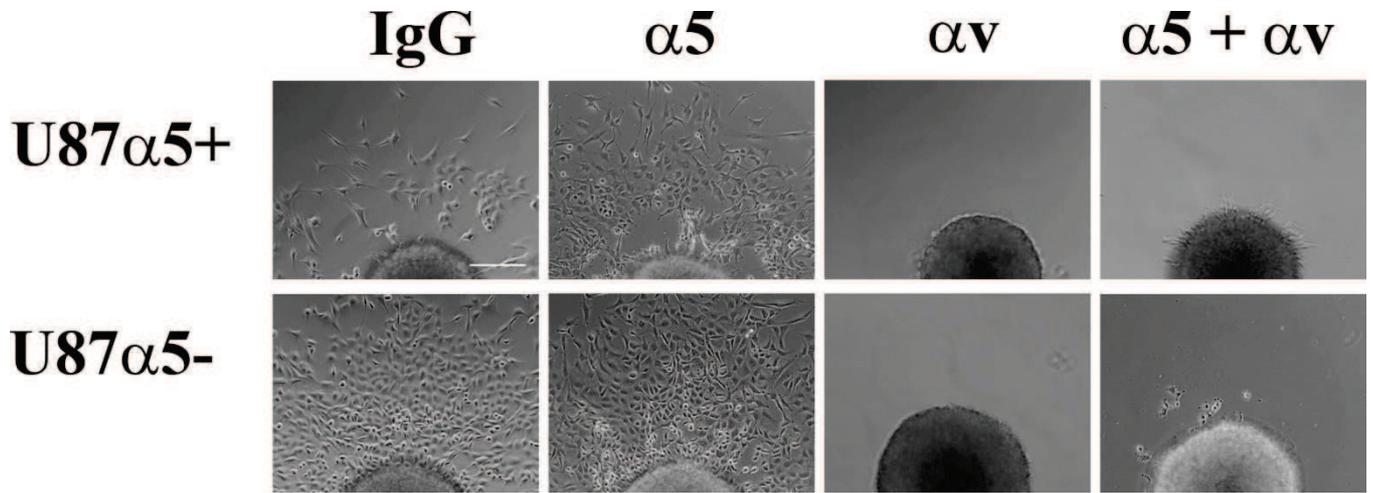
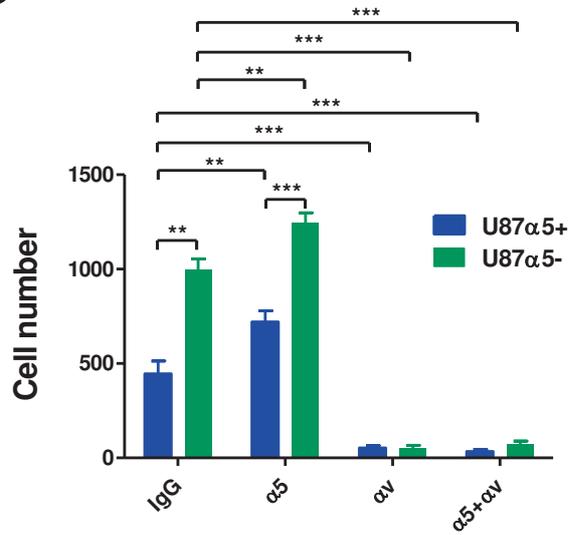


Figure 3

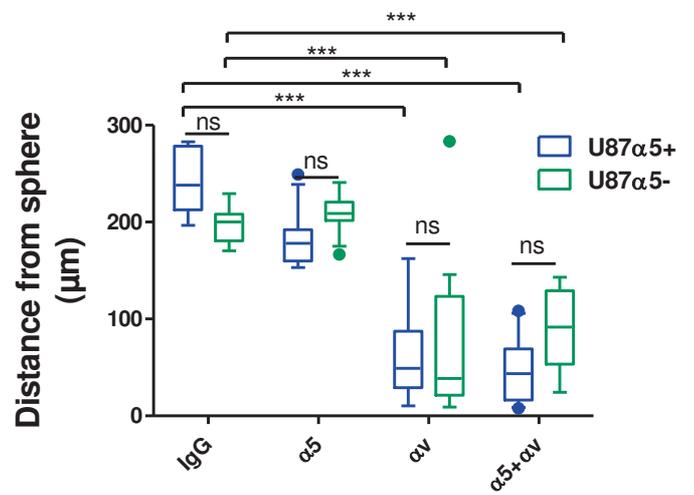
A



B



C



**A** **Figure 4** **B**

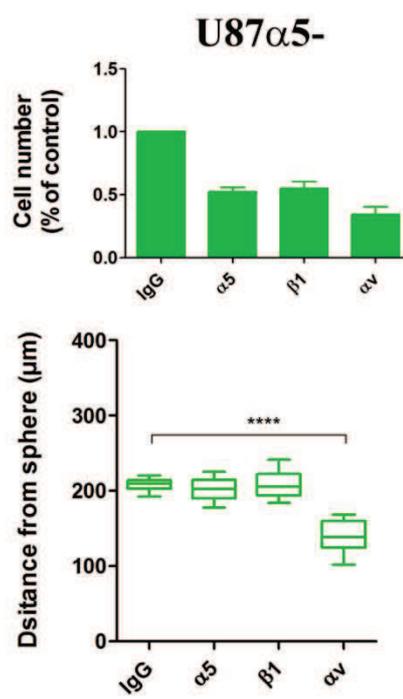
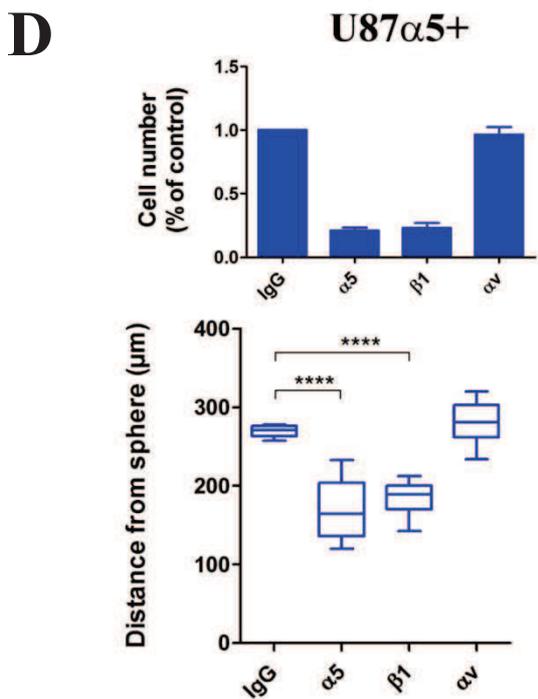
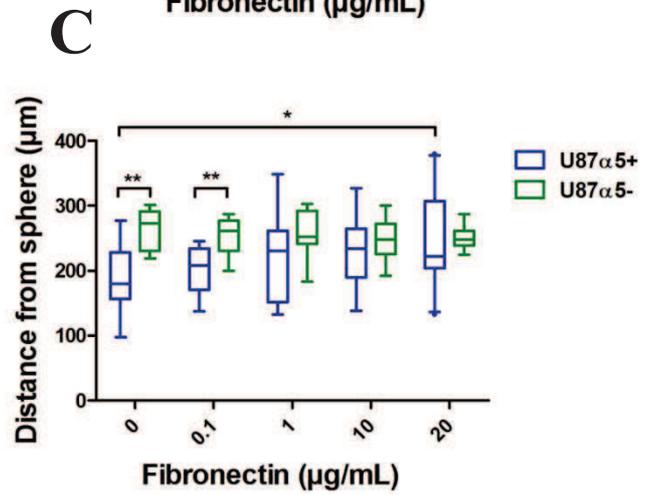
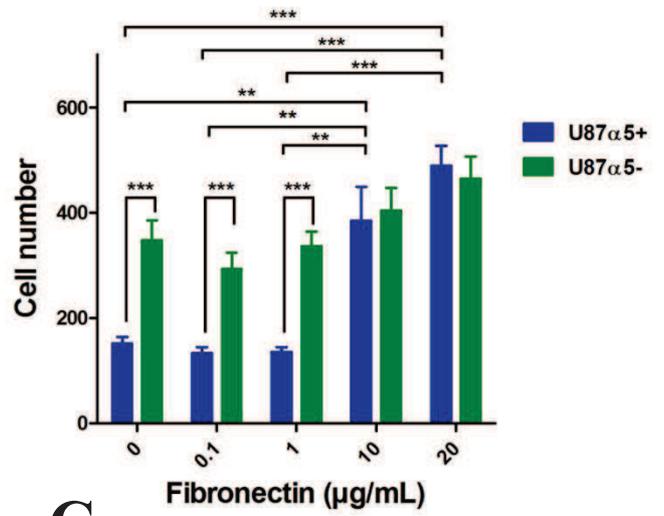
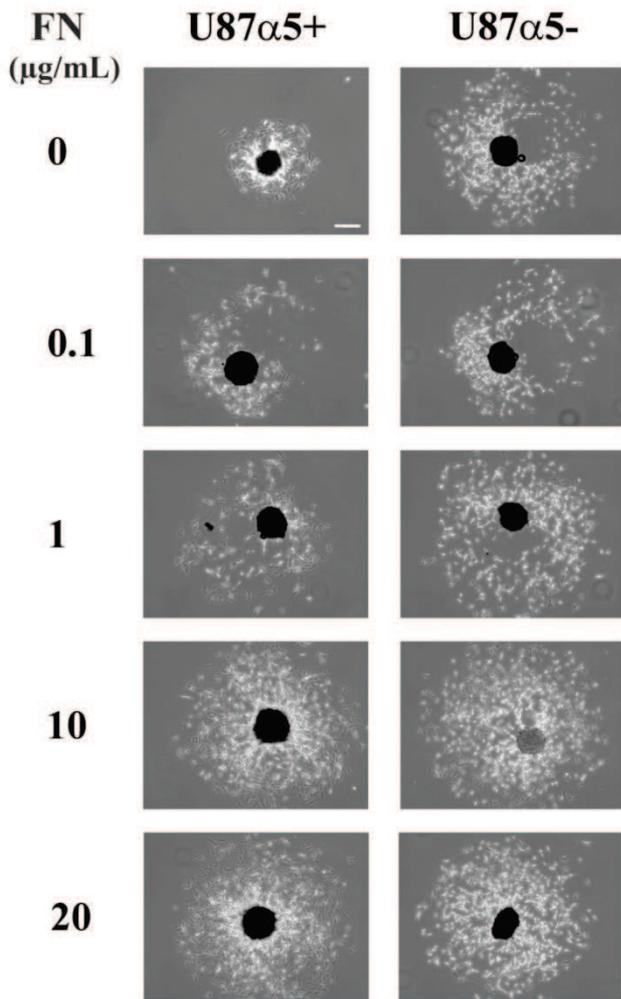


Figure 5

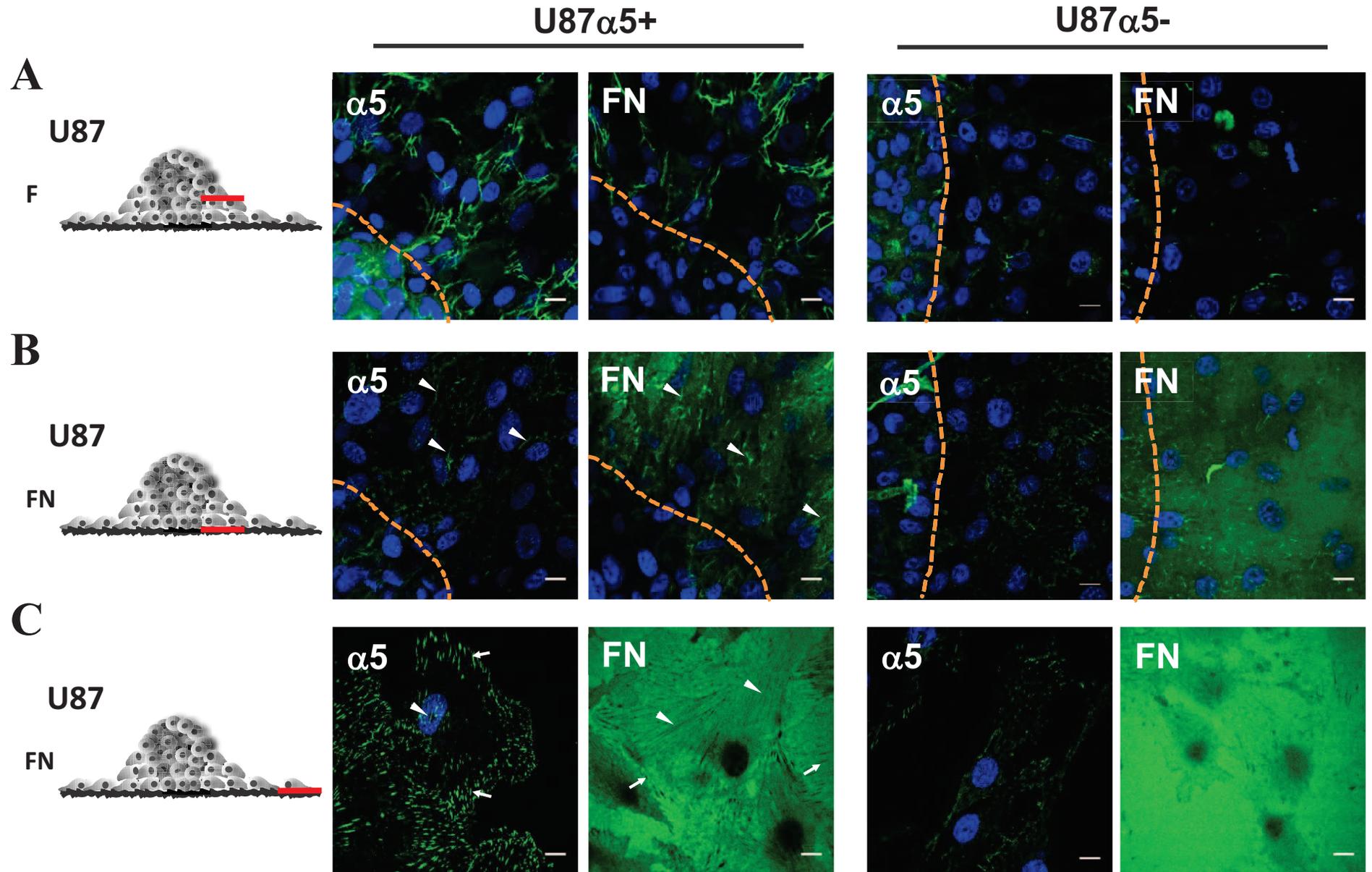
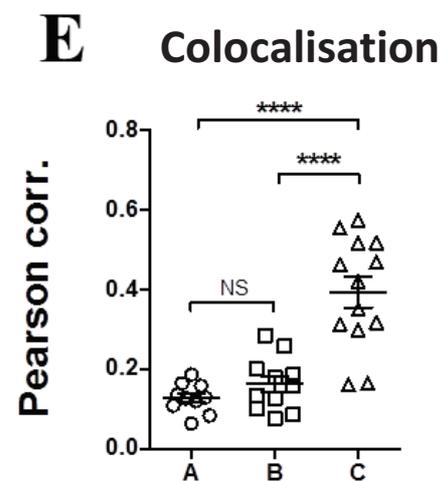
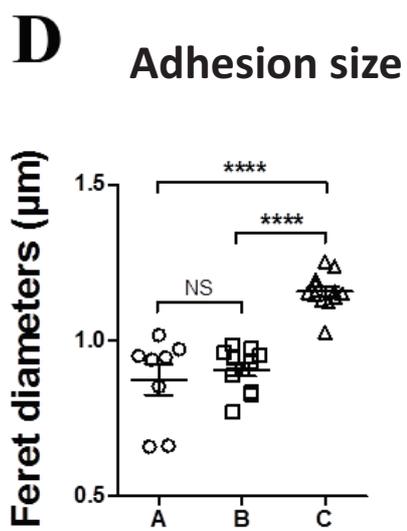
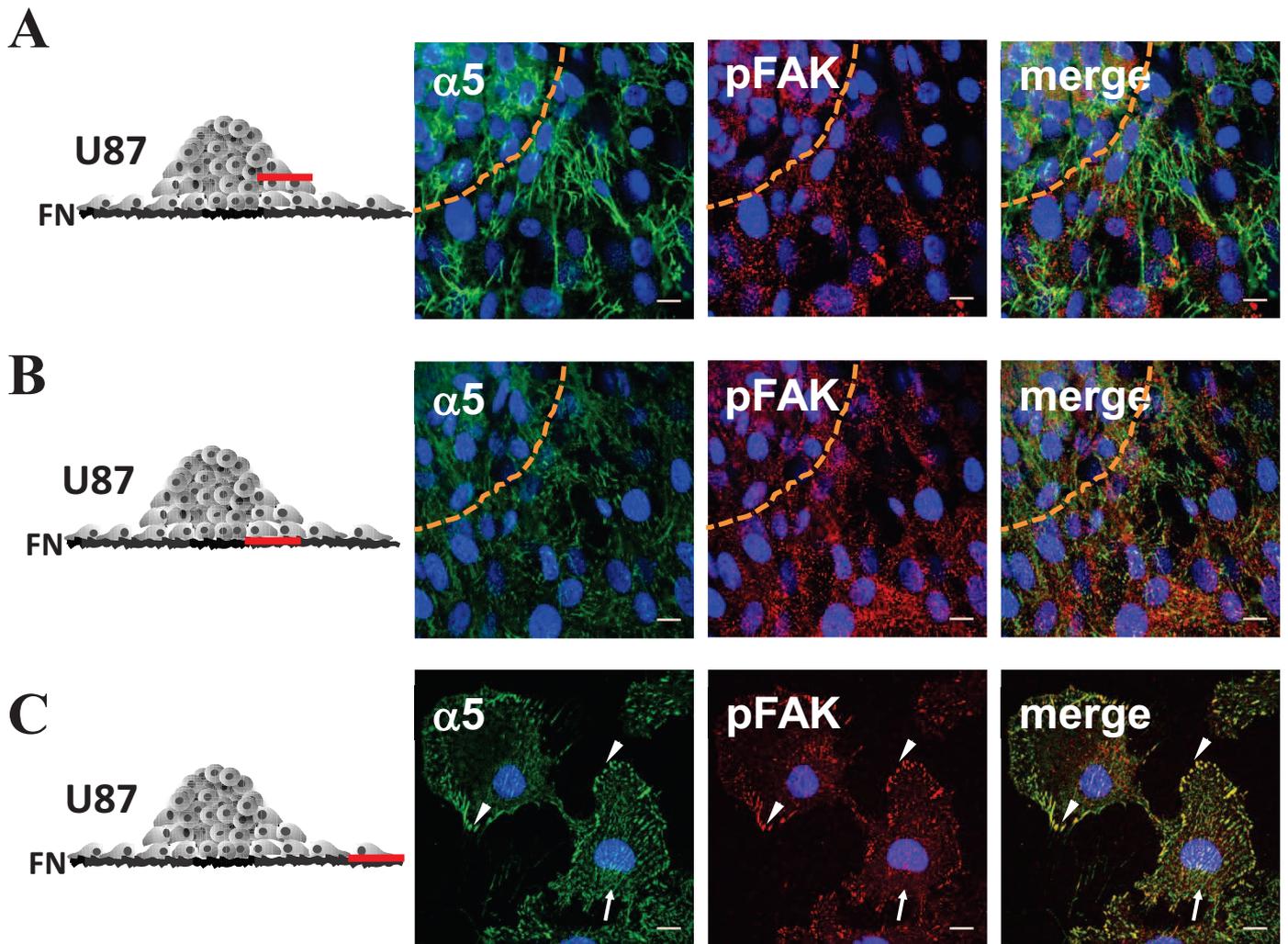


Figure 6



Distance from the spheroid

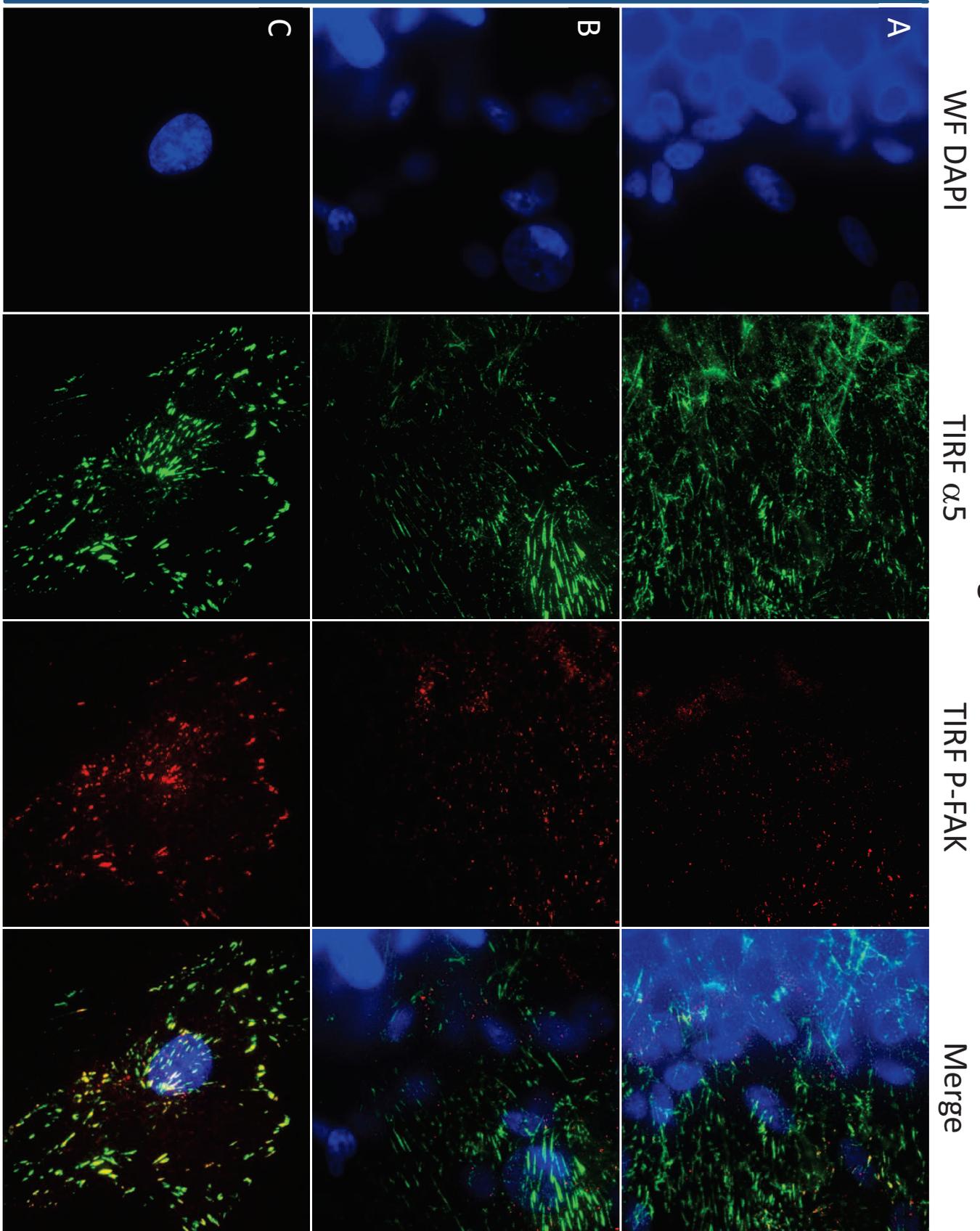


Figure 7

**BIBLIOGRAPHIE**

- A**dachi, M., Taki, T., Higashiyama, M., Kohno, N., Inufusa, H., and Miyake, M. (2000). Significance of Integrin  $\alpha 5$  Gene Expression as a Prognostic Factor in Node-negative Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* 6, 96–101.
- Akhavan, D., Pourzia, A.L., Nourian, A.A., Williams, K.J., Nathanson, D., Babic, I., Villa, G.R., Tanaka, K., Nael, A., Yang, H., et al. (2013). De-repression of PDGFR $\beta$  transcription promotes acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in glioblastoma patients. *Cancer Discov.* 3, 534–547.
- Alifieris, C., and Trafalis, D.T. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol. Ther.* 152, 63–82.
- Alves, T.R., Lima, F.R.S., Kahn, S.A., Lobo, D., Dubois, L.G.F., Soletti, R., Borges, H., and Neto, V.M. (2011). Glioblastoma cells: A heterogeneous and fatal tumor interacting with the parenchyma. *Life Sci.* 89, 532–539.
- Amir Abdollahi, Griggs, D.W., Zieher, H., Roth, A., Lipson, K.E., Saffrich, R., Gröne, H.-J., Hallahan, D.E., Reisfeld, R.A., Debus, J., et al. (2005). Inhibition of  $\alpha 6 \beta 3$  Integrin Survival Signaling Enhances Antiangiogenic and Antitumor Effects of Radiotherapy. *Clin. Cancer Res.* 11, 6270–6279.
- Appin, C.L., and Brat, D.J. Biomarker-driven diagnosis of diffuse gliomas. *Mol. Aspects Med.*
- Arjonen, A., Alanko, J., Veltel, S., and Ivaska, J. (2012). Distinct Recycling of Active and Inactive  $\beta 1$  Integrins. *Traffic* 13, 610–625.
- Arnaut, M.A., Goodman, S., and Xiong, J.-P. (2007). Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 495–507.
- Auf, G., Jabouille, A., Delugin, M., Guérit, S., Pineau, R., North, S., Platonova, N., Maitre, M., Favereaux, A., Vajkoczy, P., et al. (2013). High epipegulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 $\alpha$  and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC Cancer* 13, 597.
- B**adiga, A.V., Chetty, C., Kesanakurti, D., Are, D., Gujrati, M., Klopfenstein, J.D., Dinh, D.H., and Rao, J.S. (2011). MMP-2 siRNA inhibits radiation-enhanced invasiveness in glioma cells. *PLoS One* 6, e20614.
- Balss, J., Meyer, J., Mueller, W., Korshunov, A., Hartmann, C., and von Deimling, A. (2008). Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 116, 597–602.
- Banères, J.L., Roquet, F., Green, M., LeCalvez, H., and Parello, J. (1998). The cation-binding domain from the alpha subunit of integrin alpha5 beta1 is a minimal domain for fibronectin recognition. *J. Biol. Chem.* 273, 24744–24753.
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2009). Integrins. *Cell Tissue Res.* 339, 269–280.
- Bazzoni, G., Shih, D.-T., Buck, C.A., and Hemler, M.E. (1995). Monoclonal Antibody 9EG7 Defines a Novel  $\beta 1$  Integrin Epitope Induced by Soluble Ligand and Manganese, but Inhibited by Calcium. *J. Biol. Chem.* 270, 25570–25577.
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F., and Delattre, J.-Y. (2003). Primary brain tumours in adults. *The Lancet* 361, 323–331.
- Bellail, A.C., Hunter, S.B., Brat, D.J., Tan, C., and Van Meir, E.G. (2004). Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1046–1069.

- Bell-McGuinn, K.M., Matthews, C.M., Ho, S.N., Barve, M., Gilbert, L., Penson, R.T., Lengyel, E., Palaparthi, R., Gilder, K., Vassos, A., et al. (2011). A phase II, single-arm study of the anti- $\alpha 5\beta 1$  integrin antibody volociximab as monotherapy in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer. *Gynecol. Oncol.* 121, 273–279.
- Bertelsen, V., Sak, M.M., Breen, K., Rødland, M.S., Johannessen, L.E., Traub, L.M., Stang, E., and Madshus, I.H. (2011). A chimeric pre-ubiquitinated EGF receptor is constitutively endocytosed in a clathrin-dependent, but kinase-independent manner. *Traffic Cph. Den.* 12, 507–520.
- Bhaskar, V., Fox, M., Breinberg, D., Wong, M.H.-L., Wales, P.E., Rhodes, S., DuBridge, R.B., and Ramakrishnan, V. (2007). Volociximab, a chimeric integrin  $\alpha 5\beta 1$  antibody, inhibits the growth of VX2 tumors in rabbits. *Invest. New Drugs* 26, 7–12.
- Bjerkvig, R., Tønnesen, A., Laerum, O.D., and Backlund, E.-O. (1990). Multicellular tumor spheroids from human gliomas maintained in organ culture. *J. Neurosurg.* 72, 463–475.
- Blobel, C.P. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 32–43.
- Bosman, F.T., and Stamenkovic, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.* 200, 423–428.
- Brand, T.M., Iida, M., Luthar, N., Starr, M.M., Huppert, E.J., and Wheeler, D.L. (2013). Nuclear EGFR as a Molecular Target in Cancer. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 108.
- Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., et al. (2013a). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155, 462–477.
- Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., et al. (2013b). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155, 462–477.
- Brewer, M.R., Choi, S.H., Alvarado, D., Moravcevic, K., Pozzi, A., Lemmon, M.A., and Carpenter, G. (2009). The Juxtamembrane Region of the EGF Receptor Functions as an Activation Domain. *Mol. Cell* 34, 641–651.
- Broussard, J.A., Rappaz, B., Webb, D.J., and Brown, C.M. (2013). Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. *Nat. Protoc.* 8, 265–281.
- Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S., and Schreiber, S.L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369, 756–758.
- Brown, M.C., Staniszewska, I., Lazarovici, P., Tuszynski, G.P., Del Valle, L., and Marcinkiewicz, C. (2008). Regulatory effect of nerve growth factor in  $\alpha 9\beta 1$  integrin-dependent progression of glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 10, 968–980.
- C**abodi, S., Moro, L., Bergatto, E., Boeri Erba, E., Di Stefano, P., Turco, E., Tarone, G., and Defilippi, P. (2004). Integrin regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor and of EGF-dependent responses. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 438–442.
- Calò, V., Migliavacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N., and Russo, A. (2003). STAT proteins: From normal control of cellular events to tumorigenesis. *J. Cell. Physiol.* 197, 157–168.
- Campbell, R.M., Anderson, B.D., Brooks, N.A., Brooks, H.B., Chan, E.M., Dios, A.D., Gilmour, R., Graff, J.R., Jambrina, E., Mader, M., et al. (2014). Characterization of LY2228820 Dimesylate, a Potent and Selective Inhibitor of p38 MAPK with Antitumor Activity. *Mol. Cancer Ther.* 13, 364–374.

Cancer Genome Atlas Research Network, Brat, D.J., Verhaak, R.G.W., Aldape, K.D., Yung, W.K.A., Salama, S.R., Cooper, L.A.D., Rheinbay, E., Miller, C.R., Vitucci, M., et al. (2015). *Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas*. *N. Engl. J. Med.* 372, 2481–2498.

Cappuzzo, F., Hirsch, F.R., Rossi, E., Bartolini, S., Ceresoli, G.L., Bemis, L., Haney, J., Witt, S., Danenberg, K., Domenichini, I., et al. (2005). *Epidermal Growth Factor Receptor Gene and Protein and Gefitinib Sensitivity in Non-Small-Cell Lung Cancer*. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 643–655.

Carpenter, G., and Cohen, S. (1990). *Epidermal growth factor*. *J. Biol. Chem.* 265, 7709–7712.

Castellani, P., Borsi, L., Carnemolla, B., Birò, A., Dorcaratto, A., Viale, G.L., Neri, D., and Zardi, L. (2002). *Differentiation between High- and Low-Grade Astrocytoma Using a Human Recombinant Antibody to the Extra Domain-B of Fibronectin*. *Am. J. Pathol.* 161, 1695–1700.

Caswell, P.T., and Norman, J.C. (2006). *Integrin Trafficking and the Control of Cell Migration*. *Traffic* 7, 14–21.

Caswell, P.T., Chan, M., Lindsay, A.J., McCaffrey, M.W., Boettiger, D., and Norman, J.C. (2008). *Rab-coupling protein coordinates recycling of  $\alpha 5 \beta 1$  integrin and EGFR1 to promote cell migration in 3D microenvironments*. *J. Cell Biol.* 183, 143–155.

Caswell, P.T., Vadrevu, S., and Norman, J.C. (2009). *Integrins: masters and slaves of endocytic transport*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 843–853.

Chakravarti, A., Wang, M., Robins, H.I., Lautenschlaeger, T., Curran, W.J., Brachman, D.G., Schultz, C.J., Choucair, A., Dolled-Filhart, M., Christiansen, J., et al. (2013). *RTOG 0211: A Phase I/II Study of Radiation Therapy with Concurrent Gefitinib for Newly Diagnosed Glioblastoma Patients*. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 85, 1206–1211.

Chang, C.-Y., Kuan, Y.-H., Ou, Y.-C., Li, J.-R., Wu, C.-C., Pan, P.-H., Chen, W.-Y., Huang, H.-Y., and Chen, C.-J. (2014). *Autophagy contributes to gefitinib-induced glioma cell growth inhibition*. *Exp. Cell Res.* 327, 102–112.

Chen, J., Salas, A., and Springer, T.A. (2003). *Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster*. *Nat. Struct. Biol.* 10, 995–1001.

Chen, J.-R., Xu, H.-Z., Yao, Y., and Qin, Z.-Y. (2015). *Prognostic value of epidermal growth factor receptor amplification and EGFRVIII in glioblastoma: meta-analysis*. *Acta Neurol. Scand.* n/a – n/a.

Chen, X., Abair, T.D., Ibanez, M.R., Su, Y., Frey, M.R., Dize, R.S., Polk, D.B., Singh, A.B., Harris, R.C., Zent, R., et al. (2007). *Integrin  $\alpha 1 \beta 1$  controls reactive oxygen species synthesis by negatively regulating epidermal growth factor receptor-mediated Rac activation*. *Mol. Cell Biol.* 27, 3313–3326.

Cheng, H.-B., Yue, W., Xie, C., Zhang, R.-Y., Hu, S.-S., and Wang, Z. (2013). *IDH1 mutation is associated with improved overall survival in patients with glioblastoma: a meta-analysis*. *Tumor Biol.* 34, 3555–3559.

Cianfrocca, M.E., Kimmel, K.A., Gallo, J., Cardoso, T., Brown, M.M., Hudes, G., Lewis, N., Weiner, L., Lam, G.N., Brown, S.C., et al. (2006). *Phase 1 trial of the antiangiogenic peptide ATN-161 (Ac-PHSCN-NH<sub>2</sub>), a beta integrin antagonist, in patients with solid tumours*. *Br. J. Cancer* 94, 1621–1626.

Ciardello, F., Caputo, R., Bianco, R., Damiano, V., Fontanini, G., Cuccato, S., Placido, S.D., Bianco, A.R., and Tortora, G. (2001). *Inhibition of Growth Factor Production and Angiogenesis in Human Cancer Cells by ZD1839 (Iressa), a Selective Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor*. *Clin. Cancer Res.* 7, 1459–1465.

Citri, A., and Yarden, Y. (2006). *EGF–ERBB signalling: towards the systems level*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 505–516.

Clark, K., Pankov, R., Travis, M.A., Askari, J.A., Mould, A.P., Craig, S.E., Newham, P., Yamada, K.M., and Humphries, M.J. (2005). A specific  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin conformation promotes directional integrin translocation and fibronectin matrix formation. *J. Cell Sci.* 118, 291–300.

Clark, P.A., Iida, M., Treisman, D.M., Kalluri, H., Ezhilan, S., Zorniak, M., Wheeler, D.L., and Kuo, J.S. (2012). Activation of Multiple ERBB Family Receptors Mediates Glioblastoma Cancer Stem-like Cell Resistance to EGFR-Targeted Inhibition. *Neoplasia N. Y. N* 14, 420–428.

Colin, C., Baeza, N., Bartoli, C., Fina, F., Eudes, N., Nanni, I., Martin, P., Ouafik, L., and Figarella-Branger, D. (2005). Identification of genes differentially expressed in glioblastoma versus pilocytic astrocytoma using Suppression Subtractive Hybridization. *Oncogene* 25, 2818–2826.

Combs, S.E., Schulz-Ertner, D., Roth, W., Herold-Mende, C., Debus, J., and Weber, K.-J. (2007). In Vitro Responsiveness of Glioma Cell Lines to Multimodality Treatment With Radiotherapy, Temozolomide, and Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition With Cetuximab. *Int. J. Radiat. Oncol.* 68, 873–882.

Cominelli, M., Grisanti, S., Mazzoleni, S., Branca, C., Buttolo, L., Furlan, D., Liserre, B., Bonetti, M.F., Medicina, D., Pellegrini, V., et al. (2015). EGFR Amplified and Overexpressing Glioblastomas and Association With Better Response to Adjuvant Metronomic Temozolomide. *J. Natl. Cancer Inst.* 107, djv041.

Cordes, N., Hansmeier, B., Beinke, C., Meineke, V., and Beuningen, D. van (2003). Irradiation differentially affects substratum-dependent survival, adhesion, and invasion of glioblastoma cell lines. *Br. J. Cancer* 89, 2122–2132.

Cosset, E.C., Godet, J., Entz-Werlé, N., Guérin, E., Guenot, D., Froelich, S., Bonnet, D., Pinel, S., Plenat, F., Chastagner, P., et al. (2012). Involvement of the TGF $\beta$  pathway in the regulation of  $\alpha 5 \beta 1$  integrins by caveolin-1 in human glioblastoma. *Int. J. Cancer* 131, 601–611.

**D**anen, E.H.J., Sonneveld, P., Brakebusch, C., Fässler, R., and Sonnenberg, A. (2002). The fibronectin-binding integrins  $\alpha 5 \beta 1$  and  $\alpha v \beta 3$  differentially modulate RhoA–GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J. Cell Biol.* 159, 1071–1086.

Dawson, J.P., Berger, M.B., Lin, C.-C., Schlessinger, J., Lemmon, M.A., and Ferguson, K.M. (2005). Epidermal Growth Factor Receptor Dimerization and Activation Require Ligand-Induced Conformational Changes in the Dimer Interface. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7734–7742.

Deyne, P.G.D., O'Neill, A., Resneck, W.G., Dmytrenko, G.M., Pumplin, D.W., and Bloch, R.J. (1998). The vitronectin receptor associates with clathrin-coated membrane domains via the cytoplasmic domain of its beta5 subunit. *J. Cell Sci.* 111, 2729–2740.

Diaz Miqueli, A., Rolff, J., Lemm, M., Fichtner, I., Perez, R., and Montero, E. (2009). Radiosensitisation of U87MG brain tumours by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Br. J. Cancer* 100, 950–958.

Dimitropoulos, K., Giannopoulou, E., Argyriou, A.A., Zolota, V., Petsas, T., Tsiata, E., and Kalofonos, H.P. (2010). The Effects of Anti-VEGFR and Anti-EGFR Agents on Glioma Cell Migration Through Implication of Growth Factors with Integrins. *Anticancer Res.* 30, 4987–4992.

Dingemans, A.-M.C., van den Boogaart, V., Vosse, B.A., van Suylen, R.-J., Griffioen, A.W., and Thijssen, V.L. (2010). Integrin expression profiling identifies integrin alpha5 and beta1 as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* 9, 152.

Dozynkiewicz, M.A., Jamieson, N.B., MacPherson, I., Grindlay, J., van den Berghe, P.V.E., von Thun, A., Morton, J.P., Gourley, C., Timpon, P., Nixon, C., et al. (2012). Rab25 and CLIC3 Collaborate to Promote Integrin Recycling from Late Endosomes/Lysosomes and Drive Cancer Progression. *Dev. Cell* 22, 131–145.

**E**isele, G., Wick, A., Eisele, A.-C., Clément, P.M., Tonn, J., Tabatabai, G., Ochsenbein, A., Schlegel, U., Neyns, B., Krex, D., et al. (2014). Cilengitide treatment of newly diagnosed glioblastoma patients does not alter patterns of progression. *J. Neurooncol.* 117, 141–145.

Eke, I., Storch, K., Krause, M., and Cordes, N. (2013). Cetuximab Attenuates Its Cytotoxic and Radiosensitizing Potential by Inducing Fibronectin Biosynthesis. *Cancer Res.* 73, 5869–5879.

Ekert, J.E., Johnson, K., Strake, B., Pardinas, J., Jarantow, S., Perkinson, R., and Colter, D.C. (2014). Three-Dimensional Lung Tumor Microenvironment Modulates Therapeutic Compound Responsiveness In Vitro – Implication for Drug Development. *PLoS ONE* 9.

Eller, J.L., Longo, S.L., Hicklin, D.J., and Canute, G.W. (2002). Activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 against glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 51, 1005–1013; discussion 1013–1014.

Escher, C., Cymer, F., and Schneider, D. (2009). Two GxxxG-Like Motifs Facilitate Promiscuous Interactions of the Human ErbB Transmembrane Domains. *J. Mol. Biol.* 389, 10–16.

Eva, R., Dassie, E., Caswell, P.T., Dick, G., ffrench-Constant, C., Norman, J.C., and Fawcett, J.W. (2010). Rab11 and Its Effector Rab Coupling Protein Contribute to the Trafficking of  $\beta$ 1 Integrins during Axon Growth in Adult Dorsal Root Ganglion Neurons and PC12 Cells. *J. Neurosci.* 30, 11654–11669.

**F**an, Q.-W., Cheng, C.K., Gustafson, W.C., Charron, E., Zipper, P., Wong, R.A., Chen, J., Lau, J., Knobbe-Thomsen, C., Weller, M., et al. (2013). EGFR Phosphorylates Tumor-Derived EGFRvIII Driving STAT3/5 and Progression in Glioblastoma. *Cancer Cell* 24, 438–449.

Farrell, C.J., and Plotkin, S.R. (2007). Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. *Neurol. Clin.* 25, 925–946, viii.

Faulkner, C., Palmer, A., Williams, H., Wragg, C., Haynes, H.R., White, P., DeSouza, R.-M., Williams, M., Hopkins, K., and Kurian, K.M. (2014). EGFR and EGFRvIII analysis in glioblastoma as therapeutic biomarkers. *Br. J. Neurosurg.* 29, 23–29.

Fenton, T.R., Nathanson, D., Ponte de Albuquerque, C., Kuga, D., Iwanami, A., Dang, J., Yang, H., Tanaka, K., Oba-Shinjo, S.M., Uno, M., et al. (2012). Resistance to EGF receptor inhibitors in glioblastoma mediated by phosphorylation of the PTEN tumor suppressor at tyrosine 240. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 14164–14169.

Fernandez-Fuente, G., Mollinedo, P., Grande, L., Vazquez-Barquero, A., and Fernandez-Luna, J.L. (2014). Culture Dimensionality Influences the Resistance of Glioblastoma Stem-like Cells to Multikinase Inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 13, 1664–1672.

Franceschi, E., Cavallo, G., Lonardi, S., Magrini, E., Tosoni, A., Grosso, D., Scopece, L., Blatt, V., Urbini, B., Pession, A., et al. (2007). Gefitinib in patients with progressive high-grade gliomas: a multicentre phase II study by Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia (GICNO). *Br. J. Cancer* 96, 1047–1051.

De Franceschi, N., Hamidi, H., Alanko, J., Sahgal, P., and Ivaska, J. (2015). Integrin traffic – the update. *J. Cell Sci.* 128, 839–852.

Francis, J.M., Zhang, C.-Z., Maire, C.L., Jung, J., Manzo, V.E., Adalsteinsson, V.A., Homer, H., Haidar, S., Blumenstiel, B., Peadarallu, C.S., et al. (2014). EGFR variant heterogeneity in glioblastoma resolved through single-nucleus sequencing. *Cancer Discov.* 4, 956–971.

Friedman, H.S., Prados, M.D., Wen, P.Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L.E., Yung, W.K.A., Paleologos, N., Nicholas, M.K., Jensen, R., et al. (2009). Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 4733–4740.

Furnari, F.B., Cloughesy, T.F., Cavenee, W.K., and Mischel, P.S. (2015). Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. *Nat. Rev. Cancer* 15, 302–310.

**G**ajiwala, K.S. (2013). EGFR: Tale of the C-terminal tail. *Protein Sci.* 22, 995–999.

Gangemi, R.M.R., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M.C., Malatesta, P., Ravetti, G.L., Zona, G.L., Daga, A., and Corte, G. (2009). SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 40–48.

Gao, M., Patel, R., Ahmad, I., Fleming, J., Edwards, J., McCracken, S., Sahadevan, K., Seywright, M., Norman, J., Sansom, O., et al. (2012). SPRY2 loss enhances ErbB trafficking and PI3K/AKT signalling to drive human and mouse prostate carcinogenesis. *EMBO Mol. Med.* 4, 776–790.

Garrett, T.P.J., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Zhu, H.-J., Walker, F., Frenkel, M.J., Hoyne, P.A., et al. (2002). Crystal Structure of a Truncated Epidermal Growth Factor Receptor Extracellular Domain Bound to Transforming Growth Factor  $\alpha$ . *Cell* 110, 763–773.

Gelderman, K.A., Tomlinson, S., Ross, G.D., and Gorter, A. (2004). Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* 25, 158–164.

Giannini, C., Sarkaria, J.N., Saito, A., Uhm, J.H., Galanis, E., Carlson, B.L., Schroeder, M.A., and James, C.D. (2005). Patient tumor EGFR and PDGFRA gene amplifications retained in an invasive intracranial xenograft model of glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncol.* 7, 164–176.

Gilbert, M.R., Kuhn, J., Lamborn, K.R., Lieberman, F., Wen, P.Y., Mehta, M., Cloughesy, T., Lassman, A.B., Deangelis, L.M., Chang, S., et al. (2012). Cilengitide in patients with recurrent glioblastoma: the results of NABTC 03-02, a phase II trial with measures of treatment delivery. *J. Neurooncol.* 106, 147–153.

Gingras, M.C., Roussel, E., Bruner, J.M., Branch, C.D., and Moser, R.P. (1995). Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J. Neuroimmunol.* 57, 143–153.

Goh, L.K., and Sorkin, A. (2013). Endocytosis of Receptor Tyrosine Kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a017459.

Goldstein, N.I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P., and Mendelsohn, J. (1995). Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin. Cancer Res.* 1, 1311–1318.

Goodman, S.L., and Picard, M. (2012). Integrins as therapeutic targets. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 405–412.

Grobben, B., Deyn, P.D., and Slegers, H. (2002). Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res.* 310, 257–270.

Grünwald, V., and Hidalgo, M. (2003). Developing Inhibitors of the Epidermal Growth Factor Receptor for Cancer Treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 851–867.

Gu, Z., Noss, E.H., Hsu, V.W., and Brenner, M.B. (2011). Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *J. Cell Biol.* 193, 61–70.

Gullick, W.J. (2001). The Type 1 growth factor receptors and their ligands considered as a complex system. *Endocr. Relat. Cancer* 8, 75–82.

Guo, W., and Giancotti, F.G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 816–826.

Guo, B., Gao, J., Zhan, J., and Zhang, H. (2015). Kindlin-2 interacts with and stabilizes EGFR and is required for EGF-induced breast cancer cell migration. *Cancer Lett.* 361, 271–281.

Guo, L., Qiu, Y., Ge, J., and Zhou, D. (2012). Glioblastoma Multiforme with Subcutaneous Metastases, Case Report and Literature Review. *J. Korean Neurosurg. Soc.* 52, 484–487.

Gurtner, K., Ebert, N., Pfitzmann, D., Eicheler, W., Zips, D., Baumann, M., and Krause, M. (2014). Effect of combined irradiation and EGFR/Erb-B inhibition with BIBW 2992 on proliferation and tumour cure in cell lines and xenografts. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 9.

**H**agemann, C., Anacker, J., Ernestus, R.-I., and Vince, G.H. (2012). A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. *World J. Clin. Oncol.* 3, 67–79.

Hanks, S.K., Calalb, M.B., Harper, M.C., and Patel, S.K. (1992). Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 8487–8491.

Harris, M. (2004). Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol.* 5, 292–302.

Hasselbalch, B., Lassen, U., Poulsen, H.S., and Stockhausen, M.-T. (2010a). Cetuximab Insufficiently Inhibits Glioma Cell Growth Due to Persistent EGFR Downstream Signaling. *Cancer Invest.* 28, 775–787.

Hasselbalch, B., Lassen, U., Hansen, S., Holmberg, M., Sørensen, M., Kosteljanetz, M., Broholm, H., Stockhausen, M.-T., and Poulsen, H.S. (2010b). Cetuximab, bevacizumab, and irinotecan for patients with primary glioblastoma and progression after radiation therapy and temozolomide: a phase II trial. *Neuro-Oncol.* 12, 508–516.

Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., et al. (2005). MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 997–1003.

Henriksen, L., Grandal, M.V., Knudsen, S.L.J., van Deurs, B., and Grøvdal, L.M. (2013). Internalization Mechanisms of the Epidermal Growth Factor Receptor after Activation with Different Ligands. *PLoS ONE* 8.

Hirata, E., Yukinaga, H., Kamioka, Y., Arakawa, Y., Miyamoto, S., Okada, T., Sahai, E., and Matsuda, M. (2012). In vivo fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion. *J. Cell Sci.* 125, 858–868.

Hirsh, V. (2015). Next-Generation Covalent Irreversible Kinase Inhibitors in NSCLC: Focus on Afatinib. *Biodrugs* 29, 167–183.

Holmes, K.M., Annala, M., Chua, C.Y.X., Dunlap, S.M., Liu, Y., Hugen, N., Moore, L.M., Cogdell, D., Hu, L., Nykter, M., et al. (2012). Insulin-like growth factor-binding protein 2-driven glioma progression is prevented by blocking a clinically significant integrin, integrin-linked kinase, and NF- $\kappa$ B network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3475–3480.

Horvath, C.M. (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem. Sci.* 25, 496–502.

Huang, C., Park, C.C., Hilsenbeck, S.G., Ward, R., Rimawi, M.F., Wang, Y., Shou, J., Bissell, M.J., Osborne, C.K., and Schiff, R. (2011a).  $\beta$ 1 integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast Cancer Res. BCR* 13, R84.

Huang, P.H., Xu, A.M., and White, F.M. (2009). Oncogenic EGFR Signaling Networks in Glioma. *Sci. Signal.* 2, re6–re6.

- Huang, S.M., Bock, J.M., and Harari, P.M. (1999). Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* 59, 1935–1940.
- Huang, W.-C., Chen, Y.-J., Li, L.-Y., Wei, Y.-L., Hsu, S.-C., Tsai, S.-L., Chiu, P.-C., Huang, W.-P., Wang, Y.-N., Chen, C.-H., et al. (2011b). Nuclear Translocation of Epidermal Growth Factor Receptor by Akt-dependent Phosphorylation Enhances Breast Cancer-resistant Protein Expression in Gefitinib-resistant Cells. *J. Biol. Chem.* 286, 20558–20568.
- Huck, L., Pontier, S.M., Zuo, D.M., and Muller, W.J. (2010).  $\beta 1$ -integrin is dispensable for the induction of ErbB2 mammary tumors but plays a critical role in the metastatic phase of tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15559–15564.
- Humphries, J.D., Askari, J.A., Zhang, X.-P., Takada, Y., Humphries, M.J., and Mould, A.P. (2000). Molecular Basis of Ligand Recognition by Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  II. SPECIFICITY OF Arg-Gly-Asp BINDING IS DETERMINED BY Trp157 OF THE  $\alpha$  SUBUNIT. *J. Biol. Chem.* 275, 20337–20345.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 110, 673–687.
- Ivascu, A., and Kubbies, M. (2006). Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J. Biomol. Screen.* 11, 922–932.
- Ivaska, J., and Heino, J. (2011). Cooperation between integrins and growth factor receptors in signaling and endocytosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 291–320.
- Janouskova, H., Maglott, A., Leger, D.Y., Bossert, C., Noulet, F., Guerin, E., Guenot, D., Pinel, S., Chastagner, P., Plenat, F., et al. (2012). Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  Plays a Critical Role in Resistance to Temozolomide by Interfering with the p53 Pathway in High-Grade Glioma. *Cancer Res.* 72, 3463–3470.
- Janouskova, H., Ray, A.-M., Noulet, F., Lelong-Rebel, I., Choulier, L., Schaffner, F., Lehmann, M., Martin, S., Teisinger, J., and Dontenwill, M. (2013). Activation of p53 pathway by Nutlin-3a inhibits the expression of the therapeutic target  $\alpha 5$  integrin in colon cancer cells. *Cancer Lett.* 336, 307–318.
- Jia, Y., Zeng, Z.-Z., Markwart, S.M., Rockwood, K.F., Ignatoski, K.M.W., Ethier, S.P., and Livant, D.L. (2004). Integrin Fibronectin Receptors in Matrix Metalloproteinase-1-Dependent Invasion by Breast Cancer and Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res.* 64, 8674–8681.
- Jiang, X., Huang, F., Marusyk, A., and Sorkin, A. (2003). Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Mol. Biol. Cell* 14, 858–870.
- Jo, U., Park, K.H., Whang, Y.M., Sung, J.S., Won, N.H., Park, J.K., and Kim, Y.H. (2014). EGFR endocytosis is a novel therapeutic target in lung cancer with wild-type EGFR. *Oncotarget* 5, 1265–1278.
- Johns, T.G., Stockert, E., Ritter, G., Jungbluth, A.A., Huang, H.-J.S., Cavenee, W.K., Smyth, F.E., Hall, C.M., Watson, N., Nice, E.C., et al. (2002). Novel monoclonal antibody specific for the de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) that also recognizes the EGFR expressed in cells containing amplification of the EGFR gene. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 98, 398–408.
- Johns, T.G., McKay, M.J., Cvrljevic, A.N., Gan, H.K., Taylor, C., Xu, H., Smyth, F.E., and Scott, A.M. (2010). MAb 806 Enhances the Efficacy of Ionizing Radiation in Glioma Xenografts Expressing the de2-7 Epidermal Growth Factor Receptor. *Int. J. Radiat. Oncol.* 78, 572–578.
- Johnson, L.A., and Sampson, J.H. (2010). Immunotherapy Approaches for Malignant Glioma From 2007 to 2009. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 10, 259–266.

- Jones, R.B., Gordus, A., Krall, J.A., and MacBeath, G. (2006). A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature* 439, 168–174.
- Jonker, D.J., O’Callaghan, C.J., Karapetis, C.S., Zalberg, J.R., Tu, D., Au, H.-J., Berry, S.R., Krahn, M., Price, T., Simes, R.J., et al. (2007). Cetuximab for the Treatment of Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 357, 2040–2048.
- Ju, L., and Zhou, C. (2013). Association of integrin beta1 and c-MET in mediating EGFR TKI gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell Int.* 13, 15.
- Jura, N., Endres, N.F., Engel, K., Deindl, S., Das, R., Lamers, M.H., Wemmer, D.E., Zhang, X., and Kuriyan, J. (2009). Mechanism for Activation of the EGF Receptor Catalytic Domain by the Juxtamembrane Segment. *Cell* 137, 1293–1307.
- K**anda, R., Kawahara, A., Watari, K., Murakami, Y., Sonoda, K., Maeda, M., Fujita, H., Kage, M., Uramoto, H., Costa, C., et al. (2013). Erlotinib Resistance in Lung Cancer Cells Mediated by Integrin  $\beta 1$ /Src/Akt-Driven Bypass Signaling. *Cancer Res.* 73, 6243–6253.
- Kang, M.R., Kim, M.S., Oh, J.E., Kim, Y.R., Song, S.Y., Seo, S.I., Lee, J.Y., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2009). Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 125, 353–355.
- Kazazic, M., Roepstorff, K., Johannessen, L.E., Pedersen, N.M., van Deurs, B., Stang, E., and Madshus, I.H. (2006). EGF-Induced Activation of the EGF Receptor Does Not Trigger Mobilization of Caveolae. *Traffic* 7, 1518–1527.
- Kesanakurti, D., Chetty, C., Rajasekhar Maddirela, D., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2012). Functional cooperativity by direct interaction between PAK4 and MMP-2 in the regulation of anoikis resistance, migration and invasion in glioma. *Cell Death Dis.* 3, e445.
- Kesanakurti, D., Chetty, C., Dinh, D.H., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2013a). Role of MMP-2 in the Regulation of IL-6/Stat3 Survival Signaling via Interaction With  $\alpha 5\beta 1$  Integrin in glioma. *Oncogene* 32, 327–340.
- Kesanakurti, D., Chetty, C., Dinh, D.H., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2013b). Role of MMP-2 in the regulation of IL-6/Stat3 survival signaling via interaction with  $\alpha 5\beta 1$  integrin in glioma. *Oncogene* 32, 327–340.
- Kiema, T., Lad, Y., Jiang, P., Oxley, C.L., Baldassarre, M., Wegener, K.L., Campbell, I.D., Ylänne, J., and Calderwood, D.A. (2006). The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol. Cell* 21, 337–347.
- Kim, M., Carman, C.V., and Springer, T.A. (2003). Bidirectional Transmembrane Signaling by Cytoplasmic Domain Separation in Integrins. *Science* 301, 1720–1725.
- Kodama, T., Ikeda, E., Okada, A., Ohtsuka, T., Shimoda, M., Shiomi, T., Yoshida, K., Nakada, M., Ohuchi, E., and Okada, Y. (2004). ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *Am. J. Pathol.* 165, 1743–1753.
- Koivunen, E., Wang, B., and Ruoslahti, E. (1995). Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* 13, 265–270.
- Kolenda, J., Jensen, S.S., Aaberg-Jessen, C., Christensen, K., Andersen, C., Brünner, N., and Kristensen, B.W. (2010). Effects of hypoxia on expression of a panel of stem cell and chemoresistance markers in glioblastoma-derived spheroids. *J. Neurooncol.* 103, 43–58.
- Kondapalli, K.C., Llongueras, J.P., Capilla-González, V., Prasad, H., Hack, A., Smith, C., Guerrero-Cázares, H., Quiñones-Hinojosa, A., and Rao, R. (2015). A leak pathway for luminal protons in endosomes drives oncogenic signalling in glioblastoma. *Nat. Commun.* 6.

Kong, D.-S., Kim, M.H., Park, W.-Y., Suh, Y.-L., Lee, J.-I., Park, K., Kim, J.H., and Nam, D.-H. (2008). The progression of gliomas is associated with cancer stem cell phenotype. *Oncol. Rep.* 19, 639–643.

Krakstad, C., and Chekenya, M. (2010). Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol. Cancer* 9, 135.

Kuwada, S.K., and Li, X. (2000). Integrin  $\alpha 5/\beta 1$  Mediates Fibronectin-dependent Epithelial Cell Proliferation through Epidermal Growth Factor Receptor Activation. *Mol. Biol. Cell* 11, 2485–2496.

Kwak, E.L., Sordella, R., Bell, D.W., Godin-Heymann, N., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Driscoll, D.R., Fidias, P., Lynch, T.J., et al. (2005). Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7665–7670.

**L**al, A., Lash, A.E., Altschul, S.F., Velculescu, V., Zhang, L., McLendon, R.E., Marra, M.A., Prange, C., Morin, P.J., Polyak, K., et al. (1999). A Public Database for Gene Expression in Human Cancers. *Cancer Res.* 59, 5403–5407.

Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 178–196.

Larson, R.S., Corbi, A.L., Berman, L., and Springer, T. (1989). Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *J. Cell Biol.* 108, 703–712.

Lassman, A.B., Rossi, M.R., Razier, J.R., Abrey, L.E., Lieberman, F.S., Grefe, C.N., Lamborn, K., Pao, W., Shih, A.H., Kuhn, J.G., et al. (2005). Molecular Study of Malignant Gliomas Treated with Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors: Tissue Analysis from North American Brain Tumor Consortium Trials 01-03 and 00-01. *Clin. Cancer Res.* 11, 7841–7850.

Lee, J.C., Vivanco, I., Beroukhim, R., Huang, J.H.Y., Feng, W.L., DeBiasi, R.M., Yoshimoto, K., King, J.C., Nghiemphu, P., Yuza, Y., et al. (2006). Epidermal Growth Factor Receptor Activation in Glioblastoma through Novel Missense Mutations in the Extracellular Domain. *PLoS Med* 3, e485.

Lee, J.O., Bankston, L.A., Arnaout, M.A., and Liddington, R.C. (1995). Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Struct. Lond. Engl.* 1993 3, 1333–1340.

Lee, S.-H., Hong, J.H., Park, H.K., Park, J.S., Kim, B.-K., Lee, J.-Y., Jeong, J.Y., Yoon, G.S., Inoue, M., Choi, G.-S., et al. Colorectal cancer-derived tumor spheroids retain the characteristics of original tumors. *Cancer Lett.*

Lemmon, M.A., Bu, Z., Ladbury, J.E., Zhou, M., Pinchasi, D., Lax, I., Engelman, D.M., and Schlessinger, J. (1997). Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J.* 16, 281–294.

Lesniak, D., Xu, Y., Deschenes, J., Lai, R., Thoms, J., Murray, D., Gosh, S., Mackey, J.R., Sabri, S., and Abdulkarim, B. (2009).  $\beta 1$ -Integrin Circumvents the Antiproliferative Effects of Trastuzumab in Human Epidermal Growth Factor Receptor-2–Positive Breast Cancer. *Cancer Res.* 69, 8620–8628.

Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S.A., Katz, M., Tsygankov, A.Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., et al. (1999). Ubiquitin Ligase Activity and Tyrosine Phosphorylation Underlie Suppression of Growth Factor Signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell* 4, 1029–1040.

Li, C., Iida, M., Dunn, E.F., Ghia, A.J., and Wheeler, D.L. (2009). Nuclear EGFR Contributes to Acquired Resistance to Cetuximab. *Oncogene* 28, 3801–3813.

Li, D., Ambrogio, L., Shimamura, T., Kubo, S., Takahashi, M., Chirieac, L., Padera, R., Shapiro, G., Baum, A., Himmelsbach, F., et al. (2008). BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* 27, 4702–4711.

- Li, G., Zhang, L., Chen, E., Wang, J., Jiang, X., Chen, J.H., Wickman, G., Amundson, K., Bergqvist, S., Zobel, J., et al. (2010). Dual Functional Monoclonal Antibody PF-04605412 Targets Integrin  $\alpha 5\beta 1$  and Elicits Potent Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Cancer Res.* 70, 10243–10254.
- Lièvre, A., Bachet, J.-B., Corre, D.L., Boige, V., Landi, B., Emile, J.-F., Côté, J.-F., Tomasic, G., Penna, C., Ducreux, M., et al. (2006). KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 66, 3992–3995.
- Little, S.E., Popov, S., Jury, A., Bax, D.A., Doey, L., Al-Sarraj, S., Jurgensmeier, J.M., and Jones, C. (2012). Receptor Tyrosine Kinase Genes Amplified in Glioblastoma Exhibit a Mutual Exclusivity in Variable Proportions Reflective of Individual Tumor Heterogeneity. *Cancer Res.* 72, 1614–1620.
- Lo, H.-W., Cao, X., Zhu, H., and Ali-Osman, F. (2008). Constitutively Activated STAT3 Frequently Coexpresses with Epidermal Growth Factor Receptor in High-Grade Gliomas and Targeting STAT3 Sensitizes Them to Iressa and Alkylators. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 6042–6054.
- Longva, K.E., Blystad, F.D., Stang, E., Larsen, A.M., Johannessen, L.E., and Madshus, I.H. (2002). Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J. Cell Biol.* 156, 843–854.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 97–109.
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70, 431–442.
- Luca, A.C., Mersch, S., Deenen, R., Schmidt, S., Messner, I., Schäfer, K.-L., Baldus, S.E., Huckenbeck, W., Piekorz, R.P., Knoefel, W.T., et al. (2013). Impact of the 3D Microenvironment on Phenotype, Gene Expression, and EGFR Inhibition of Colorectal Cancer Cell Lines. *PLoS ONE* 8, e59689.
- Lv, S., Teugels, E., Sadones, J., De Brakeleer, S., Duerinck, J., Du Four, S., Michotte, A., De Grève, J., and Neyns, B. (2012). Correlation of EGFR, IDH1 and PTEN status with the outcome of patients with recurrent glioblastoma treated in a phase II clinical trial with the EGFR-blocking monoclonal antibody cetuximab. *Int. J. Oncol.* 41, 1029–1035.
- Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., et al. (2004). Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350, 2129–2139.
- M**acDonald, T.J., Aguilera, D., and Kramm, C.M. (2011). Treatment of high-grade glioma in children and adolescents. *Neuro-Oncol.* 13, 1049–1058.
- Madshus, I.H., and Stang, E. (2009). Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *J. Cell Sci.* 122, 3433–3439.
- Maglott, A., Bartik, P., Cosgun, S., Klotz, P., Rondé, P., Fuhrmann, G., Takeda, K., Martin, S., and Dontenwill, M. (2006). The small  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells. *Cancer Res.* 66, 6002–6007.
- Marchi, N., Banjara, M., and Janigro, D. Blood–brain barrier, bulk flow, and interstitial clearance in epilepsy. *J. Neurosci. Methods.*
- Martin, S., Cosset, E.C., Terrand, J., Maglott, A., Takeda, K., and Dontenwill, M. (2009). Caveolin-1 regulates glioblastoma aggressiveness through the control of  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression and modulates glioblastoma

responsiveness to SJ749, an  $\alpha 5 \beta 1$  integrin antagonist. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1793, 354–367.

Martinkova, E., Maglott, A., Leger, D.Y., Bonnet, D., Stiborova, M., Takeda, K., Martin, S., and Dontenwill, M. (2010).  $\alpha 5 \beta 1$  integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells. *Int. J. Cancer* 127, 1240–1248.

Matsuo, T., Nishizuka, S.S., Ishida, K., Iwaya, T., Ikeda, M., and Wakabayashi, G. (2011). Analysis of the anti-tumor effect of cetuximab using protein kinetics and mouse xenograft models. *BMC Res. Notes* 4, 140.

Mattila, E., Marttila, H., Sahlberg, N., Kohonen, P., Tähtinen, S., Halonen, P., Perälä, M., and Ivaska, J. (2010). Inhibition of receptor tyrosine kinase signalling by small molecule agonist of T-cell protein tyrosine phosphatase. *BMC Cancer* 10, 7.

Mazzoleni, S., Politi, L.S., Pala, M., Cominelli, M., Franzin, A., Sergi, L.S., Falini, A., Palma, M.D., Bulfone, A., Poliani, P.L., et al. (2010). Epidermal Growth Factor Receptor Expression Identifies Functionally and Molecularly Distinct Tumor-Initiating Cells in Human Glioblastoma Multiforme and Is Required for Gliomagenesis. *Cancer Res.* 70, 7500–7513.

McKenzie, J.A., Liu, T., Goodson, A.G., and Grossman, D. (2010). Survivin enhances motility of melanoma cells by supporting Akt activation and  $\alpha 5$  integrin upregulation. *Cancer Res.* 70, 7927–7937.

Mellinghoff, I.K., Wang, M.Y., Vivanco, I., Haas-Kogan, D.A., Zhu, S., Dia, E.Q., Lu, K.V., Yoshimoto, K., Huang, J.H.Y., Chute, D.J., et al. (2005). Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 353, 2012–2024.

Mesti, T., Moltara, M.E., Boc, M., Rebersek, M., and Ocvirk, J. (2015). Bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma, a single institution experience. *Radiol. Oncol.* 49, 80–85.

Mishima, K., Johns, T.G., Luwor, R.B., Scott, A.M., Stockert, E., Jungbluth, A.A., Ji, X.-D., Suvarna, P., Voland, J.R., Old, L.J., et al. (2001). Growth Suppression of Intracranial Xenografted Glioblastomas Overexpressing Mutant Epidermal Growth Factor Receptors by Systemic Administration of Monoclonal Antibody (mAb) 806, a Novel Monoclonal Antibody Directed to the Receptor. *Cancer Res.* 61, 5349–5354.

Mitra, S.K., and Schlaepfer, D.D. (2006). Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 516–523.

Mitra, A.K., Sawada, K., Tiwari, P., Mui, K., Gwin, K., and Lengyel, E. (2011). Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and  $\alpha 5 \beta 1$ -integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene* 30, 1566–1576.

Morello, V., Cabodi, S., Sigismund, S., Camacho-Leal, M.P., Repetto, D., Volante, M., Papotti, M., Turco, E., and Defilippi, P. (2011).  $\beta 1$  integrin controls EGFR signaling and tumorigenic properties of lung cancer cells. *Oncogene* 30, 4087–4096.

Moro, L., Dolce, L., Cabodi, S., Bergatto, E., Erba, E.B., Smeriglio, M., Turco, E., Retta, S.F., Giuffrida, M.G., Venturino, M., et al. (2002). Integrin-induced Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Activation Requires c-Src and p130Cas and Leads to Phosphorylation of Specific EGF Receptor Tyrosines. *J. Biol. Chem.* 277, 9405–9414.

Morozevich, G.E., Kozlova, N.I., Ushakova, N.A., Preobrazhenskaya, M.E., and Berman, A.E. (2012). Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  simultaneously controls EGFR-dependent proliferation and Akt-dependent pro-survival signaling in epidermoid carcinoma cells. *Aging* 4, 368–374.

Mukthavaram, R., Ouyang, X., Saklecha, R., Jiang, P., Nomura, N., Pingle, S.C., Guo, F., Makale, M., and Kesari, S. (2015). Effect of the JAK2/STAT3 inhibitor SAR317461 on human glioblastoma tumorspheres. *J. Transl. Med.* 13, 269.

Muller, P.A.J., Caswell, P.T., Doyle, B., Iwanicki, M.P., Tan, E.H., Karim, S., Lukashchuk, N., Gillespie, D.A., Ludwig, R.L., Gosselin, P., et al. (2009). Mutant p53 Drives Invasion by Promoting Integrin Recycling. *Cell* 139, 1327–1341.

**N**abors, L.B., Mikkelsen, T., Hegi, M.E., Ye, X., Batchelor, T., Lesser, G., Peereboom, D., Rosenfeld, M.R., Olsen, J., Brem, S., et al. (2012). A safety run-in and randomized phase 2 study of cilengitide combined with chemoradiation for newly diagnosed glioblastoma (NABTT 0306). *Cancer* 118, 5601–5607.

Nakada, M., Okada, Y., and Yamashita, J. (2003). The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 8, e261–e269.

Nakada, M., Nambu, E., Furuyama, N., Yoshida, Y., Takino, T., Hayashi, Y., Sato, H., Sai, Y., Tsuji, T., Miyamoto, K., et al. (2013). Integrin  $\alpha 3$  is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. *Br. J. Cancer* 108, 2516–2524.

Nam, J.-M., Onodera, Y., Bissell, M.J., and Park, C.C. (2010). Breast Cancer Cells in Three-dimensional Culture Display an Enhanced Radioresponse after Coordinate Targeting of Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  and Fibronectin. *Cancer Res.* 70, 5238–5248.

Nathanson, D.A., Gini, B., Mottahedeh, J., Visnyei, K., Koga, T., Gomez, G., Eskin, A., Hwang, K., Wang, J., Masui, K., et al. (2014). Targeted Therapy Resistance Mediated by Dynamic Regulation of Extrachromosomal Mutant EGFR DNA. *Science* 343, 72–76.

Nevo, J., Mattila, E., Pellinen, T., Yamamoto, D.L., Sara, H., Iljin, K., Kallioniemi, O., Bono, P., Heikkilä, P., Joensuu, H., et al. (2009). Mammary-Derived Growth Inhibitor Alters Traffic of EGFR and Induces a Novel Form of Cetuximab Resistance. *Clin. Cancer Res.* 15, 6570–6581.

Neyns, B., Sadones, J., Joosens, E., Bouttens, F., Verbeke, L., Baurain, J.-F., D'Hondt, L., Strauven, T., Chaskis, C., Veld, P.I., et al. (2009). Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. *Ann. Oncol.* 20, 1596–1603.

Nishikawa, R., Ji, X.D., Harmon, R.C., Lazar, C.S., Gill, G.N., Cavenee, W.K., and Huang, H.J. (1994). A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7727–7731.

Nishikawa, R., Sugiyama, T., Narita, Y., Furnari, F., Cavenee, W.K., and Matsutani, M. (2004). Immunohistochemical analysis of the mutant epidermal growth factor, deltaEGFR, in glioblastoma. *Brain Tumor Pathol.* 21, 53–56.

Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., and Salomon, D.S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366, 2–16.

**O**gier, C., Bernard, A., Chollet, A.-M., LE Diguardher, T., Hanessian, S., Charton, G., Khrestchatisky, M., and Rivera, S. (2006). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) regulates astrocyte motility in connection with the actin cytoskeleton and integrins. *Glia* 54, 272–284.

Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.-H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., et al. (2002). Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains. *Cell* 110, 775–787.

Ohashi, K., Maruvka, Y.E., Michor, F., and Pao, W. (2013). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistant disease. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 1070–1080.

Okamoto, Y., Di Patre, P.-L., Burkhard, C., Horstmann, S., Jourde, B., Fahey, M., Schüler, D., Probst-Hensch, N.M., Yasargil, M.G., Yonekawa, Y., et al. (2004). Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 108, 49–56.

Okazaki, Y., Ohno, H., Takase, K., Ochiai, T., and Saito, T. (2000). Cell Surface Expression of Calnexin, a Molecular Chaperone in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 275, 35751–35758.

Olar, A., and Aldape, K.D. (2014). Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J. Pathol.* 232, 165–177.

Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., and Hynes, N.E. (2000). NEW EMBO MEMBERS' REVIEW. *EMBO J.* 19, 3159–3167.

Omuro A, and DeAngelis LM (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review. *JAMA* 310, 1842–1850.

Orlichenko, L., Huang, B., Krueger, E., and McNiven, M.A. (2006). Epithelial growth factor-induced phosphorylation of caveolin 1 at tyrosine 14 stimulates caveolae formation in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 281, 4570–4579.

Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Stroup, N.E., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2013). CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncol.* 15 Suppl 2, ii1–ii56.

**P**augh, B.S., Qu, C., Jones, C., Liu, Z., Adamowicz-Brice, M., Zhang, J., Bax, D.A., Coyle, B., Barrow, J., Hargrave, D., et al. (2010). Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 3061–3068.

Pellinen, T., Arjonen, A., Vuoriluoto, K., Kallio, K., Fransén, J.A.M., and Ivaska, J. (2006). Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of  $\beta$ 1-integrins. *J. Cell Biol.* 173, 767–780.

Peschard, P., Kozlov, G., Lin, T., Mirza, I.A., Berghuis, A.M., Lipkowitz, S., Park, M., and Gehring, K. (2007). Structural Basis for Ubiquitin-Mediated Dimerization and Activation of the Ubiquitin Protein Ligase Cbl-b. *Mol. Cell* 27, 474–485.

Petrás, M., Lajtos, T., Friedländer, E., Klekner, Á., Pintye, É., Feuerstein, B.G., Szöllösi, J., and Vereb, G. (2013). Molecular interactions of ErbB1 (EGFR) and integrin- $\beta$ 1 in astrocytoma frozen sections predict clinical outcome and correlate with Akt-mediated in vitro radioresistance. *Neuro-Oncol.* 15, 1027–1040.

Pillay, V., Allaf, L., Wilding, A.L., Donoghue, J.F., Court, N.W., Greenall, S.A., Scott, A.M., and Johns, T.G. (2009). The Plasticity of Oncogene Addiction: Implications for Targeted Therapies Directed to Receptor Tyrosine Kinases. *Neoplasia N. Y. N* 11, 448–458.

Pinel, S., Mriouah, J., Vandamme, M., Chateau, A., Plénat, F., Guérin, E., Taillandier, L., Bernier-Chastagner, V., Merlin, J.-L., and Chastagner, P. (2013). Synergistic antitumor effect between gefitinib and fractionated irradiation in anaplastic oligodendrogliomas cannot be predicted by the Egfr signaling activity. *PLoS One* 8, e68333.

Pinkas-Kramarski, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., Klapper, L., Lavi, S., Seger, R., Ratzkin, B.J., Sela, M., et al. (1996). Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* 15, 2452–2467.

Plow, E.F., Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J.W. (2000). Ligand Binding to Integrins. *J. Biol. Chem.* 275, 21785–21788.

**Qian, F., Zhang, Z.-C., Wu, X.-F., Li, Y.-P., and Xu, Q. (2005).** Interaction between integrin  $\alpha 5$  and fibronectin is required for metastasis of B16F10 melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 1269–1275.

**Raizer, J.J., Abrey, L.E., Lassman, A.B., Chang, S.M., Lamborn, K.R., Kuhn, J.G., Yung, W.K.A., Gilbert, M.R., Aldape, K.A., Wen, P.Y., et al. (2010).** A phase II trial of erlotinib in patients with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy. *Neuro-Oncol.* 12, 95–103.

**Ramakrishnan, V., Bhaskar, V., Law, D.A., Wong, M.H.L., DuBridge, R.B., Breinberg, D., O'Hara, C., Powers, D.B., Liu, G., Grove, J., et al. (2006).** Preclinical evaluation of an anti- $\alpha 5\beta 1$  integrin antibody as a novel anti-angiogenic agent. *J. Exp. Ther. Oncol.* 5, 273–286.

**Ramnarain, D.B., Park, S., Lee, D.Y., Hatanpaa, K.J., Scoggin, S.O., Otu, H., Libermann, T.A., Raisanen, J.M., Ashfaq, R., Wong, E.T., et al. (2006).** Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. *Cancer Res.* 66, 867–874.

**Ramsay, A.G., Keppler, M.D., Jazayeri, M., Thomas, G.J., Parsons, M., Violette, S., Weinreb, P., Hart, I.R., and Marshall, J.F. (2007).** HS1-Associated Protein X-1 Regulates Carcinoma Cell Migration and Invasion via Clathrin-Mediated Endocytosis of Integrin  $\alpha v\beta 6$ . *Cancer Res.* 67, 5275–5284.

**Rappoport, J.Z., and Simon, S.M. (2009).** Endocytic trafficking of activated EGFR is AP-2 dependent and occurs through preformed clathrin spots. *J. Cell Sci.* 122, 1301–1305.

**Ray, A.-M., Schaffner, F., Janouskova, H., Noulet, F., Rognan, D., Lelong-Rebel, I., Choulier, L., Blandin, A.-F., Lehmann, M., Martin, S., et al. (2014).** Single cell tracking assay reveals an opposite effect of selective small non-peptidic  $\alpha 5\beta 1$  or  $\alpha v\beta 3/85$  integrin antagonists in U87MG glioma cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1840, 2978–2987.

**Reardon, D.A., Nabors, L.B., Stupp, R., and Mikkelsen, T. (2008).** Cilengitide: an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide with promising activity for glioblastoma multiforme. *Expert Opin. Investig. Drugs* 17, 1225–1235.

**Reardon, D.A., Nabors, L.B., Mason, W.P., Perry, J.R., Shapiro, W., Kavan, P., Mathieu, D., Phuphanich, S., Cseh, A., Fu, Y., et al. (2015).** Phase I/randomized phase II study of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, with or without protracted temozolomide in adults with recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 17, 430–439.

**Reifenberger, G., and Louis, D.N. (2003).** Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 111–126.

**Ricart, A.D., Tolcher, A.W., Liu, G., Holen, K., Schwartz, G., Albertini, M., Weiss, G., Yazji, S., Ng, C., and Wilding, G. (2008).** Volociximab, a Chimeric Monoclonal Antibody that Specifically Binds  $\alpha 5\beta 1$  Integrin: A Phase I, Pharmacokinetic, and Biological Correlative Study. *Clin. Cancer Res.* 14, 7924–7929.

**Rich, J.N., Reardon, D.A., Peery, T., Dowell, J.M., Quinn, J.A., Penne, K.L., Wikstrand, C.J., Van Duyn, L.B., Dancey, J.E., McLendon, R.E., et al. (2004).** Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22, 133–142.

**Rieken, S., Habermehl, D., Mohr, A., Wuerth, L., Lindel, K., Weber, K., Debus, J., and Combs, S.E. (2011).** Targeting  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha v\beta 5$  inhibits photon-induced hypermigration of malignant glioma cells. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 6, 132.

**Riemenschneider, M.J., Mueller, W., Betensky, R.A., Mohapatra, G., and Louis, D.N. (2005).** In Situ Analysis of Integrin and Growth Factor Receptor Signaling Pathways in Human Glioblastomas Suggests Overlapping Relationships with Focal Adhesion Kinase Activation. *Am. J. Pathol.* 167, 1379–1387.

**Roepstorff, K., Grøvdal, L., Grandal, M., Lerdrup, M., and Deurs, B. van (2008).** Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem. Cell Biol.* 129, 563–578.

Romeo, Y., Zhang, X., and Roux, P.P. (2012). Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochem. J.* 441, 553–569.

Roskoski, R. (2012). MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 5–10.

Roskoski Jr., R. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.* 79, 34–74.

Roy, L.-O., Poirier, M.-B., and Fortin, D. (2014). Transforming growth factor-beta and its implication in the malignancy of gliomas. *Target. Oncol.* 10, 1–14.

Rupp, P.A., Visconti, R.P., Cziráok, A., Cheresch, D.A., and Little, C.D. (2008). Matrix Metalloproteinase 2-Integrin  $\alpha$ 3 Binding Is Required for Mesenchymal Cell Invasive Activity but Not Epithelial Locomotion: A Computational Time-Lapse Study. *Mol. Biol. Cell* 19, 5529–5540.

**S**anborn, J.Z., Salama, S.R., Grifford, M., Brennan, C.W., Mikkelsen, T., Jhanwar, S., Katzman, S., Chin, L., and Haussler, D. (2013). Double minute chromosomes in glioblastoma multiforme are revealed by precise reconstruction of oncogenic amplicons. *Cancer Res.* 73, 6036–6045.

Sawada, K., Mitra, A.K., Radjabi, A.R., Bhaskar, V., Kistner, E.O., Tretiakova, M., Jagadeeswaran, S., Montag, A., Becker, A., Kenny, H.A., et al. (2008). Loss of E-Cadherin Promotes Ovarian Cancer Metastasis via  $\alpha$ 5-Integrin, which Is a Therapeutic Target. *Cancer Res.* 68, 2329–2339.

Scheen, A.J. (2009). [International classification of various types of monoclonal antibodies]. *Rev. Médicale Liège* 64, 244–247.

Schulte, A., Günther, H.S., Martens, T., Zapf, S., Riethdorf, S., Wülfing, C., Stoupiec, M., Westphal, M., and Lamszus, K. (2012). Glioblastoma Stem-like Cell Lines with Either Maintenance or Loss of High-Level EGFR Amplification, Generated via Modulation of Ligand Concentration. *Clin. Cancer Res.* 18, 1901–1913.

Sebolt-Leopold, J.S. (2000). Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. *Oncogene* 19, 6594–6599.

Seguin, L., Kato, S., Franovic, A., Camargo, M.F., Lesperance, J., Elliott, K.C., Yebra, M., Mielgo, A., Lowy, A.M., Husain, H., et al. (2014). An integrin  $\beta$ 3–KRAS–RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition. *Nat. Cell Biol.* 16, 457–468.

Serres, E., Debarbieux, F., Stanchi, F., Maggiorella, L., Grall, D., Turchi, L., Burel-Vandenbos, F., Figarella-Branger, D., Virolle, T., Rougon, G., et al. (2014). Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane in vitro and orthotopic tumor growth in mice. *Oncogene* 33, 3451–3462.

Shao, H., Cheng, H.Y., Cook, R.G., and Tweardy, D.J. (2003). Identification and characterization of signal transducer and activator of transcription 3 recruitment sites within the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 63, 3923–3930.

Shattil, S.J., Kashiwagi, H., and Pampori, N. (1998). Integrin Signaling: The Platelet Paradigm. *Blood* 91, 2645–2657.

Shi, F., and Sottile, J. (2008). Caveolin-1-dependent  $\beta$ 1 integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover. *J. Cell Sci.* 121, 2360–2371.

Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., Makino, K., Saya, H., Hirano, H., Kuratsu, J., et al. (2003). Prognostic Value of Epidermal Growth Factor Receptor in Patients with Glioblastoma Multiforme. *Cancer Res.* 63, 6962–6970.

- Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Fiore, P.P.D., and Polo, S. (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2760–2765.
- Silver, D.J., Siebzehnruhl, F.A., Schildts, M.J., Yachnis, A.T., Smith, G.M., Smith, A.A., Scheffler, B., Reynolds, B.A., Silver, J., and Steindler, D.A. (2013). Chondroitin sulfate proteoglycans potently inhibit invasion and serve as a central organizer of the brain tumor microenvironment. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 15603–15617.
- Singh, A.B., and Harris, R.C. (2005). Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell. Signal.* 17, 1183–1193.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63, 5821–5828.
- Smith, M.A., Hall, R., Fisher, K., Haake, S.M., Khalil, F., Schabath, M.B., Vuaroqueaux, V., Fiebig, H.-H., Altiok, S., Chen, Y.A., et al. (2015). Annotation of human cancers with EGFR signaling-associated protein complexes using proximity ligation assays. *Sci. Signal.* 8, ra4–ra4.
- Solomon, M.T., Miranda, N., Jorrín, E., Chon, I., Marinello, J.J., Alert, J., Lorenzo-Luaces, P., and Crombet, T. (2014). Nimotuzumab in combination with radiotherapy in high grade glioma patients. *Cancer Biol. Ther.* 15, 504–509.
- Stoeltzing, O., Liu, W., Reinmuth, N., Fan, F., Parry, G.C., Parikh, A.A., McCarty, M.F., Bucana, C.D., Mazar, A.P., and Ellis, L.M. (2003). Inhibition of integrin  $\alpha 5\beta 1$  function with a small peptide (ATN-161) plus continuous 5-FU infusion reduces colorectal liver metastases and improves survival in mice. *Int. J. Cancer* 104, 496–503.
- Stommel, J.M., Kimmelman, A.C., Ying, H., Nabioullin, R., Ponugoti, A.H., Wiedemeyer, R., Stegh, A.H., Bradner, J.E., Ligon, K.L., Brennan, C., et al. (2007). Coactivation of Receptor Tyrosine Kinases Affects the Response of Tumor Cells to Targeted Therapies. *Science* 318, 287–290.
- Strojnik, T., Røslund, G.V., Sakariassen, P.O., Kavalari, R., and Lah, T. (2007). Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surg. Neurol.* 68, 133–143; discussion 143–144.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Neyns, B., Goldbrunner, R., Schlegel, U., Clement, P.M.J., Grabenbauer, G.G., Ochsenbein, A.F., Simon, M., Dietrich, P.-Y., et al. (2010). Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 2712–2718.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Gorlia, T., Erridge, S.C., Perry, J., Hong, Y.-K., Aldape, K.D., Lhermitte, B., Pietsch, T., Grujicic, D., et al. (2014). Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 15, 1100–1108.
- Swanson, J.A. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 639–649.
- Swanson, J.A., and Watts, C. (1995). Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5, 424–428.
- Szerlip, N.J., Pedraza, A., Chakravarty, D., Azim, M., McGuire, J., Fang, Y., Ozawa, T., Holland, E.C., Huse, J.T., Jhanwar, S., et al. (2012). Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3041–3046.

**T**adokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., Pereda, J.M. de, Ginsberg, M.H., and Calderwood, D.A. (2003). Talin Binding to Integrin  $\beta$  Tails: A Final Common Step in Integrin Activation. *Science* 302, 103–106.

Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol.* 8, 215.

Takagi, J., and Springer, T.A. (2002). Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol. Rev.* 186, 141–163.

Taylor, S.S., Keshwani, M.M., Steichen, J.M., and Kornev, A.P. (2012a). Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367, 2517–2528.

Taylor, T.E., Furnari, F.B., and Cavenee, W.K. (2012b). Targeting EGFR for Treatment of Glioblastoma: Molecular Basis to Overcome Resistance. *Curr. Cancer Drug Targets* 12, 197–209.

Teckchandani, A., Toida, N., Goodchild, J., Henderson, C., Watts, J., Wollscheid, B., and Cooper, J.A. (2009). Quantitative proteomics identifies a Dab2/integrin module regulating cell migration. *J. Cell Biol.* 186, 99–111.

Tomas, A., Futter, C.E., and Eden, E.R. (2014). EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol.* 24, 26–34.

Toquet, C., Colson, A., Jarry, A., Bezieau, S., Volteau, C., Boisseau, P., Merlin, D., Laboissee, C.L., and Mosnier, J.-F. (2012). ADAM15 to  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin switch in colon carcinoma cells: A late event in cancer progression associated with tumor dedifferentiation and poor prognosis. *Int. J. Cancer* 130, 278–287.

**U**hm, J.H., Ballman, K.V., Wu, W., Giannini, C., Krauss, J.C., Buckner, J.C., James, C.D., Scheithauer, B.W., Behrens, R.J., Flynn, P.J., et al. (2011). Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed Grade 4 astrocytoma: Mayo/North Central Cancer Treatment Group Study N0074. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 80, 347–353.

**V**aldembri, D., Caswell, P.T., Anderson, K.I., Schwarz, J.P., König, I., Astanina, E., Caccavari, F., Norman, J.C., Humphries, M.J., Bussolino, F., et al. (2009). Neuropilin-1/GIPC1 Signaling Regulates  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Integrin Traffic and Function in Endothelial Cells. *PLoS Biol.* 7.

Del Vecchio, C.A., Giacomini, C.P., Vogel, H., Jensen, K.C., Florio, T., Merlo, A., Pollack, J.R., and Wong, A.J. (2013). EGFRvIII gene rearrangement is an early event in glioblastoma tumorigenesis and expression defines a hierarchy modulated by epigenetic mechanisms. *Oncogene* 32, 2670–2681.

Vehlow, A., and Cordes, N. (2013). Invasion as target for therapy of glioblastoma multiforme. *Biochim. Biophys. Acta* 1836, 236–244.

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110.

Vial, D., and McKeown-Longo, P.J. (2012). Epidermal Growth Factor (EGF) Regulates  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Integrin Activation State in Human Cancer Cell Lines through the p90RSK-dependent Phosphorylation of Filamin A. *J. Biol. Chem.* 287, 40371–40380.

Vieira, A.V., Lamaze, C., and Schmid, S.L. (1996). Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 274, 2086–2089.

Vorup-Jensen, T., Waldron, T.T., Astrof, N., Shimaoka, M., and Springer, T.A. (2007). The connection between metal ion affinity and ligand affinity in integrin I domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1774, 1148–1155.

**W**alter, F.R., Veszelka, S., Pásztói, M., Péterfi, Z.A., Tóth, A., Rákhely, G., Cervenak, L., Ábrahám, C.S., and Deli, M.A. (2015). Tasmilifene modifies brain endothelial functions and opens the blood-brain/blood-glioma barrier. *J. Neurochem.* n/a – n/a.

WANG, Y.F., XIANG, X., PEI, X., LI, S., TANG, C., WANG, L., and KE, Z.-F. (2014). Lung adenocarcinoma harboring L858R and T790M mutations in epidermal growth factor receptor, with poor response to gefitinib: A case report. *Oncol. Lett.* 8, 1039–1042.

Westphal, M., Hilt, D.C., Bortey, E., Delavault, P., Olivares, R., Warnke, P.C., Whittle, I.R., Jääskeläinen, J., and Ram, Z. (2003). A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-Oncol.* 5, 79–88.

Westphal, M., Heese, O., Steinbach, J.P., Schnell, O., Schackert, G., Mehdorn, M., Schulz, D., Simon, M., Schlegel, U., Senft, C., et al. (2015). A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 51, 522–532.

Wick, W., Weller, M., Weiler, M., Batchelor, T., Yung, A.W.K., and Platten, M. (2011). Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 13, 566–579.

Williams, K.C., and Coppelino, M.G. (2014). SNARE-dependent interaction of Src, EGFR and  $\beta 1$  integrin regulates invadopodia formation and tumor cell invasion. *J. Cell Sci.* 127, 1712–1725.

Wu, C.J., O'Rourke, D.M., Feng, G.S., Johnson, G.R., Wang, Q., and Greene, M.I. (2001). The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for mediating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by growth factors. *Oncogene* 20, 6018–6025.

**X**iao, T., Takagi, J., Collier, B.S., Wang, J.-H., and Springer, T.A. (2004). Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 432, 59–67.

Xiong, J.-P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S.L., and Arnaout, M.A. (2002). Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin  $\alpha V\beta 3$  in Complex with an Arg-Gly-Asp Ligand. *Science* 296, 151–155.

**Y**amamoto, T., Nishida, T., Miyajima, N., Kawai, S., Ooi, T., and Toyoshima, K. (1983). The *erbB* gene of avian erythroblastosis virus is a member of the *src* gene family. *Cell* 35, 71–78.

Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., et al. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* 360, 765–773.

Yao, Y., Chan, A.K.-Y., Qin, Z.Y., Chen, L.C., Zhang, X., Pang, J.C.-S., Li, H.M., Wang, Y., Mao, Y., Ng, H.-K., et al. (2013). Mutation analysis of IDH1 in paired gliomas revealed IDH1 mutation was not associated with malignant progression but predicted longer survival. *PLoS One* 8, e67421.

Ye, F., Kim, C., and Ginsberg, M.H. (2011). Molecular Mechanism of Inside-out Integrin Regulation. *J. Thromb. Haemost. JTH* 9, 20–25.

Yelskaya, Z., Carrillo, V., Dubisz, E., Gulzar, H., Morgan, D., and Mahajan, S.S. (2013). Synergistic Inhibition of Survival, Proliferation, and Migration of U87 Cells with a Combination of LY341495 and Iressa. *PLoS ONE* 8.

Ying, H., Zheng, H., Scott, K., Wiedemeyer, R., Yan, H., Lim, C., Huang, J., Dhakal, S., Ivanova, E., Xiao, Y., et al. (2010). Mig-6 controls EGFR trafficking and suppresses gliomagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6912–6917.

Yotsumoto, F., Yagi, H., Suzuki, S.O., Oki, E., Tsujioka, H., Hachisuga, T., Sonoda, K., Kawarabayashi, T., Mekada, E., and Miyamoto, S. (2008). Validation of HB-EGF and amphiregulin as targets for human cancer therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 555–561.

Yu, Z., Xie, G., Zhou, G., Cheng, Y., Zhang, G., Yao, G., Chen, Y., Li, Y., and Zhao, G. (2015). NVP-BE2235, a novel dual PI3K-mTOR inhibitor displays anti-glioma activity and reduces chemoresistance to temozolomide in human glioma cells. *Cancer Lett.* 367, 58–68.

**Z**hang, K., and Chen, J. (2012). The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adhes. Migr.* 6, 20–29.

Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A., and Kuriyan, J. (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 125, 1137–1149.

Zhao, L., Xu, K., Wang, S., Hu, B., and Chen, L. (2012). Pathological significance of epidermal growth factor receptor expression and amplification in human gliomas. *Histopathology* 61, 726–736.

Zhu, H., Acquaviva, J., Ramachandran, P., Boskovitz, A., Woolfenden, S., Pfannl, R., Bronson, R.T., Chen, J.W., Weissleder, R., Housman, D.E., et al. (2009). Oncogenic EGFR signaling cooperates with loss of tumor suppressor gene functions in gliomagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 2712–2716.

Zouaoui, S., Darlix, A., Fabbro-Peray, P., Mathieu-Daudé, H., Rigau, V., Fabbro, M., Bessaoud, F., Taillandier, L., Ducray, F., Bauchet, F., et al. (2014). Oncological patterns of care and outcomes for 265 elderly patients with newly diagnosed glioblastoma in France. *Neurosurg. Rev.* 37, 415–424.

# Anne-Florence BLANDIN

## Rôle de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ dans la biologie du glioblastome et dans la résistance aux thérapies anti-EGFR

### RESUME :

Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur cérébrale primaire la plus fréquente. Une dérégulation des voies de signalisation de l'EGFR et un fort potentiel invasif sont les caractéristiques principales du GBM. Malheureusement, les essais cliniques impliquant des thérapies anti-EGFR dans le traitement des GBM demeurent inefficaces. Nous avons précédemment montré que le récepteur de la fibronectine, l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ , est associé avec un mauvais pronostic et une résistance des patients au temodal. Les intégrines peuvent coopérer avec les récepteurs aux facteurs de croissance et ainsi amplifier leur potentiel oncogénique. Ici, nous avons cherché à déterminer le rôle de l'intégrine  $\alpha 5$  dans la résistance aux thérapies anti-EGFR. Utilisant la lignée U87 de GBM, on a dans un premier temps confirmé que l'activation de l'intégrine sous l'influence de la fibronectine, potentialisait la signalisation de l'EGFR. La perte d'expression d' $\alpha 5$  sensibilise les cellules U87 aux anti-EGFR (cetuximab, gefitinib) dans des essais de clonogénicité en soft agar. L'expression d' $\alpha 5$  favorise la résistance aux 2 drogues lors de la migration cellulaire. Pour aller plus loin, nous avons développé un nouveau test basé sur la quantification de l'évasion cellulaire à partir d'une sphère tumorale. La perte d' $\alpha 5$  augmente la sensibilité des cellules U87 à 2 TKI réversibles spécifiques de l'EGFR, gefitinib et erlotinib, mais n'a pas d'effet sur l'efficacité du lapatinib, un TKI irréversible ciblant EGFR, ErbB2, ErbB3 et ErbB4. Grâce à la microscopie confocale, nous avons montré l'effet important du gefitinib sur l'endocytose de l'intégrine et de l'EGFR. Ces résultats suggèrent que l'expression d' $\alpha 5$  favorise la résistance aux TKI par l'activation des voies de signalisation des récepteurs ErbB ou en contrôlant le trafic membranaire de l'EGFR. On a aussi montré que pour favoriser l'adhésion cellulaire, l'intégrine  $\alpha 5$  stimulait la fibrillogénèse. Dans les cellules migrant à distance de la sphère, l'intégrine  $\alpha 5$  est strictement engagée dans des adhésions cellule-substrat contenant la protéine FAK activée. Nos résultats soulignent le rôle central du couple fibronectine/ intégrine  $\alpha 5$  dans l'invasivité du GBM et la résistance aux thérapies anti-EGFR.

Mots clés : Lignées cellulaires de glioblastome, intégrine, fibronectine, récepteurs aux facteurs de croissance, résistance aux thérapies ciblées, migration cellulaire, endocytose

### RESUME EN ANGLAIS :

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary brain tumor. Alteration of the EGFR pathway and high invasive potential are hallmarks of GBM. Unfortunately, trials using anti-EGFR therapies for the treatment of GBM reveal limited efficacy. We previously showed that overexpression of the fibronectin receptor,  $\alpha 5 \beta 1$  integrin, is associated with a poor prognosis for patients and is responsible for chemoresistance to temodal. Integrins can cross-talk with growth factor receptors and amplified their oncogenic activity. Here, we sought to determine the potential role of  $\alpha 5$  integrin in resistance to anti-EGFR therapy. Using U87 GBM cell line, we first confirmed that fibronectin-mediated integrin activation potentiated EGFR signaling. Loss of  $\alpha 5$  integrin expression sensitized U87 cells to anti-EGFR drugs (cetuximab, gefitinib) in soft agar clonogenic assay.  $\alpha 5$  expression can trigger resistance to both drugs on cell migration. To go further, we developed a new assay based on the quantification of cell evasion from tumor spheroids.  $\alpha 5$  depletion increased U87 cell sensitivity to gefitinib and erlotinib, 2 EGFR-selective reversible TKI, but had no effect on lapatinib efficacy, an irreversible TKI that target EGFR, ErbB2, ErbB3 and ErbB4. Confocal microscopy revealed a strong impact of gefitinib on EGFR and integrin endocytosis. These results suggested that  $\alpha 5$  expression may trigger resistance to TKI either by activating ErbB pathways or by controlling EGFR membrane trafficking. We also showed that to promote cell adhesion,  $\alpha 5$  integrin stimulated fibronectin fibrillogenesis. As cells moved away from the spheroids,  $\alpha 5$  became strictly engaged in cell-substratum adhesion sites where it recruited activated FAK. Our work highlights the pivotal role of fibronectin/ $\alpha 5 \beta 1$  integrin in invasivity of GBM and resistance to anti-EGFR drugs.

Mots clés: Glioblastoma cell lines, integrin, fibronectin, growth factor receptors, resistance toward targeted therapies, cell migration, endocytosis