



**HAL**  
open science

# Mécanotransduction des cellules souches de glioblastome dans un nouveau modèle de culture tridimensionnel : implication de la MGAT5 dans la perception de l'environnement mécanique

Emilie Marhuenda

## ► To cite this version:

Emilie Marhuenda. Mécanotransduction des cellules souches de glioblastome dans un nouveau modèle de culture tridimensionnel : implication de la MGAT5 dans la perception de l'environnement mécanique. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT091 . tel-02056673

**HAL Id: tel-02056673**

**<https://theses.hal.science/tel-02056673>**

Submitted on 4 Mar 2019

**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.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale Sciences Biologiques et Chimiques pour la Santé (ED168)

Unité de recherche INSERM U1051

**Mécanotransduction des cellules souches de glioblastome  
dans un nouveau modèle de culture tridimensionnel :  
Implication de la MGAT5 dans la perception de  
l'environnement mécanique.**

Présentée par Emilie MARHUENDA

Le 28 Novembre 2018

Sous la direction du Pr Norbert BAKALARA

Et du Pr David CORNU

Devant le jury composé de

Michel DESARMENIEN, DR, Institut de Génomique Fonctionnelle, UMR 5203

Damien RICARD, Pr, UMR 8257 MD 4-CNRS-SSA- Université Paris Descartes Catherine

Catherine PICART, Pr, Grenoble Institute of Technology, CNRS-UMR 5628

Irma MACHUCA-GAYET, CR, Faculté de Médecine de Lyon, UMR 1033

Président du jury

Examineur

Rapporteur

Rapporteur



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



*A mes parents Claude et Yolande,  
A mes grand-mères Rosita et Georgette,  
A mon oncle Jean-Emmanuel dit « Manoli ».*



# Remerciements :

Tout d'abord je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers les membres du jury Mme Catherine Picart, Mme Irma Machuca-Gayet, Mr Michel Desarménien, Mr Grégory Giannone ainsi que Mr Damien Ricard. Et, je les remercie d'avoir accepté d'évaluer mon travail et du temps accordé.

Je voudrais ensuite remercier du fond du cœur mes deux directeurs de thèse, Norbert Bakalara et David Cornu qui, durant ces trois années, m'ont encadrée avec bienveillance et énormément appris. Tout au long de mes travaux, ils ont toujours su trouver le juste milieu entre un encadrement éclairé dans les moments de doutes et l'apprentissage de l'indépendance. Je les remercie infiniment pour leurs qualités humaines qui ont participé à faire de ces trois ans de thèse une très belle expérience. La confiance qu'ils m'ont accordée a été indispensable à mon épanouissement scientifique. Je garderai précieusement, tout au long de ma carrière et de ma vie future, les connaissances qu'ils m'ont permises d'acquérir.

Je remercie infiniment les membres de l'équipe qui sont ou qui ont été présents : Christine, Jacques, Ali, Sarah, Soumaya, Sophie, Jan et Zahra.

Christine Fabre, pour sa patience, sa gentillesse et sa bonne humeur. Pour avoir toujours prêté une oreille attentive et bienveillante, nourri les grandes discussions scientifiques et apporté toute son aide, elle a été un soutien précieux durant ces trois années.

Jacques Vignon, pour son soutien, son humour et sa capacité à toujours trouver les mots justes dans les situations qui ne méritent pas d'être dramatisées.

Ali Saleh pour tout ce qu'il m'a appris, pour avoir partagé les connaissances qu'il a acquises durant sa thèse et celles qu'il a mises en lumière par ses travaux. Je le remercie pour tout le temps passé à m'apprendre la culture cellulaire ou l'utilisation des fibres.

Jan De Weille pour toute son aide, sa clairvoyance et ses nombreux conseils.

Sarah Lalisce pour son aide, son soutien, sa gentillesse et toutes ses attentions.

Zahra Hassani pour sa patience, sa gentillesse et ses nombreux conseils.

Soumaya pour tout ce qu'elle m'a enseigné à la « paillasse », pour sa bonne humeur, son sourire et sa capacité à tout relativiser. Pour avoir su transformer les heures de culture cellulaire en moments inoubliables.

Sophie pour toutes les fois où elle a su trouver des solutions à mes problèmes de manip', pour sa gentillesse et son amour de la science. Tu as su me montrer qu'avec une passion et une persévérance comme les tiennes, on arrive au bout de tout et ça, quelles que soient les situations.

Un immense merci aux précieux stagiaires :

Alexandra Ott et Hervé de Laborde de Montpezat, respectivement présents dans l'équipe pendant 6 mois. Je les remercie pour leur aide précieuse, leur intelligence et leur sérieux. Je pense que sans eux, j'aurais accumulé encore bien plus de manque de sommeil.

« Les Fanny », présentes pendant un mois, pour leur aide, leur bonne humeur et leur passion.

Un grand merci aussi aux membres de l'autre partie de l'équipe 4 qui sont ou qui ont été présents : Philippe, Hussein, Valéria, Marion et Safa.

Je remercie également Martà Martin Fernandez qui grâce à sa collaboration, a permis de caractériser l'un des fondamentaux de mes travaux.

Je remercie bien évidemment tout ceux qui travaillant à l'INM, m'ont aidé de près ou de loin dans mon projet et, tous ceux qui m'ont soutenue durant ces trois ans. Je pense notamment à Marissa, Dasha, Isabelle ou encore Hassan.

Un immense merci à toutes les personnes qui, au sein ou hors du labo, ont rendu ces trois ans si agréables :

Gaby, « Gabychat », ma précieuse amie depuis la fac sans qui cette thèse n'aurait pas été la même. Il y a tellement de choses pour lesquelles j'aimerais te remercier, que j'ai l'impression que ce ne sera jamais assez. Merci pour tout ce temps passé ensemble et qui m'est cher, pour avoir supporté mes humeurs, mes plaintes, mes considérations existentielles. Pour avoir rendu sans conséquences les nombreuses pannes de réveil durant les années de fac. Pour m'avoir toujours encouragée.

Hélène, pour ton soutien, toute ton aide et ton écoute. Je suis heureuse d'avoir pu te connaître durant ces trois années de thèse et des grands moments passés à se raconter nos vies. J'espère que tes voyages te permettront de trouver ton chemin. En tout cas, quand tu reviendras sache que je serai ravie de t'écouter autour d'un thé.

Nicolas, pour toutes ces expériences de vie racontées en culture cellulaire, pour les discussions sur Star Wars, pour les journées entières avec « Le Youki » dans la tête, pour ton humour et pour être l'illustration même de la force de volonté. On ne peut qu'admirer une détermination comme la tienne.

Je voudrais également remercier tous ceux qui, bien que n'étant pas impliqués dans mon travail, ont contribué à mon épanouissement :

Alex, mon meilleur ami, pour ton soutien indéfectible avant et tout au long de cette thèse. Sans toi, je ne sais pas si je serais arrivée à faire tout ça.

Les « Gravity », Alex, Tim et Richy. Je vous aime et vous contribuez à mon équilibre. Merci infiniment de m'avoir toujours comprise et soutenue. Aux tournées partagées avec vous qui resteront dans ma mémoire pour toujours.

Marie-Anne, « Mamarichat », ma grande amie depuis de nombreuses années. Merci d'être là.

Cyril, Kam, Toby, Pakalito, Aurélie, Poloch, Hugo, Clem... Aux nombreuses soirées et aux moments passés avec eux.

Nao, mon chien, qui m'apporte tellement d'amour, de bonne humeur et de tendresse. Même après les pires journées, il me suffit de voir ta truffe en rentrant et tout va tellement mieux.

François, mon amour, dont la seule présence rend ma vie plus douce. Merci d'être là. Merci pour ta confiance en moi, ton écoute, ton soutien inébranlable et les nombreux efforts que tu fais pour rester concentré quand je parle science.

Enfin, je remercie infiniment ma famille : mon père, ma mère, mes grand-mères et mon oncle. Papa et Maman, merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir toujours épaulée, soutenue dans tous les domaines, que ce soit dans mon amour pour la biologie et les sciences en général, dans mon amour pour la musique, ou même dans mes nombreuses lubies passagères. Merci pour votre tendresse et votre tolérance, de m'avoir toujours suivie dans toutes mes passions. Merci d'avoir favorisé mon ouverture d'esprit en me permettant de tout tester. Merci d'avoir toujours contribué à mon équilibre et d'avoir tout mis en œuvre pour que je puisse accomplir ce qui me tenait à cœur. C'est grâce à votre volonté de m'ouvrir toutes les portes que je pense aujourd'hui avoir trouvé ma vocation.

# TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations .....	13
Liste des figures .....	17
Avant-propos .....	23
Introduction .....	25
<b>1-Le cancer .....</b>	<b>26</b>
<b>2-Les gliomes .....</b>	<b>27</b>
2.1- Définition .....	27
2.2 - La classification des gliomes .....	27
• Classification OMS 2007 .....	28
• 2016 : Intégration de données moléculaires au diagnostic .....	28
2.3 - Causes .....	29
<b>3-Les glioblastomes multiformes (GBM) .....</b>	<b>30</b>
3.1- Définition : .....	30
3.2- Epidémiologie : .....	32
3.3- Principales dérégulations génétiques associées aux GBM .....	33
3.4- Classification des glioblastomes selon Verhaak et al. ....	34
3.5- Les traitements contre les GBM .....	36
3.6 Origine des glioblastomes.....	37
3.6.1 - Les Neural Stem cell (NSC) comme origine des glioblastomes .....	38
3.6.2- Glioblastoma Stem Cell .....	40
3.6.3- Résistance aux thérapeutiques : Radio et Chimio résistance .....	41
<b>4- Matrice extracellulaire (MEC) .....</b>	<b>42</b>
4.1 - Définition : .....	42
4.2 - Composition de la MEC :.....	43
4.3 - La matrice extracellulaire du cerveau.....	44
4.3.1 - La matrice interstitielle .....	44
• L'acide hyaluronique (AH) :.....	44
• Les protéoglycans : .....	44
• Les glycoprotéines : .....	45

4.3.2 - La membrane basale : .....	45
4.4 - La MEC dans les glioblastomes : .....	46
4.5 - Dégradation de la MEC pendant l'invasion tumorale : .....	48
• Les protéases : .....	48
• Les glucosidases : .....	49
<b>5 - Les propriétés mécaniques du microenvironnement : .....</b>	<b>51</b>
5.1 - La rigidité : .....	51
5.1.1 - La rigidité dans les cancers : .....	54
5.1.2 - La rigidité dans les gliomes : .....	55
5.2 - Propriété mécanique de la MEC dans les cancers : élasticité et demoplasie : .....	56
<b>6 - Migration .....</b>	<b>59</b>
6.1 - La migration .....	59
a) La polarisation .....	59
b) La polymérisation de l'actine .....	61
c) Assemblage et désassemblage des adhérences focales .....	62
• Adhérences focales .....	62
• Assemblage des adhérences focales .....	63
• Désassemblage des adhérences focales .....	64
d) Contractilité durant la migration .....	66
6.2 - Comportement migratoire des Cellules souches de glioblastome .....	67
6.2.1 - Glioblastomes : Métastases ? .....	67
6.2.2 - Les voies de migration utilisées par les cellules de GBM .....	67
6.3.2.1 - Structures de Scherer .....	67
a) Les voies préférentielles de migration .....	68
b) Déformabilité nécessaire à la migration au travers du parenchyme sain .....	69
6.2.3 - Différents types migratoires rencontrés .....	72
6.3.3.1 - Les migrations amiboïdes et mésenchymateuses .....	72
a) La migration amiboïde .....	72
b) La migration mésenchymateuse .....	76
6.3.3.2 - La migration individuelle et la migration collective .....	77
a) La migration individuelle .....	77

b) Les comportements migratoires intermédiaires .....	78
c) La migration collective .....	78
6.3- Rôle des interactions cellules/MEC impactant la migration des cellules de gliomes .....	81
6.3.1 - Le récepteur à l'acide hyaluronique (AH) .....	81
6.3.2 - Les intégrines .....	82
6.3.3 - L'haptotaxis et l'haptokinesis .....	84
6.4 - Propriétés mécaniques impactant la migration .....	86
6.4.1 – La Rigidité .....	87
6.4.1.1 - Rigidité et adhérences focales .....	87
•Influence de la rigidité sur la migration des cellules cancéreuses .....	88
• Influence de la rigidité sur la migration des cellules de gliomes .....	89
6.4.1.2 : Durotaxie .....	89
6.4.2- Le confinement .....	90
<b>7- Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) .....</b>	<b>93</b>
7.1 - L'EMT dans le développement .....	93
7.2 - L'EMT au cours du développement tumoral : .....	95
7.3 - L'impact des propriétés mécaniques sur l'EMT : .....	98
7.4 – L'EMT dans les gliomes – « Glial to Mesenchymal Transition » : GMT .....	100
7.4.1 - EMT et microenvironnement des GBM : .....	102
<b>8 – Glycosylation : .....</b>	<b>103</b>
8.1 - Généralités : .....	103
8.1.1- La O-glycosylation : .....	104
8.1.2- La N-glycosylation : .....	104
• Dans le RE : .....	104
• Dans l'appareil de Golgi : .....	105
8.2 – Mgat5 .....	107
8.2.1- Mgat5 et cancer : .....	107
8.2.2- Implication de la Mgat5 dans l'EMT : .....	108
8.2.3- Galectine 3 : .....	110
8.2.4- Implication de la Mgat5 et de la galectine 3 dans la régulation des adhérences : .....	112
<b>9- Matrice In vitro : .....</b>	<b>115</b>

9.1 - Dimensionnalité :	116
• Matériaux dits à 0 Dimension (0D) :	116
• Matériaux dits à 1 dimension (1D) :	116
• Matériaux dits à 2 Dimensions (2D) :	117
• Matériaux dits à 3 Dimensions (3D) :	118
9.2 - Différent types de matrices :	119
9.2.1- Tissus décellularisés.....	119
9.2.2- Hydrogels :	119
9.2.3 Fibres :	120
9.2.4 Eponges :	122
9.3 - Modèles de migration:	122
9.3.1 - Electrospinning :	123
a) Principe .....	123
b) Alignement des fibres :	124
c) Effets des différents paramètres sur l'électrospinning :	125
• Paramètres de solution :	125
• Paramètres de procédés :	126
• Paramètres ambiants :	126
9.3.2 - Polyacrylonitrile (PAN) :	126
<b>Objectifs</b> .....	131
<b>Résultats</b> .....	135
<b>Partie I : Publication 1</b> .....	137
<i>Développement d'une matrice tridimensionnelle de nanofibres et études du rôle de la laminine et de la topoinduction sur la migration des cellules souches de glioblastome.</i> .....	137
<b>Introduction</b> .....	138
A novel 3D nanofibre scaffold conserves the in vivo plasticity of glioblastoma stem cell invasion by regulating galectin-3 and integrin $\beta$ 1 expression.....	141
<b>Partie II : Publication 2</b> .....	173
<i>Modulation de la rigidité d'une matrice tridimensionnelle de nanofibres impactant les comportements migratoires des GSC et étude de l'implication de la GnT-V dans la mécanotransduction et l'EMT.</i> .....	173
<b>Introduction</b> .....	174
MGAT5 promotes highly invasive phenotype of GSCs induced by optimal stiffness. ....	177
<b>Partie III : Brevet</b> .....	211

<i>Réseau tridimensionnel biocompatible et son utilisation en tant que support de cellules</i> .....	211
<b>Introduction</b> .....	212
Réseau tridimensionnel biocompatible et son utilisation en tant que support de cellules .....	214
<b>Discussion et perspectives</b> .....	218
<b>Conclusion générale</b> .....	240
<b>Bibliographie</b> .....	244



# Liste des abréviations

---

**0D** : 0 Dimension

**1D** : 1 Dimension

**2D** : 2 Dimensions

**3D** : 3 Dimensions

**ABC** : ATP Binding Cassette

**ACAN** : agrécan

**ADAM** : A Disintegrin And Metalloprotease

**ADAMT** :

A Disintegrin And Metalloproteinase with  
Thrombospondin Motifs

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AFM**: Atomic Force Microscopie

**AH** : Acide Hyaluronique

**aNF** : aligned nanofibers

**AQP** : Aquaporine

**ARN**: acide ribonucléique

**ASCL1**: Achaete-scute homolog 1

**ASIC** : Acid-sensing ion channel

**Asn**: Asparagine

**B2R** : Bradykinin 2 Receptor

**BCAN** : Brévican

**BHE** : Barrière hémato encéphalique

**BMI-1** : B lymphoma Mo-MLV insertion region 1

**BMP** : Bone morphogenic protein

**CamKII** : Protéine kinase II dépendante du  
complexe Ca<sup>2+</sup>/calmoduline

**Cat** : Cathepsine

**Cav-1**: Cavéoline 1

**Cc** : Corps calleux

**CD**: Cluster of differentiation

**Cdc42** : Cell division control protein 42 homolog

**CDKN2A** : Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

**CDKN2B** : Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B

**CHI3L1** : Chitinase-3-like protein 1

**ChK1 et ChK2** : Checkpoint kinases 1 et 2

**CREB** : C-AMP Response Element-binding  
protein

**CS** : Chondroïtine Sulfate

**CSC** : Cancer Stem Cells

**CTC** : Circulating tumor cells

**CTGF**: Connective tissue growth factor

**DCX**: Doulecortin

**DLL3**: Delta-like 3

**DMAc** : Diméthylacétamide

**DMF** : Diméthylformamide

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**EDA et EDB** : Extra domaine A ou B

**EGF**: Epidermal Growth Factor

**EGFR**: Epidermal Growth Factor Receptor

**EMT** : Epithelial-to-Mesenchymal Transition

**Eph** : Ephrine

**ERM** : Ezrine-Radixine-Moesine

**EZH2** : Enhancer of zeste homolog 2

**F-6P** : Fructose-6P

**FA**: Focal Adhesions

**FAK** : Focal Adhesion Kinase

**FERM**: 4.1 ezrin - radixin - moesin

**FGF** : Fibroblast growth factor

**FN** : Fibronectine

**FOXG1**: Forkhead box protein G1

**Fsp-1**: Fibroblast Specific Protein 1

**G3BP2**: Stress Granule Assembly Factor 2

**G-6P**: Glucose 6-phosphate

**GABRA1**: Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Alpha1 Subunit

**GAG** : Glycosaminoglycane

**GalNac** : N-acetylgalactosamine

**GAS1**: Growth arrest-specific protein 1

**GBM** : Glioblastome multiforme

**GFAP**: Glial fibrillary acidic protein

**GIC** : Glioma Initiating Cells

**Glc** : Glucose

**GlcNac** : N-acetyl glucosamine

**GM** : Grey Matter

**GMT**: Glial-to-Mesenchymal Transition

**GO**: Oxyde de graphène

**GPCR** : G protein-coupled receptor

**GR** : Graphène

**GSC** : Glioma Stem Cells

**GTP**: Guanosine Triphosphate

**HGF**: Hepatocyte growth factor

**HIF1  $\alpha$** : Hypoxia Inducible Factors 1 sous unité  $\alpha$

**HS**: Héparane sulfate

**HSPG**: Héparanes sulfates protéoglycane

**HYAL**: Hyaluronidases

**IDH1**: Isocitrate dehydrogenase 1

**IGF1R**: Insulin-like growth factor 1

**IP3**: Inositol triphosphate

**JAG1**: Jagged1

**KO**: Knock-out

**LacNac** : N-acetyllactosamine

**LCR** : Liquide céphalo-rachidien

**LN ou Lm** : Laminine

**LOX** : Lysyl oxidase

**Man** : Mannose

**MAP** : Mitogen-activated protein

**MAPK** : Mitogen-activated protein Kinases

**MCF** : Michigan Cancer Foundation

**MEB** : Microscopie électronique à Balayage

**MEC** : Matrice Extracellulaire

**MERCK** : Serine/threonine-protein kinase

**MERTK** : Myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase

**MET** : Mesenchymal-to-Epithelial Transition  
**MET** : Microscopie Electronique à Transmission  
**MGAT5** : N-acetylglucosaminyltransferase 5  
**MGMT** : Méthylguanine méthyltransférase  
**MLC** : Myosin Light Chain  
**MMP** : Métalloprotéinases matricielles  
**MRE**: Elastographie par Résonance Magnétique  
**MTOC** : Centre organisateur des microtubules  
**MWCNT** : Multiwall carbon nanotube  
**naNF**: Non aligned nanofibers  
**NCAN**: Neurocan  
**NEFL**: Neurofilament Light  
**NES**: Nuclear export signal  
**NF**: Nanofibres  
**NF1**: Neurofibromin 1  
**NF- $\kappa$ B**: Nuclear factor-kappa B  
**NKCC1**: Co-transporteur 1 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>  
**NOS**: Not otherwise specified  
**NRP**: Neuropiline  
**NS**: Neurosphère  
**NSC**: Neural Stem Cells  
**N-WASP**: Neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome protein  
**OLIG2**: Oligodendrocyte transcription factor  
**OMS** : Organisation mondiale de la santé  
**OPC** : Oligodendrocyte progenitor cell  
**OPN** : Ostéopontine

**Pa** : Pascal  
**PAK** : Serine/threonine protein kinase  
**PAN** : Polyacrylonitrile  
**PARP** : Poly(ADP-ribose) polymérase  
**PCL** : Poly- $\epsilon$ -caprolactone  
**PDE1** : Phosphodiesterase 1  
**PDGF** : Platelet-derived growth factor  
**PDGFR**: Platelet-derived growth factor Receptor  
**PEG** : Poly éthylène glycol  
**PFA** : Paraformaldéhyde  
**PHLDB1** : Pleckstrin Homology Like Domain Family B  
**PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase kinase  
**PIK3CA**: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase sous unite catalytique  $\alpha$   
**PIK3R1** : Phosphoinositide-3-Kinase Sous unite régulatrice 1  
**PIP** : Phosphoinositide  
**PIP2** : Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate  
**PKA** : Protein kinase A  
**PKC** : Protein kinase C  
**POSTN** : Périostine  
**ppGalNac** : Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase  
**PTEN** : Phosphatase and tensin homolog  
**Rac1** : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  
**RB1** : Retinoblastoma protein 1

**RE** : Réticulum endoplasmique

**RGD** : Arginine-glycine-Asparagine

**RHAMM** : Receptor for HA Mediated Motility

**ROCK** : Rho Kinase

**RTEL1** : Regulator Of Telomere Elongation Helicase 1

**RTK** : Récepteur tyrosine kinase

**Séma** : Sémaphorine

**Ser** : Sérine

**SGZ** : Subgranular zone ou zone subgranulaire

**SLC12A5** : Solute Carrier Family 12 Member 5

**SMO** : Smoothened homolog

**SNC** : Système nerveux central

**SPARC** : Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich

**ST6Gal1** :  $\beta$ -Galactoside  $\alpha$  2,6 sialyltransférase 1

**STAT3** : Signal transducer and activator of transcription 3

**SULF1 et SULF2** : Sulfatase extracellulaire 1 et 2

**SVZ** : Subventricular zone

**SYT1**: Synaptotagmin 1

**Taz** : Tafazzin

**TCF4** : Transcription factor 4

**TERT** : Telomerase Reverse Transcriptase

**TGF- $\beta$**  : Transforming growth factor  $\beta$

**Thr** : Thréonine

**TIMP1** : Tissue inhibitors of metalloproteinases 1

**TMZ** : Témazolomide

**TN-C** : Tenascine-C

**TNF- $\alpha$**  : Tumor necrosis factor  $\alpha$

**TN-R** : Tenascine-R

**TP53** : Tumor Protein 53

**U87MG**: Uppsala 87 Malignant Glioma

**UDP**: Uridine diphosphate

**uPA** : Urokinase plasminogen activator

**uPAR** : Urokinase plasminogen activator receptor

**VASP** : Vasodilator-stimulated Phosphoprotein

**VCAN** : Versican

**VEGF** : Vascular endothelial growth factor

**WASP** : Wiskott–Aldrich Syndrome protein

**WAVE** : WASP-family verprolin-homologous protein

**WHO** : World Health Organisation

**WM** : White Matter

**WT** : Wild type

**Yap** : Yes-associated protein

**ZEB1** : Zinc finger E-box-binding homeobox 1

**ZO-1** : Zonula Occludens 1

# Liste des figures

---

**Figure 1 :** Statistiques globales sur le cancer en 2012.

**Figure 2 :** Classification des tumeurs du SNC de 2016 de l'OMS.

**Figure 3 :** IRM montrant un GBM.

**Figure 4 :** Contraste entre le tissu cérébral sain et le GBM.

**Figure 5 :** GBM avec nécroses pseudopalisadiques et vaisseaux sanguins immatures.

**Figure 6 :** Moyenne et médiane de survie des patients atteints de glioblastome.

**Figure 7 :** Principales dérégulations génétiques associées au GBM.

**Figure 8 :** Classification de Verhaak.

**Figure 9 :** Mécanismes moléculaires du GBM et stratégies thérapeutiques.

**Figure 10 :** Différenciation de cellules souches du SNC.

**Figure 11 :** Origine et différenciation des GSC par rapport à celles des NSC.

**Figure 12 :** Composition du matrisome.

**Figure 13 :** Mécanismes impliqués dans la migration des cellules de GBM.

**Figure 14 :** Les cellules de gliome sculptent leur matrice extracellulaire.

**Figure 15 :** Différents modules de rigidité entre les différents tissus humains.

**Figure 16 :** Cartographie des rigidités cérébrales.

**Figure 17 :** Comparaison de la rigidité des différentes aires cérébrales chez l'adolescent et chez l'adulte.

**Figure 18 :** Mesure de l'élasticité des tissus de gliomes comparés à ceux de cerveaux de souris lors de l'application de compressions.

**Figure 19 :** Remodelage de la MEC par les cellules tumorales et impact sur la clusterisation des adhérences focales.

**Figure 20 :** Différentes étapes du processus desmoplastique de la MEC tumorales.

**Figure 21 :** Mécanisme de polarisation durant la migration cellulaire.

**Figure 22 :** Polymérisation de l'actine au bord avant de la cellule, permettant la formation de protrusion et la migration.

**Figure 23 :** Assemblage des adhérences focales.

**Figure 24 :** Désassemblage des adhérences focales.

**Figure 25 :** Différentes structures de Scherer également appelées structures secondaires.

**Figure 26 :** Mécanismes impliqués dans la déformabilité des cellules de gliomes durant la migration.

**Figure 27 :** Mécanismes physiques de génération et de transmission de force pendant la migration amiboïde indépendante des adhérences focales.

**Figure 28 :** Paramètres favorisant les transitions entre la migration adhésive et non adhésive.

**Figure 29 :** Migration depuis les abords du GBM.

**Figure 30 :** Différents types d'invasions des cellules cancéreuses.

**Figure 31 :** Molécules d'adhésion cellules/MEC et cellule/cellule exprimées dans les cellules de gliome par rapport aux tissus cérébraux normaux.

**Figure 32 :** Illustration du microenvironnement favorable à la migration des cellules de gliomes.

**Figure 33 :** Illustration des interactions dynamiques entre la cellule et la matrice pendant la migration cellulaire.

**Figure 34 :** Nombreux signaux extrinsèques et intrinsèques influant sur les modes migratoires.

**Figure 35 :** Piezo1 et confinement.

**Figure 36 :** EMT successifs durant le développement embryonnaire.

**Figure 37 :** EMT et métastases.

**Figure 38 :** Voies de signalisation communes activant les régulateurs EMT.

**Figure 39 :** Biosynthèse et développement des oligosaccharides N-liés débutant dans le RE et continuant dans l'appareil de Golgi.

**Figure 40 :** Changement de N-glycosylation dans le cas d'EMT induite par le TGF- $\beta$ .

**Figure 41 :** Structure de la galectine 3.

**Figure 42 :** Tableau des différents partenaires auxquels se lie la galectine 3 grâce à la reconnaissance du motif  $\beta$ 1,6-GlcNAc ajouté par la GnT-V.

**Figure 43 :** Galectine 3 modulant les comportements cellulaires.

**Figure 44 :** Caveoline 1 et galectine 3 dans la progression tumorale.

**Figure 45 :** Image en SEM et TEM de Biomatériaux 0D.

**Figure 46 :** Image en SEM et TEM de Biomatériaux 1D.

**Figure 47 :** Image en SEM et TEM de Biomatériaux 2D.

**Figure 48 :** Image en SEM de Biomatériaux 3D.

**Figure 49 :** Configuration de base pour l'électrospinning.

**Figure 50 :** Configuration pour l'électrospinning avec un collecteur rotatif pour fournir des fibres alignées.

**Figure 51 :** Unité répétée de PAN.

**Figure 52 :** Structure du PAN après stabilisation.

**Figure 53 :** Transformation subie par le PAN stabilisé après carbonisation.

**Figure 54 :** Cerveaux de souris xéno greffées avec les différentes cultures primaires.

**Publication 1 Figure 1 :** Physical characterization of nanofibres and their functionalization with laminin.

**Publication 1 Figure 2 :** The NF create a tridimensional microenvironment convenient for GIC proliferation, adhesion and migration.

**Publication 1 Figure 3 :** Gli4 cells migrate individually or collectively in the presence or absence of laminin respectively.

**Publication 1 Figure 4 :** aNF 3D microenvironment reduces the growth ratio and fibre orientation determines the direction of migration of GIC.

**Publication 1 Figure 5 :** Transcriptomic analysis of Gli4 cells cultured in 2D or 3D.

**Publication 1 Figure 6 :** Gli4 and GliT behave differently on aNF $\pm$ -LN.

**Publication 1 Figure 7 :** Integrin  $\beta 1$  and galectin-3 are upregulated in Gli4 cells migrating in the corpus callosum while calpain-2 is downregulated in invasive Gli4 and GliT cells.

**Publication 1 Supplementary Figure S1:** The control of the cell number and the volume of Gli4 neurospheres.

**Publication 1 Supplementary figure S2 :** Transcriptomic analysis protocol

**Publication 1 Supplementary figure S3 :** Western Blot quantification

**Publication 1 Supplementary Table S4:** Transcriptomic analysis of Gli4 and GliT cells.

**Publication 1 Supplementary Table S5:** Transcriptomic analysis of Gli4 and GliT cells.

**Publication 2 Figure 1:** Characterization of the NF with different concentrations of MWCNTs and Triton.

**Publication 2 Figure 2:** Migration area of GSCs increase at 166kPa on 3D NF matrix and triggers GSCs' migration in proliferation condition.

**Publication 2 Figure 3 :** GSCs in the 3D NF matrix change their shape through the variations of elasticity but not their focal adhesion morphology.

**Publication 2 Figure 4 :** Optimal elasticity increases the expression of EMT proteins in GSCs and modifies focal adhesion dynamic.

**Publication 2 Figure 5 :** CRISPR Cas9 KO of MGAT5 decreases GSC's migration velocity at 166kPa.

**Publication 2 Figure 6 :** MGAT5 KO GSCs changes EMT protein expression, focal adhesion dynamic and reduces cell length.

**Publication 2 Supplementary 1 :** AFM force-volume maps.

**Publication 2 Supplementary 2 :** Surface chemistry.

**Publication 2 Supplementary 3 :** Lambda scan of the NF with different concentrations of MWCNTs.

**Publication 2 Supplementary 4 :** MGAT5 KO GSC NS size and growth compared to WT GSCs

**Publication 2 Supplementary 5 :** Western Blot quantification of WT GSC proteins expression

**Publication 2 Supplementary 6 :** Western Blot quantification of MGAT5 KO GSC proteins expression compared to WT GSC.

**Figures 55 :** GSC dans un cerveau de souris après 60jours, migrant le long des vaisseaux sanguins et dans le parenchyme sain.

**Figure 56 :** Courbe de force d'adhésion mesurée avec l'AFM.

**Figure 57 :** Schéma récapitulatif l'implication du treillis galectine3/MGAT5 dans la régulation des adhérences focales.

**Figure 58 A et B :** Schéma récapitulatif représentant l'implication du treillis MGAT5/galectine 3 dans la mécanotransduction et l'EMT.

**Figure 59 :** Schéma résumant l'impact de la rigidité sur Sox2 et la régulation des galectines 3, des adhérences focales et de l'EMT



# Avant-propos

Les modifications d'expression de gènes ou les mutations peuvent altérer les fonctions cellulaires et conduire au cancer. Ces changements se produisent naturellement lors de la réplication de l'ADN et peuvent être induits par des facteurs environnementaux causant des dommages à l'ADN au cours de la vie quotidienne. Une des préoccupations cliniques majeure dans le traitement des cancers est de limiter la migration et l'invasion des cellules tumorales, conduisant à d'importantes difficultés thérapeutiques. Les cellules souches cancéreuses (CSC) ont été identifiées comme une sous-population cellulaire responsable des récurrences, d'être radio et chimio-résistantes et de posséder d'importantes capacités migratoires et prolifératives. Du fait de leur phénotype souche, elles possèdent d'incroyables capacités d'adaptation à leur environnement et aux différentes situations qu'elles rencontrent. Elles sont capables de percevoir et transmettre des informations relatives aux propriétés physiques de l'environnement via la mécanoréception et la mécanotransduction (Gkretsi and Stylianopoulos 2018). Ces mécanismes jouant un rôle essentiel dans le contrôle de la migration, il est crucial de les étudier dans un environnement adéquat où les paramètres physiques sont finement contrôlés.

Ces propriétés physiques de l'environnement, bien que longtemps ignorées dû en partie au défaut d'approches technologiques pratiques et fiables, sont aujourd'hui de plus en plus étudiées pour de nombreux comportements cellulaires (Broders-Bondon et al. 2018). En effet durant la croissance tumorale ou durant la migration, les cellules cancéreuses vont rencontrer de nombreuses structures présentant une grande diversité de propriétés physico-chimiques orientant leur devenir cellulaire (Cuddapah et al. 2014b)(Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

La matrice extracellulaire (MEC), constituant l'environnement des cellules cancéreuses durant leur migration, jouent un rôle fondamental dans l'induction des différents comportements migratoires *via* les interactions cellules-matrices réalisées par de nombreux récepteurs. Ils permettent l'intégration des signaux physiques et chimiques de l'environnement. Ces intégrations vont permettre la modulation des propriétés pharmacologiques, radiologiques et cellulaires comme l'agressivité, l'invasivité, la prolifération, la résistance à l'apoptose ou encore le mode de migration.

En ce sens, bien que les systèmes 2D de cultures classiques aient permis la réalisation de fabuleuses avancées en biologie et la compréhension de nombreux phénomènes, ils sont obsolètes pour ce type de problématique. Ils ne récapitulent pas l'environnement tridimensionnel inhérent au vivant dont découle de nombreux phénomènes biologiques.

La culture 2D ne rend pas compte de tous les paramètres physico-chimiques (rigidité, confinement...) et conduit à des situations limitées pour l'étude en conditions biomimétiques. Ainsi, la mise au point de nouvelles matrices 3D devient indispensable.

C'est dans cet axe que vont s'inscrire mes travaux de thèse. Ils consistent dans une première étape en la conception et la mise au point d'une nouvelle matrice 3D de nanofibres biocompatible, dont il est possible de finement moduler les propriétés physiques et chimiques et ce, de manière indépendante. Cette matrice nous permettra donc d'étudier l'implication des propriétés chimiques, de la rigidité et du confinement sur les différents comportements migratoires des cellules souches de glioblastomes.

Les glioblastomes multiformes (GBM) sont des tumeurs cérébrales hautement agressives et létales pour lesquelles il n'existe pas de traitement. Le protocole de référence (Stupp et al. 2005) permet d'atteindre une médiane de survie de 14 mois. Il est donc urgent, en association avec la chirurgie, d'envisager des alternatives thérapeutiques propres aux gliomes pour cibler la migration.

Les cellules souches de gliomes (ou glioma stem cells : GSC) migrent au travers du parenchyme sain, en réalisant de nombreux contacts avec les MEC cérébrales et les nombreuses contraintes mécaniques qu'elles représentent.

Les glycanes jouent un rôle essentiel dans la progression tumorale. Il a déjà été observé que la glycosylation des protéines membranaires des GSC impacte leur interaction avec la MEC et la modulation de leurs réponses aux propriétés chimiques du microenvironnement (Kizuka and Taniguchi 2016). Néanmoins, l'impact sur la réponse aux propriétés physiques reste inconnu.

C'est pourquoi, dans une seconde étape, mes travaux porteront sur l'implication de la N-glycosylation et plus précisément la genèse des glycanes complexes sur la mécanotransduction des GSC et leur agressivité en réponse à la rigidité.

Dans ce contexte, dans les premières parties de l'introduction, je récapitulerai les connaissances acquises sur les glioblastomes et les GSC qui sont en lien avec mes travaux.

Par la suite, j'exposerai les propriétés physico-chimiques des différentes composantes du microenvironnement des GBM que les GSC seront amenées à rencontrer durant leur migration, telle que la composition de la MEC ou la rigidité de l'environnement. Je détaillerai également les voies empruntées par les GSC durant leurs cheminements au travers du parenchyme sain, les différents modes migratoires connus, ainsi que l'implication des propriétés physico-chimiques sur la migration. Les mécanismes permettant la migration et la jonction cellules-MEC, ainsi que la capacité de mécanotransduction des GSC seront également explicités.

Je décrirai ensuite l'implication de la glycosylation sur la migration, l'agressivité et l'interaction des GSC avec la MEC.

La dernière partie de cette introduction sera consacrée aux différentes dimensionnalités rencontrées entre les matrices biomimétiques existantes pour la culture cellulaire, ainsi qu'aux divers types de matrices présentant toutes des avantages et des inconvénients. Ainsi nous pourrions situer nos matrices 3D de nanofibres, au sein des matrices déjà existantes.

# Introduction

---

## 1-Le cancer :

Les premières traces de cancers décrites se trouvent sur un papyrus datant de l'ancien empire égyptien après la fin du Néolithique, environ 3000 av. J.C (Binder et al. 2014) et d'anciens documents médicaux décrivent des conditions pathologiques identifiées comme « cancéreuses » dans la Grèce Antique (Karpozilos and Pavlidis 2004). Des études archéologiques menées dans le Nord du Soudan ont permis la découverte du squelette d'un jeune adulte datant de 1200 av. J.C portant des traces de lésions cancéreuses osseuses à de multiples endroits (Binder et al. 2014). En 2012 environ 14.1 millions de nouveaux cas de cancers sont survenus dans le monde entier, engendrant 8,2 millions de décès (OMS). L'augmentation de la fréquence des cancers est due, au vieillissement des populations ainsi qu'à la prévalence croissante de facteurs de risque établis tels que le tabagisme, la surcharge pondérale, l'inactivité physique, les conditions environnementales (eau, air, alimentation) ou encore à des origines infectieuses telles que le virus de l'hépatite B ou C, ainsi que par le virus du papillome humain.

Les cancers le plus meurtriers au travers du monde sont le cancer du poumon chez les hommes et du sein chez les femmes. Dans les pays développés, ils sont suivis en termes d'incidence par le cancer colorectal, le cancer de la prostate, du foie et du col de l'utérus. Bien que les taux d'incidence soient presque deux fois plus élevés dans les pays les plus développés, tant chez les hommes que chez les femmes, le taux de mortalité dû au cancer n'est que 8 % à 15 % plus élevés que dans le reste du monde (Torre et al. 2015).

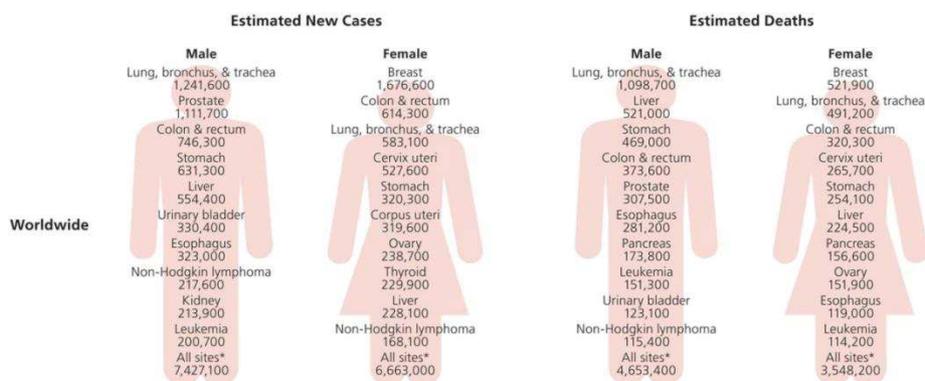


Figure 1 : Statistiques globales sur le cancer en 2012« *Global Cancer Statistics 2012*», Lindsey A. Torre, 2015, source : GLOBOCAN 2012.

Il n'existe pas un cancer, mais des cancers, pouvant être d'une grande hétérogénéité intra et inter-tumorale et étant dépendante de facteurs génétiques et environnementaux. L'une des raisons de cette hétérogénéité est que l'une des populations identifiées comme impliquées dans la tumorigénèse sont des cellules de types souches identifiées par Cohnheim et Durante à la fin du dix-neuvième siècle.

Le cancer dérive du tissu sain dont une ou plusieurs cellules vont perdre le contrôle de leur prolifération est ainsi aboutir à la formation d'une masse tumorale dans le cas des tumeurs solides. L'absence

de régulation de leur division va à terme amener au dysfonctionnement de l'organe touché. Les problèmes majeurs dans le cancer sont la métastase, la récurrence et l'invasion. En effet après dépistage, lorsque les cellules tumorales restent localisées en masse autour de l'origine, la résection chirurgicale peut suffire à la guérison. Néanmoins durant la progression tumorale maligne, la formation de métastases est issue d'un processus en plusieurs étapes lui permettant de migrer au travers de l'organisme, avant de nichier et proliférer à nouveau. Tout d'abord la cellule métastatique va se détacher de la tumeur d'origine et envahir la matrice extracellulaire. C'est la délamination. Ensuite elle va passer dans la circulation sanguine ou lymphatique grâce à un processus appelé intravasation. Enfin elle va réaliser l'extravasation et sortir de la circulation sanguine et acquérir la capacité de survivre et de proliférer dans son nouvel environnement (Hubert and Abastado 2014).

## **1- Les Gliomes :**

### **2.1- Définition :**

Les gliomes sont les tumeurs intra crâniennes les plus fréquentes et représente 1.3% des cancers diagnostiqués avec une incidence de 7 individus sur 100000. Ils représentent l'ensemble des tumeurs cérébrales issues du tissu de soutien ou glie. Les cellules tumorales présentent ainsi visuellement une morphologie similaire à celle observée chez les astrocytes, les oligodendrocytes ou les ependymocytes (Jiang and Uhrbom 2012).

La survie est variable entre les différents grades et entre les différents sous-types de gliomes (Ostrom et al. 2014). Néanmoins, la récurrence présente dans de nombreux cas de gliomes constitue un des obstacles majeurs en thérapie. Les gliomes de grade II, bien que caractérisés par un meilleur pronostic, présentent jusqu'à 70% de récurrences anaplasiques, faisant de la migration l'un des problèmes majeurs en thérapie (Manini et al. 2018). Les cellules quittant la tumeur initiale vont envahir le cerveau et initier un nouveau foyer tumoral dans une localisation différentes de la tumeur d'origine.

L'une des avancées majeures ces dernières années a été réalisée par le Pr Hugues Duffau à l'Hôpital Guy de Chauliac (CHU Montpellier, France), grâce à une technique d'exérèse supra-totale sur patients éveillés. Ceci a permis, grâce à une cartographie des zones fonctionnelles autour de la tumeur dépendante de chaque patient, de retirer la tumeur en enlevant le plus possible de cerveau en dehors des limites fonctionnelles établie lors de l'éveil du patient. Cette avancée permet actuellement d'augmenter l'espérance de vie des patients en même temps que leur qualité de vie car en enlevant plus de surface péri-tumorale il est également possible de réaliser l'exérèse d'une plus grande quantité de cellules ayant migré hors de la tumeur primaire (Yordanova and Duffau 2017).

### **2.2- La classification des gliomes :**

La première classification de l'OMS fût établie en 1979 et définit le type tumoral en fonction des populations cellulaires majoritaires et d'un degré de malignité bien défini. Ainsi ils furent classifiés en fonction de leur vascularisation, de la morphologie de leur noyau, de leur activité mitotique ou encore de leur prolifération. Avec l'évolution des techniques, les classifications suivantes comprendront des données immuno-histochimiques ainsi que de la biologie moléculaire (Louis et al. 2007).

- **Classification de l'OMS de 2007**

En 2007, l'Organisation mondiale de la santé (OMS ou WHO) classifiât les gliomes en fonction de leur grade de malignité, allant du grade I à IV, applicable à différents type de gliomes : les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les gliomes mixtes appelés oligoastrocytomes. Les grades I et II sont considérés gliomes de bas grade, alors que les grades III et IV sont considérés de haut grade (Louis et al. 2016)(Louis et al. 2007).

- Les gliomes de grade I sont bénins, avec des contours relativement bien définis, un taux de prolifération lent et sont les gliomes les plus courants chez l'enfant.
- Les gliomes de grade II, comprenant les astrocytomes, oligodendrogliome et oligoastrocytome, ont également un taux de croissance lent et un degré élevé de différenciation cellulaire, mais ces tumeurs se développent de façon diffuse dans le parenchyme cérébral normal et sont sujettes à une progression maligne.
- Les gliomes de grades III incluent les astrocytomes, oligodendrocytomes et oligoastrocytomes anaplasiques qui sont caractérisés par une large densité cellulaire et une forte présence de cellules mitotique atypique.
- Enfin, les gliomes de grade IV, sont les tumeurs cérébrales hautement malignes les plus fréquentes chez l'adulte incluant les glioblastomes (GBM) et les gliosarcomes. Ils représentent 50% des gliomes et touchent majoritairement des populations âgées de 45 à 70ans. Ce type de tumeur présente une haute prolifération micro vasculaire ainsi que des pseudo-palissades en zones péri-nécrotiques(Louis et al. 2007).

- **2016 : Intégration de données moléculaires au diagnostic :**

En 2016, la classification des gliomes a été mise à jour de sorte à intégrer des données moléculaires et génotypiques au diagnostic en plus des données histologiques. Cette classification ne s'appuie donc plus que sur l'identification du type cellulaire majeur mais également sur le statut des mutations. Cette nouvelle classification a pour but une meilleure compréhension des gliomes, permettant de faciliter les études cliniques, expérimentales et épidémiologiques. Ainsi, les gliomes diffus sont classés en fonction de l'état d'IDH1, de la

co-délétion de 1p19q ou présentant la caractérisation NOS lorsque les données moléculaires ne permettent pas d'établir un diagnostic précis.

Les gliomes mixtes de types oligoastrocytaires sont à présent soit oligodendrocytaires soit astrocytaires en fonction du statut de codélétion de 1p19q, après observation de la rareté des oligoastrocytomes « vraies » regroupant deux populations histologiquement et génétiquement distinctes de tumeurs astrocytaire (IGH-mutant, 1p/19 intact) et oligodendrogiales (IDH-mutant et 1p/19q codéléte) (Louis et al. 2016).

<b>Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours</b>	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	9400/3
Gemistocytic astrocytoma, IDH-mutant	9411/3
<i>Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9400/3
Diffuse astrocytoma, NOS	9400/3
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	9401/3
<i>Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9401/3
Anaplastic astrocytoma, NOS	9401/3
Glioblastoma, IDH-wildtype	9440/3
Giant cell glioblastoma	9441/3
Gliosarcoma	9442/3
<i>Epithelioid glioblastoma</i>	9440/3
Glioblastoma, IDH-mutant	9445/3*
Glioblastoma, NOS	9440/3
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	9385/3*
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9450/3
Oligodendroglioma, NOS	9450/3
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9451/3
<i>Anaplastic oligodendroglioma, NOS</i>	9451/3
<i>Oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3
<i>Anaplastic oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3

Figure 2 : Classification des tumeurs du SNC de 2016 de l'OMS (Louis et al. 2016)

### 2.3- Causes :

Les raisons d'apparition des gliomes restent majoritairement inconnues (Adamson et al. 2009). Néanmoins il est supposé une prédisposition génétique associée à l'apparition de gliomes dans quelques cas. Après de nombreuses analyses dans des échantillons de patients, parmi des gènes pouvant prédisposer à leurs apparitions lorsque dérégulés, plusieurs gènes ont été identifiés : TERT permettant le maintien des télomères, EGFR, CCDC26 participant à la modulation de la différenciation et de la mort cellulaire, CDKN2B codant pour des inhibiteurs de kinases cyclines dépendantes, PHLDB1, TP53 suppresseur de tumeurs et RTEL1 permettant le maintien et la stabilité des télomères (Ostrom et al. 2014). Néanmoins les causes familiales ne représentent que 5 à 10% des cas.

L'influence potentielle des rayonnements non ionisants (téléphones portables) et des expositions professionnelles a également été examinée, avec des résultats non concluants.

Des études ont également supposé que l'utilisation régulière d'anti-histaminiques pouvait augmenter le risque de Gliomes de grade III ou IV (Scheurer et al. 2011) . Néanmoins d'autres études affirment que la corrélation entre antihistaminique et gliome n'est pas valide (Amirian et al. 2013).

Pour l'instant, la seule cause connue des tumeurs cérébrales reste les radiations ionisantes. En effet après exposition à forte dose, des associations ont été faites lors des études sur, les bombes A, sur les retombées des essais nucléaires, sur les rayonnements thérapeutiques pour le cancer et les affections bénignes ou encore dans les cas d'expositions professionnelles et environnementales (Adamson et al. 2009).

D'autres facteurs ont été suggérés comme l'exposition à des produits chimiques carcinogènes lors de production de caoutchouc, de pétrole ou de chlorure de vinyle, de produits de nettoyage, de pesticides ou encore l'exposition passive à la fumée de cigarette. Cependant aucun de ces facteurs n'a permis d'établir de lien direct (Adamson et al. 2009).

## 2- Les glioblastomes multiformes (GBM) :

### 3.1- Définition :

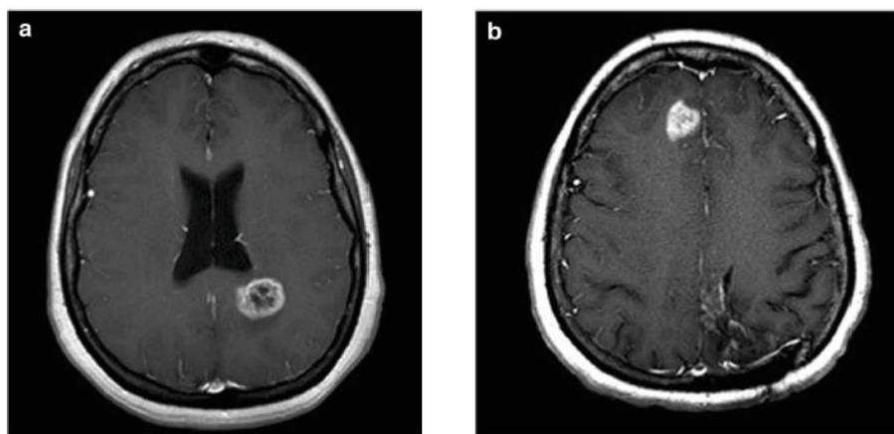


Figure 3 : A. IRM montrant un GBM initialement en pariétal gauche B. et sa récurrence en contra-latéral (Turner et al. 2014)

Initialement décrit en 1800 (Stoyanov et al. 2018), les glioblastomes multiformes sont des tumeurs cérébrales hautement invasives et létales qui en dépit de nouvelles avancées thérapeutiques présentent des récurrences à distance, 3 à 6 mois après exérèse tumorale, ne permettant une survie ne dépassant pas 12 à 15 mois en moyenne et ce malgré des traitements intensifs. En effet, ces tumeurs implacables ont une propension claire à la migration et l'invasion au travers du parenchyme neural sain provoquant des récurrences parfois jusqu'en contra-latéral. Ces gliomes de grade IV, hautement hétérogènes sur le plan génétique et phénotypique, (Urbanska et al. 2014) présentent des contours irréguliers et diffus, une hypercellularité ainsi

qu'un atypisme cellulaire donnant le nom de multiforme. Cette appellation aujourd'hui d'autant plus justifiée en raison de leur multiformités génotypique. Les glioblastomes sont également classés selon 2 types : les primaires ou « de novo » qui représentent environ 90% des GBM (Urbanska et al. 2014) et les secondaires issus du développement d'un astrocytome de grade II ou III plus rares et affectant des patients plus jeunes (Jiang and Uhrbom 2012).

Les tissus de glioblastomes présentent les caractéristiques morphologiques bien distinctes :

- Des cellules présentant un atypisme important dû aux altérations génétiques et épigénétiques au sein des cellules d'un même échantillon tumoral.
- Des nécroses pseudopalisadiques (ou formation de Scherer), formées à la fois de zones de mort cellulaire et de cellules voisines migrant loin des zones nécrotiques.
- De la néovascularisation due aux facteurs de croissance libérés par les cellules tumorales (Stoyanov et al. 2018).

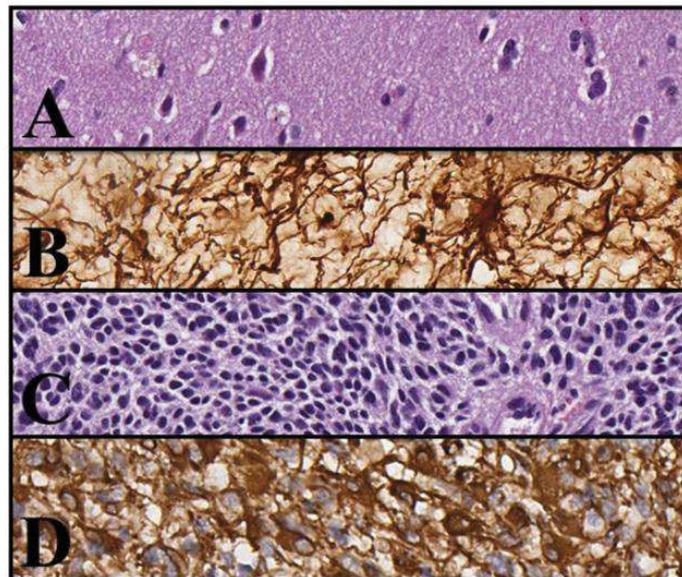


Figure 4 : Contraste entre le tissu cérébral sain et le GBM. A Tissu cérébral sain  $\times 400$ . B Astrocytes sains, visibles grâce au marqueur GFAP  $\times 400$ . C Hypercellularité et atypisme cellulaire des GBM  $\times 400$ . D Astrocytes néoplasiques de GBM, visibles grâce au marqueur GFAP  $\times 400$  (Stoyanov et al. 2018).

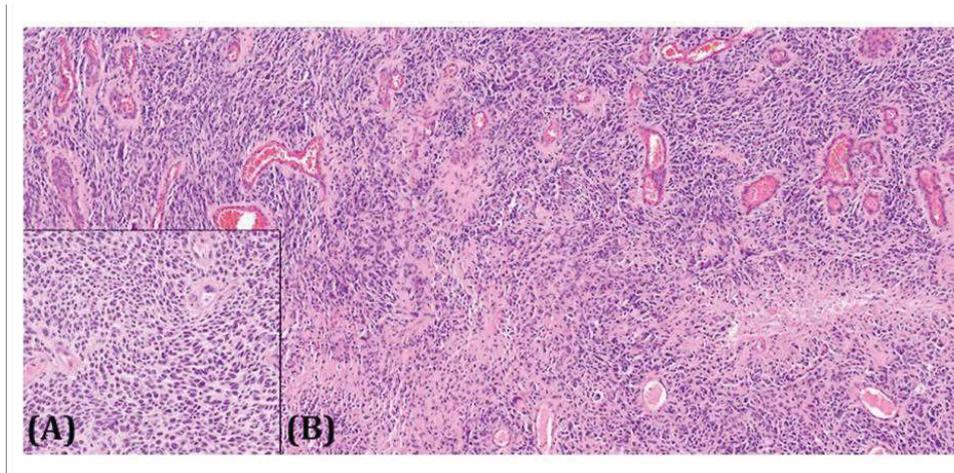


Figure 5 : GBM avec nécroses pseudopalissadiques et vaisseaux sanguins immatures (Stoyanov et al. 2018).

Les GBM au-delà des changements morphologiques ont aussi bon nombre d'altérations génétiques. Ces caractéristiques sont utilisées comme support de diagnostic (Louis et al. 2016).

### 3.2- Epidémiologie :

Les glioblastomes sont les gliomes les plus fréquents (65%) (Ohgaki and Kleihues 2005). En Europe et en Amérique du Nord, les GBM représentent 2 à 3 cas pour 100000 adultes par an. Chez les enfants l'incidence est de 1.1 à 3.6 pour 100000 enfants. Seulement moins de 3 % des patients atteints d'un glioblastome sont encore en vie cinq ans après le diagnostic, l'âge avancé étant le facteur prédictif le plus significatif d'un résultat médiocre en terme de survie (Ohgaki and Kleihues 2005). En 2011, la seule différence signalée entre les GBM de l'adulte et de l'enfant est l'indice de prolifération plus élevé chez l'enfant sur 11 cas rapportés. L'incidence de la GBM est plus élevée chez les Caucasiens, en particulier chez ceux qui vivent dans les zones industrielles (Mahvash et al. 2011).

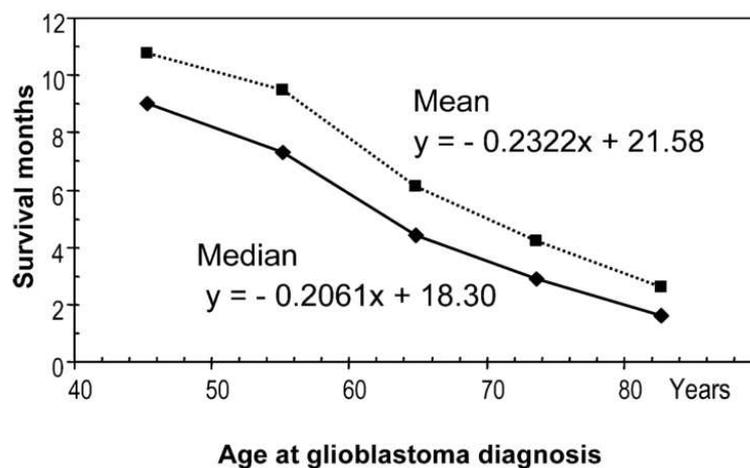


Figure 6 : Moyenne et médiane de survie des patients atteints de glioblastome (Ohgaki and Kleihues 2005).

### 3.3- Principales dérégulations génétiques associées aux GBM :

A ce jour, plus de 140 mutations génétiques ont été identifiées au sein des GBM. De manière générale les patients ont plusieurs mutations au sein de leur génome, et certains présentent même des hyper-mutations (Cai and Sughrue 2018). Suite à de larges études génomiques, trois principales voies de signalisation altérées dans les glioblastomes ont été identifiées :

- La voie des récepteurs tyrosine kinase (RTK/Ras/PI3K) comportant une amplification du récepteur à l'EGFR (mutée ou amplifiée dans 45% des GBM), la surexpression de PDGF récepteur  $\alpha$  (PDGFR  $\alpha$ ) ou l'inactivation de PTEN ou de NF1 (neurofibromine1) sont les altérations génétiques plus courantes.
- La voie P53 impliquée dans le senescence et l'apoptose. Dans les GBM, p53 et p14Arf sont alors inactivés.
- La signalisation de RB1 (Retinoblastoma protein 1) et p16Ink4a inactivée impliquée dans le cycle cellulaire.

De plus en immuno-histo-chimie les cellules de GBM sont positives pour la vimentine ainsi que pour GFAP (Jiang and Uhrbom 2012)(Cai and Sughrue 2018).

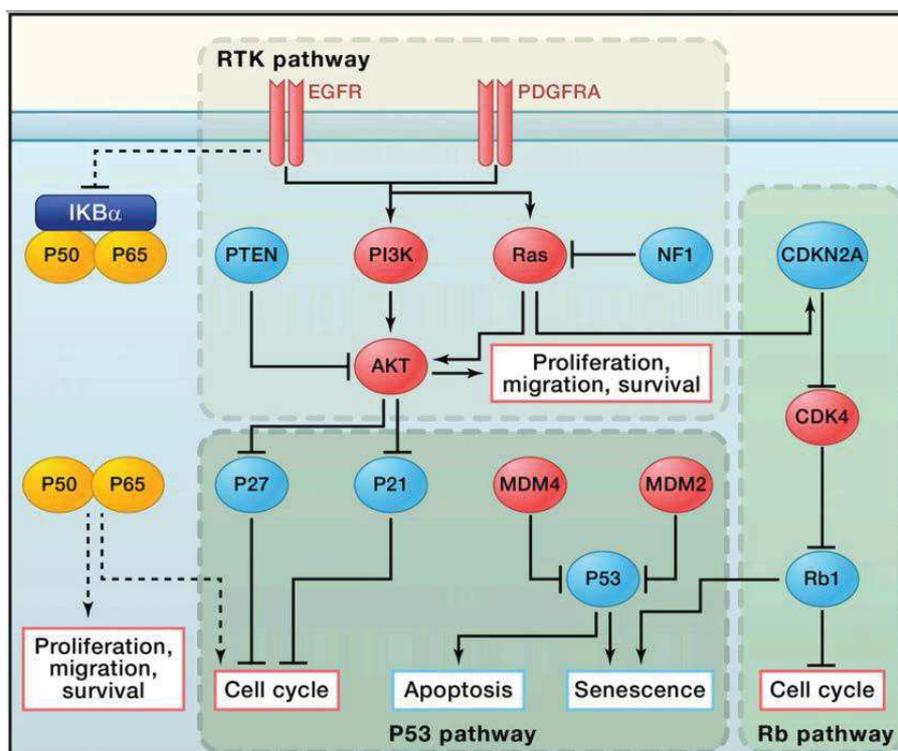


Figure 7 : Principales dérégulations génétiques associées au GBM. Le rouge indique les oncogènes surexprimés ou amplifiés dans les GBM, le bleu indique les gènes suppresseurs de tumeur mutés ou délétés (J. Chen, McKay, and Parada 2012).

Des modifications épigénétiques ont également été associées au GBM.

Il y a tout d'abord le promoteur de méthylation MGMT encodant pour la O6-méthylguanine DNA methyltransférase impliquée dans la réparation de l'ADN, causant ainsi l'échec des traitements en induisant la réparation des dommages à l'ADN causés par les agents alkylants. La faible expression de la MGMT et de sa méthylation a été corrélée avec une survie plus longue et un meilleur pronostic. Cette observation a confirmé le rapport selon lequel la méthylation du promoteur du MGMT réduit la résistance au traitement par le témozolomide (TMZ) (Hegi et al. 2005) (Cai and Sughrue 2018).

L'augmentation aberrante de l'expression du TERT est également liée à l'oncogenèse avec 83 % des GBM primaires portant les mutations. L'activation de ce promoteur muté dans la GBM permet aux cellules de contourner la sénescence et l'apoptose (Bell et al. 2015)(Cai and Sughrue 2018) et les patients ne présentant pas de mutations de TERT possèdent une meilleure espérance de vie (Cai and Sughrue 2018).

### 3.4- Classification des glioblastomes selon Verhaak et al. :

En 2010, Roel G.W. Verhaak et al. décrivent une classification des GBM basée sur l'expression de gènes. Ainsi, à l'aide d'un ensemble indépendant de 260 profils d'expression de GBM récoltés à partir du domaine public, ils définissent 4 catégories de GBM en fonction de leur expression de signatures de gènes : proneurale, neurale, classique ou mésenchymateuse. Les altérations géniques connues des GBM telles que EGFR, NF1 et PDGFRA/IDH1 également ont permis de définir respectivement, les catégories classiques, mésenchymateuses et proneurales. Ils ont de plus établi que les sous types de GBM impactaient la réponse aux différentes thérapies agressives (Ford and Mcvicar 2010). Dans notre contexte, cette classification va nous permettre une meilleure compréhension des sous-types cellulaires sur lesquels nous travaillons.

Ils décrivent donc les 4 sous-types :

- **Classique :** Ce sous type montre une amplification du chromosome 7 associée à la perte du chromosome 10 dans 100% des cas. L'amplification de l'EGFR a de plus été observée dans 97 % des sous-types classiques et rarement dans d'autres sous-types et 12 des 22 échantillons appartenant au sous type classique montraient une mutation ponctuelle pour EGFR vIII. De plus, ce sous type montre très peu de mutation de TP53 bien que le gène soit fréquemment muté dans les GBM. La délétion homozygote 9p21.3 ciblant CDKN2A (codant pour p16INK4A et p14ARF), est fréquemment associée à ce sous-type également et à 94% avec l'amplification de l'EGFR mais presque jamais avec les voies associées à RB. Les voies de signalisation des précurseurs neuronaux et des marqueurs de cellules souches comme NES, Notch (NOTCH3, JAG1, JAG1) et Sonic-Hedgehog (SMO, GAS1, GLI2) étaient fortement exprimées dans ce sous-type .

- **Mésenchymateux** : le sous type mésenchymateux montre majoritairement un niveau d'expression de NF1 plus faible. Il affiche de plus l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que CHI3L1 et MET ainsi qu'une augmentation des gènes associés à la famille des facteurs de nécroses tumorales de la voie NF- $\kappa$ B. De plus la combinaison d'une activité haute des marqueurs mésenchymateux et astrocytaires tel que CD44 et MERTK y est également associée.
- **Proneural** : Deux caractéristiques majeures de la classe proneurale sont des altérations de PDGFRA et les mutations ponctuelles de l'IDH1 (l'isocitrate déshydrogénase 1) par rapport aux autres sous-types. De plus des mutations fréquentes de TP53 et PIK3CA/PIK3R1 (en absence d'anomalie PDGFRA) y sont associées ainsi que des mutations associées au développement proneural SOX, DCX, DLL3, ASCL1 et TCF4. Le sous-type présente également une forte expression des gènes du développement tel que PDGFRA, NKX2-2, OLIG2.
- **Neural** : Le sous-type neuronal est caractérisé par l'expression de marqueurs neuronaux tels que NEFL, GABRA1, SYT1 et SLC12A5 (Ford and Mcvicar 2010).

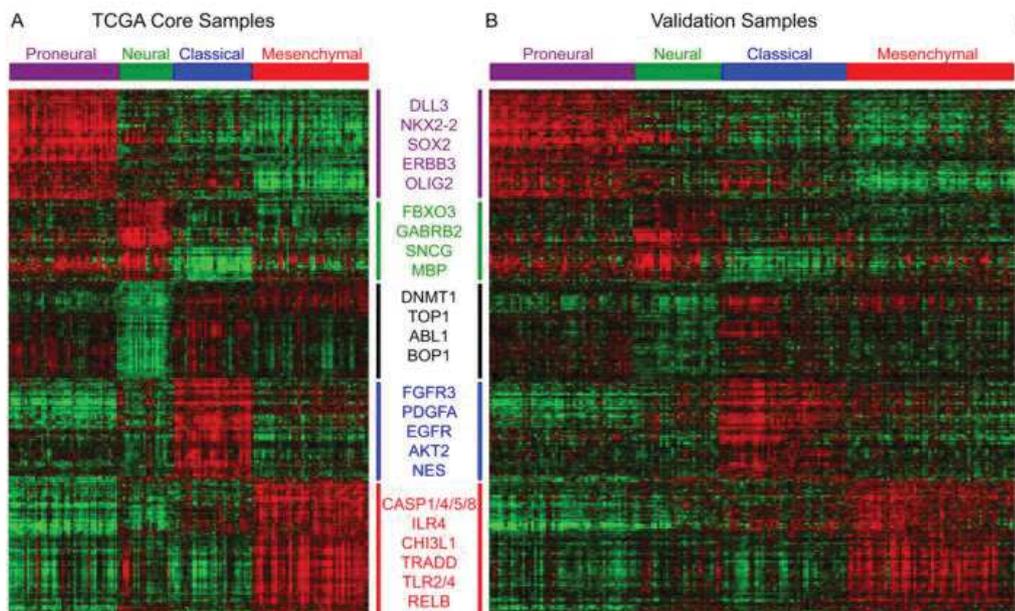


Figure 8 : Classification de Verhaak. Les données sur l'expression génique identifient quatre sous-types d'expression (Ford and Mcvicar 2010).

### 3.5- Les traitements contre les GBM :

La résection chirurgicale ainsi que la radiothérapie et la chimiothérapie sont les bases du traitement contre les GBM et prolonge la survie chez les patients jeunes. Les traitements anti cancéreux devraient permettre une régression tumorale et une augmentation de la survie. Classiquement, le schéma standard de traitement des GBM améliorant la survie suit le protocole de Stupp (Stupp et al. 2005), combinant le témozolomide, dérivé triazène précurseur du MTIC (monométhyl triazenoimidazole carboxamide ) actif, traitement de référence en chimiothérapie, à la radiothérapie (Cai and Sughrue 2018).

Les GBM sont des tumeurs hautement vascularisées, ce qui a inspiré la mise au point de thérapies géniques anti-angiogéniques visant à bloquer les voies dépendantes du VEGF. Le bevacizumab (), anticorps monoclonal utilisé en combinaison avec la chimiothérapie se lie sélectivement avec une forte affinité au VEGF. Il neutralise son activité biologique, de sorte à inhiber l'angiogenèse liée à la tumeur, à perturber la niche périvasculaire et a un effet contre les cellules de GBM exprimant le VEGF (Cai and Sughrue 2018). Néanmoins, son utilisation est controversée car bien que ralentissant la progression des GBM et augmentant la qualité de vie, il n'améliorerait pas la survie des patients (Blumenthal et al. 2014).

Les glioblastomes multiformes possèdent une haute prolifération et s'infiltrent dans les tissus sains environnants rendant la résection totale impossible et la radiothérapie peu efficace. De plus les cellules trouvées dans les zones hypoxiques présentent des résistances aux radiothérapies (Urbanska et al. 2014).

De ce fait, de nombreuses autres thérapies tentent d'être mises au point, telles que l'immunothérapie, l'hormonothérapie, la thérapie génique ou encore la thérapie par cellules souches.

L'immunothérapie pourrait s'appliquer aux patients atteints de GBM en favorisant la réponse immune. Bien que les capacités prometteuses de l'immunothérapie soient tempérées par le fait que les GBM ne sont pas des tumeurs très immunogènes en comparaison à d'autres tumeurs, ils présentent cependant un taux élevé d'infiltration des cellules T cytotoxiques, des cellules dites « natural killer » et des macrophages dans les zones périvasculaires et en intratumoral. Ces caractéristiques indiqueraient un potentiel clinique de l'immunothérapie à base de lymphocytes T (Cai and Sughrue 2018).

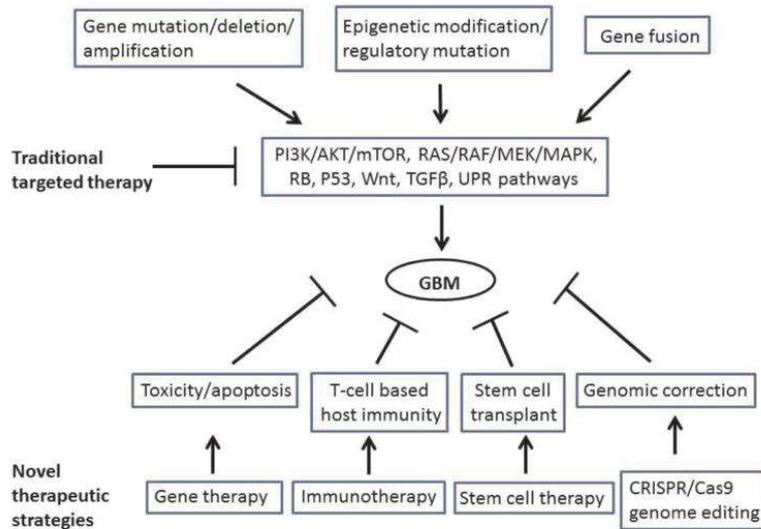


Figure 9 : Mécanismes moléculaires du GBM et stratégies thérapeutiques. Les stratégies traditionnelles ainsi que les nouvelles stratégies thérapeutiques ciblent les multiples voies de signalisation contribuant au développement de la GBM. Cependant, certaines nouvelles stratégies thérapeutiques sont indépendantes des voies de signalisation telle que : la thérapie génique, l'immunothérapie, la thérapie par cellules souches et la technologie CRISPR/Cas9 (Cai and Sughrue 2018).

Cependant, peu de composés ciblent actuellement la migration. Le BKM-120 (Buparlisib) est l'un d'entre eux. Ce composé cible la PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase), fréquemment dérégulée dans les cancers, impliquée dans la malignité et jouant un rôle dans la migration cellulaire sur certains types cellulaires. Ce composé pénètre la BHE et permettrait une diminution de l'invasion et de la migration des GBM *in vitro* sur les lignées cellulaires de GBM et les cellules souches de gliomes. *In vivo* le BKM a également montré une réduction marquée de la propagation tumorale chez des souris xénotransplantées (Speranza et al. 2016).

Au sein de l'équipe, une famille de composés, les Phostines, a également été développée, dont la Phostine PST3.1a, qui est un composé ciblant la MGAT5, dont l'augmentation est corrélée à un très mauvais pronostic. L'activité enzymatique de la MGAT5 est impliquée dans la dynamique des adhérences permettant l'interaction entre la cellule à son environnement. Le composé PST3.1a a montré des propriétés anti migratoires *in vitro* dès l'utilisation au nM et *in vivo* (15mg/kg) après xénotransplantation (Hassani et al. 2017).

### 3.6 Origine des Glioblastomes :

Les GSC sont actuellement connues comme ayant une responsabilité majeure dans la récurrence à distance des GBM, elles possèdent une haute capacité migratoire et ont été observées comme radio et chimio-résistantes en raison de leurs mécanismes de réparation de l'ADN et d'auto-régénération. Elles sont

aujourd'hui la cible de nombreuses tentatives thérapeutiques. Selon le paradigme actuel, elles seraient à l'origine des tumeurs et dériveraient des neural stem cells.

### **3.6.1 - Les Neural Stem cell (NSC) comme origine des glioblastomes :**

Plusieurs théories sont proposées quant à l'origine des glioblastomes. Traditionnellement, il était pensé que ces tumeurs provenaient de la transformation maligne de cellules gliales (astrocytes ou oligodendrocytes) différenciées du système nerveux central (SNC) qui subiraient une "dé-différenciation", de sorte à acquérir un phénotype souche. Cette théorie était basée sur le fait que le système nerveux central était considéré comme ne pouvant pas faire de neurogénèse en post-natal et que les astrocytes et oligodendrocytes étaient les seules cellules capables de division.

Puis Altman, Das, Goldman et Nottebohm démontrèrent l'existence d'une neurogénèse adulte chez le rat (Chesler, David, Berger, and Quinones-Hinojosa 2012)(Das, n.d.). Les études qui suivirent leur découverte mirent en évidence qu'il en était de même chez l'Homme à l'âge adulte et que des populations de cellules souches neurales se situaient au niveau de la zone subventriculaire (SVZ) et de la zone subgranulaire (SGZ) du gyrus denté. L'identification des NSC se trouvant principalement dans ces zones a été faite dans les années 1990 (Jiang and Uhrbom 2012). Il a été démontré que ces NSC expriment plusieurs marqueurs tels que Nestine, Sox2, CD133 et GFAP bien que ces marqueurs ne leurs soient pas spécifiques.

De plus, des études réalisées dans les années 1970 ont montré qu'une zone adjacente aux ventricules cérébraux était plus sensible à la gliomagénèse que le reste du cerveau (Hopewell and Wright 1969) (Copeland, Vogel, and Bigner 1975).

Les NSC de la zone subventriculaire (SVZ) sont donc devenues les cellules candidates pour l'origine des gliomes depuis plusieurs décennies et en se basant sur cette théorie, de nombreuses recherches se sont focalisées sur les similitudes phénotypiques et génétiques entre les cellules souches neurales et les cellules souche de gliomes (Chesler, David, Berger, and Quinones-Hinojosa 2012), (Sanai, Alvarez-Buylla, and Berger 2005).

Les premières observations des patients ont montré que les tumeurs cérébrales étaient souvent situées près de la SVZ suggérant une éventuelle provenance de la "plaque sous-épendymaire ». Une étude a montré que 93 % des cas de gliomes étaient en contact avec la paroi ventriculaire latérale (Globus and Kuhlenbeck 1944), (Barami et al. 2009).

Les voies de signalisation des NSC impliquées dans la régulation de la prolifération ou de la différenciation des NSC sont fréquemment altérées dans les gliomes. Par exemple la voie de signalisation de l'EGFR, très étudiée tant dans les NSC (car impliquée dans le développement embryonnaire, la prolifération des NSC et la neurogénèse adulte) que dans les gliomes, est mutée ou amplifiée dans 45% des glioblastomes. Un autre exemple, PTEN, une protéine tyro-phosphatase favorisant la survie dans le cas des NSC, est mutée ou supprimée de manière homozygote dans 36% des glioblastomes (Mc Lendon et al. 2008). Il en va de même pour BMI-1 impliqué dans la prolifération des gliomes et les capacités d'auto-renouvellement des NSC et

Notch et Wnt impliqués dans la plasticité et la régulation du cycle cellulaire. De plus, il a été vu que certaines combinaisons de mutations dans les NSC de la SVZ de souris permettent de générer des astrocytomes (Jiang and Uhrbom 2012).

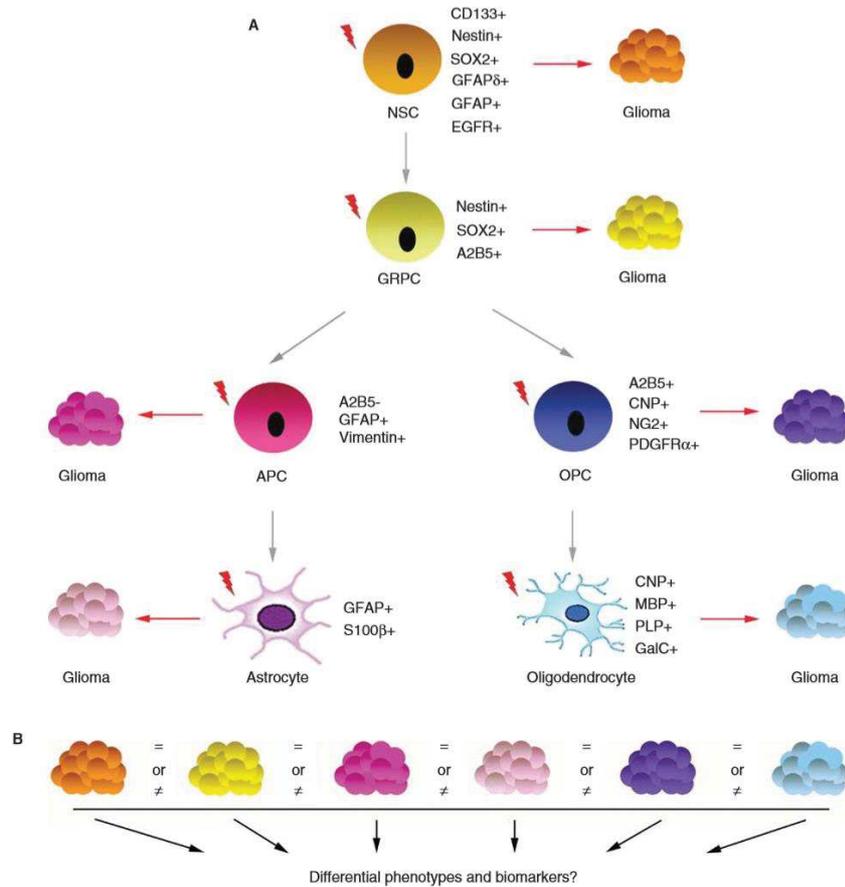


Figure 10 : Différenciation de cellules souches du SNC en astrocytes et oligodendrocytes, où chaque étape est définie par l'expression de marqueurs. Les éclairs rouges indiquent la survenue d'un événement oncogène qui induira le développement d'un gliome (Jiang and Uhrbom 2012).

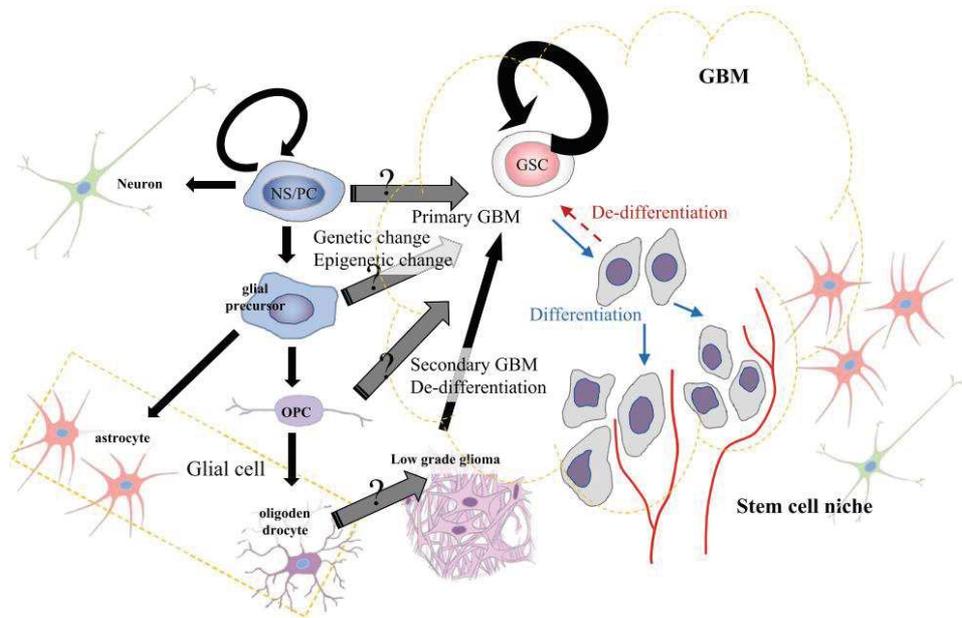


Figure 11 : Origine et différenciation des GSC par rapport à celles des NSC : Dans le cas des GBM secondaires, certaines cellules gliales se dé-différencient pour causer la tumorigénèse. Dans le cas des GBM primaires, il est supposé qu'ils dérivent des NSC ou des précurseurs des cellules gliales.

Des régulations génétiques et épigénétiques similaires à celles des NSC sont suggérées comme étant dérégulées dans les GBM. Les GSC hautement tumorigènes génèrent des populations de cellules hétérogènes au sein des GBM de par leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation multiple. (Kawamura et al. 2018). Ces GSC seraient responsables de la propagation tumorale et de l'invasion, de la résistance au thérapeutique classique et de la récurrence. (Eder and Kalman 2014) (Kawamura et al. 2018)

Enfin, Lee et al. en 2018, montrent que les NSC de type astrocytes présent dans la SVZ seraient les cellules à l'origine des GBM car contenant les mutations permettant le déclenchement de ceux-ci. Ils ont constaté, via le séquençage de tissus normaux de la SVZ, de tissus tumoraux et de tissus normaux corticaux de patients et de la microdissection laser, que les NSC de type astrocytes qui portent les mutations initiant les GBM, migrent de la SVZ et mènent au développement de gliomes malins de haut grade dans les régions éloignées du cerveau. (Lee et al. 2018)

De nombreuses études tendent à déterminer l'origine des gliomes, qu'ils proviennent de NSC de la SVZ, de cellules matures qui se différencient, des NSC de types astrocytes ou encore des OPC et il est donc difficile d'établir un consensus sur les cellules à l'origine des tumeurs.

### 3.6.2- Glioblastoma Stem Cell :

Le modèle de cellules souches neurales comme origine des gliomes a permis une meilleure compréhension de l'hétérogénéité de ces tumeurs. De plus, cela a permis à de nombreuses études de se

pencher sur les similitudes entre ces deux types cellulaires permettant de mieux les caractériser (Sanai, Alvarez-Buylla, and Berger 2005).

Comme mentionné précédemment, les GBM contiennent des GSC hautement tumorigènes, capables d'auto-renouvellement et de différenciations multiples générant des populations très hétérogènes de cellules du fait de leur phénotype souche, et sont responsables de la propagation des tumeurs (Eder and Kalman 2014) (Climate et al. 2004) (Kawamura et al. 2018). Ce sont ces GSC qui sont supposées être responsables de la récurrence. Elles sont également capables de déclencher à nouveau une tumeur lors d'une transplantation. Mises en culture elles peuvent spontanément former des neurosphères en absence de sérum et en présence de facteurs de croissance tels que FGF et EGF (ce qui est également le cas pour les NSC) (Kondo, Setoguchi, and Taga 2004) (Kawamura et al. 2018). Elles peuvent être identifiées par la présence positive des marqueurs CD24, CD44 et Hes3, et expriment un niveau important de facteurs de transcription FOXG1 et SOX2 (Stoyanov et al. 2018) (Bulstrode et al. 2017).

Les GSC de type pro-neural ont tendance à exprimer CD133, alors que celles de type mésenchymateux ont tendance à exprimer CD44. De plus celles exprimant CD133 sont connues pour être sensibles à l'inhibition de Notch qui dans le cas des GSC est un inducteur de différenciation. Comme dans le cas des NSC, lorsque les GSC se différencient en cellules neuronales ou gliales, leur capacité d'auto-renouvellement est alors diminuée dans les GBM. L'induction de la différenciation des GSC est d'ailleurs une des stratégies thérapeutiques proposées actuellement pour contenir le potentiel tumorigène en modifiant le devenir des GSC, en les restreignant à un état post-mitotique mature (Kawamura et al. 2018).

### **3.6.3- Résistances aux thérapeutiques : Radio et Chimio résistance**

Le traitement de base des GBM comprend de la chirurgie et de la radiochimiothérapie. Néanmoins, la haute hétérogénéité fonctionnelle et moléculaire intra et inter-tumorale des GBM, associée à l'activité aberrante des récepteurs tyrosine kinase contribue à l'échec des traitements et constitue un frein majeur aux traitements.

Au sein d'un même GBM, différents sous types aux profils moléculaires distincts coexistent et présentent des profils phénotypiques différents et donc des réponses thérapeutiques différentielles (Lathia and Mack 2015) (Nakano 2015). Chez des patients atteints de GBM primaire il a été montré que les cellules d'une même tumeur ont une expression différentielle des gènes impliqués dans la signalisation oncogène, la prolifération, la réponse immunitaire et l'hypoxie (Patel et al. 2014) (Lathia and Mack 2015) et que cette augmentation de l'hétérogénéité est associée à une diminution de la survie des patients.

Les GSC au sein des GBM vont quant à elles permettre le maintien de la tumeur, la récurrence et contribuer à la chimio et à la radio-résistance. Elles sont capables de modifier leurs caractéristiques en réponse aux chimio et radiothérapies en augmentant l'activité de l'efficacité des mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN (Lathia and Mack 2015) (Bao et al. 2006) ainsi qu'en exacerbant l'activation des points de contrôles des dommages à l'ADN via les protéines ChK1 et ChK2 (checkpoint kinases 1 et 2) (Rich 2007).

Elles surexpriment également des gènes des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) permettant l'efflux et donc la sortie des agents de la chimiothérapie des GSC (G. Liu et al. 2006). Plusieurs autres mécanismes moléculaires ont été identifiés comme médiateurs de la résistance thérapeutique incluant Notch, NF- $\kappa$ B, EZH2 et PARP montrant que les GSC sont capables de développer de nombreux mécanismes de résistance pouvant nécessiter la combinaison d'agents ciblés. De plus, les mécanismes de résistance thérapeutique peuvent être non seulement innés, mais également évoluer à partir de l'exposition à des facteurs du microenvironnement tels que l'hypoxie et le stress métabolique (Lathia and Mack 2015). Enfin leur capacité hautement migratoire va leur permettre d'échapper à l'exérèse supra-totale.

Comme les GBM, les GSC présentent également des profils différents. Par exemple, deux sous types distincts de GSC, proneural et mésenchymateux ont été identifiés (Nakano 2015). Étant donné les ensembles de gènes et les voies de signalisation différentiellement régulées dans les différents sous-types de GBM (Ford and Mcvicar 2010), les GSC de chaque sous-type peuvent également héberger des voies distinctes responsables de leur phénotype unique dans l'initiation de tumeur, la propagation et la résistance aux thérapies. Cette hétérogénéité inter-tumorale des GSC contribue aux difficultés de ciblage rencontrées (Nakano 2015).

Ces cellules radio et chimiorésistantes peuvent échapper à la chirurgie car se trouvant loin de la tumeur d'origine. Durant leur migration au travers du cerveau sain, elles vont être en contact avec de nombreux signaux extracellulaires, physiques ou chimiques, inhérents à l'environnement dans lequel elles se trouvent, qu'elles pourront également modifier. Il est donc important d'étudier ces GSC dans un contexte migratoire. Par conséquent, dans notre contexte, et tout au long de ces travaux, nous avons travaillé sur les cultures primaires de cellules souches de GSC, issues de patients, dans un contexte de migration afin d'étudier leur interaction avec la matrice extracellulaire.

### **3- Matrice extracellulaire (MEC) :**

#### **4.1- Définition :**

La matrice extracellulaire est une structure tridimensionnelle non cellulaire présente dans tous les organes et qui est essentielle à la vie. Chaque organe possède une MEC à la composition chimique unique générée dès les premiers stades embryonnaires. Au-delà de son utilité de soutien physique de l'intégrité et de l'élasticité des tissus, la MEC est une structure hautement dynamique constamment remodelée de sorte à contrôler l'équilibre tissulaire (Hynes 2009) (Bateman, Boot-Handford, and Lamandé 2009).

La MEC joue un grand rôle lors du développement car une mutation de la fibronectine ou du collagène est alors mortelle à l'état embryonnaire (Bonnans, Chou, and Werb 2014).

De plus il y a deux principales catégories de MEC. Les matrices interstitielles des tissus, entourant les cellules en leur fournissant un support structural et les membranes basales qui sont des formes particulières de MEC séparant les épithéliums du stroma (Bonnans, Chou, and Werb 2014).

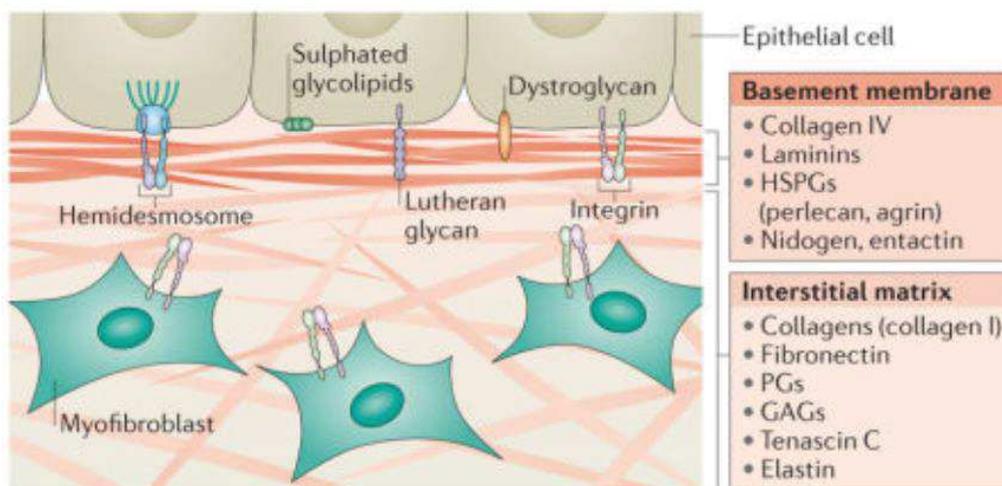


Figure 12 : Composition du matrisome(Bonnans, Chou, and Werb 2014)

## 4.2- Composition de la MEC :

Chez les mammifères, la MEC est composée de près de 300 protéines, connues sous le nom de matrisomes et comprenant des protéines comme les collagènes, les protéoglycans ou encore les glycoprotéines (Bonnans, Chou, and Werb 2014) et de nombreux polysaccharides comme l'acide hyaluronique (Frantz, Stewart, and Weaver 2010). Le matrisome comprend 43 sous-unités de collagènes qui sont les principales protéines structurales de la matrice extracellulaire et se trouvent sous les formes fibrillaires (collagènes I-III, V et XI) et non fibrillaires. Les fibrilles de collagène augmentent la résistivité des tissus car ils confèrent à la MEC une résistance aux tractions.

Les 36 types de protéoglycans, comme l'aggrécane, le versican, le perlecan ou la décorine, sont des protéines comprenant des chaînes latérales de glycosaminoglycans (GAG) et s'intercalent entre les fibres de collagène. Ils remplissent les espaces interstitiels extracellulaires, permettant l'hydratation en retenant l'eau dans les tissus.

Il existe environ 200 complexes glycoprotéiques tels que les laminines, les élastines, les fibronectines, les thrombospondines, les tenascines ou le nidogène, possédant de nombreuses fonctions. Ils jouent un rôle majeur dans l'assemblage de la MEC, dans l'interaction Cellule/MEC en permettant la liaison aux intégrines et servent de réservoir aux facteurs de croissance liés à la MEC qui sont alors libérés par protéolyse (Bonnans, Chou, and Werb 2014).

Il existe de nombreuses protéines de MEC non associées au matrisome, essentielles au remodelage des matrices telles que des facteurs de croissance, des cytokines, des mucines, des lectines, des galectines, des sémaphorines, des plexines ou encore des enzymes modificatrices de la MEC.

Les matrices interstitielles des tissus sont principalement composées de collagène I et de fibronectines, conférant un maintien structural aux tissus.

La membrane basale quant à elle est plus compacte, et contient majoritairement du collagène IV, de la laminine, des héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) ainsi que des protéines comme les nidogène ou l'entactine, sécrétées par les cellules épithéliales, endothéliales et les myofibroblastes exprimant des intégrines (P. Lu, Weaver, and Werb 2012) (Bonnans, Chou, and Werb 2014).

### **4.3- La matrice extracellulaire du cerveau :**

#### **4.3.1- Matrice interstitielle :**

La MEC constitue 10 à 20 % du volume du cerveau. Les neurones, les cellules gliales ainsi que les vaisseaux sanguins sont maintenus en place par la MEC (Vehlow and Cordes 2013). Elle a non seulement une fonction structurelle, mais aussi un rôle majeur dans le développement du cerveau, la survie cellulaire, la migration, la maturation, la différenciation et l'homéostasie tissulaire (Hottinger, Abdullah, and Stupp 2016). Dans l'ensemble, le parenchyme cérébral n'a pas la matrice de collagène fibrillaire rigide typique des autres tissus, ce qui explique sa consistance gélatineuse (Cuddapah et al. 2014b).

La MEC du parenchyme de cerveau adulte est composé d'acide hyaluronique ou hyaluronan (HA), de protéoglycans de la famille des lecticans, de tenascines entremêlées ainsi que de protéines spécifique du cerveau comme les neurocans et les brévicans. La fibronectine est peu présente dans le SNC mais est sécrétée par les astrocytes (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018). Les molécules de la MEC se liant à l'eau sont principalement produites par les astrocytes et les oligodendrocytes et forment une sorte de gel qui remplit les espaces extracellulaires du cerveau (Cuddapah et al. 2014b).

- **L'acide Hyaluronique (AH) :**

L'AH est une protéine essentielle de la MEC du SNC car constituant l'une des bases de son treillis, auxquelles vont se lier les protéines de liaison ainsi que les protéoglycans pour former un réseau tridimensionnel. L'acide hyaluronique est une très grande protéine linéaire non ramifiée composée d'une répétition de disaccharides, d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine, et synthétisée sous la membrane plasmique (contrairement aux autres GAG synthétisés dans l'appareil de Golgi). Dans les MEC d'un cerveau sain, il assure l'intégrité biomécanique, la structure et l'assemblage des tissus. (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018)

- **Les protéoglycans :**

Les protéoglycans possèdent un noyau protéique portant une chaîne latérale GAG, le plus communément Héparan Sulfate (HS), Chondroïtine Sulfate (CS) ou keratan/dermatan sulfate. Ce sont des acteurs clés dans l'interaction cellules/MEC.

Une famille importante de protéoglycans au sein du SNC est celle des lecticans. Ils sont constitués d'une protéine centrale et d'un GAG. Ils sont composés d'un domaine de liaison globulaire N-terminal à l'acide hyaluronique, d'un domaine central avec une chaîne carbohydrate N- et O- liée dont la taille varie et d'un domaine glomérulaire C-terminal contenant une lectine de type C, de l'EGF (endothelial growth factor) et d'un domaine de protéines régulatrices CRP. Les lecticans se lient à l'AH via leur extrémité N-terminale et aux tenascines, aux glycoprotéines ou aux glycolipides des membranes plasmiques via l'extrémité C-terminale, permettant ainsi le lien entre les cellules et la MEC.

Dans le cerveau, les principaux protéoglycans sont les agrécans (ACAN), les versicans (VCAN), les neurocans (NCAN) et surtout les brévicans (BCAN) (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

Les brévicans sont une composante majeure de la MEC du SNC produites par les neurones et les astrocytes. Avec les agrécans, la tenascine R et les isoformes des versican V2, ils constituent le maillage de la MEC à base d'AH du cerveau adulte. Leur expression est augmentée dans les gliomes et est corrélée avec leur invasivité (Chrissa A. et al. 2009).

- **Les glycoprotéines :**

**La Tenascine :** la tenascine est une grande protéine multimérique, majoritairement exprimée durant le développement embryonnaire puis sous-exprimée chez l'adulte et ré-exprimée dans les conditions pathologiques (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

#### **4.3.2- La membrane basale :**

Les membranes basales du cerveau sont composées de la même manière que dans les autres organes (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018). Ce sont des feuilletts hautement organisés et spécialisés de 50 à 100 nm d'épaisseur, qui entourent les vaisseaux sanguins dans tous les tissus. Dans le cerveau, l'arbre vasculaire comprenant les gros vaisseaux, les capillaires et les méninges, est encerclé par de la membrane basale, riche en fibronectine, en laminine et en vitronectine (augmentant la motilité des cellules de gliome). Elle fonctionne comme une barrière physique et biochimique qui sépare les cellules épithéliales, dérivées du mésoderme des neurones et des cellules gliales dérivées de l'ectoderme. C'est aussi une composante importante de la BHE, permettant son maintien via la formation de jonctions serrées. Les perturbations de cette membrane basale dans les états pathologiques ont été liées aux dysfonctionnements de la BHE (Cuddapah et al. 2014b).

#### 4.4- La MEC dans les glioblastomes :

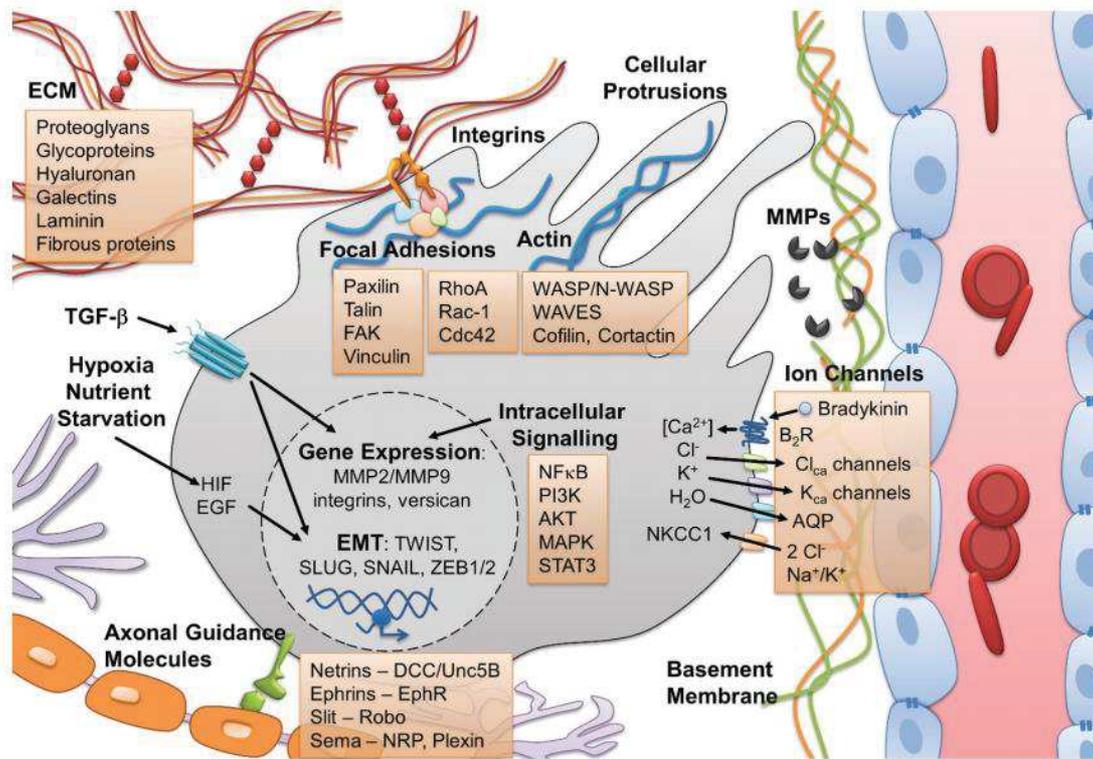


Figure 13 : Mécanismes impliqués dans la migration des cellules de GBM. Le phénotype migratoire des cellules GBM est régulé par ses interactions complexes, des cascades de signalisation, ainsi que des caractéristiques environnementales et cellulaires.

Dans les gliomes (comme dans les autres types de cancer en général), la composition et la dynamique de la MEC diffèrent de celle du cerveau sain, car considérant que les composants de la MEC sont exprimés uniformément dans le cerveau, dans les GBM les protéines fibreuses ou encore la laminine sont régulées à la hausse (Hottinger, Abdullah, and Stupp 2016). La MEC, en plus de sa fonction de réservoir des facteurs de croissance et de son rôle structural, est cruciale à la dissémination des GBM. En plus de leurs déplacements le long des axones myélinisés, les cellules de GBM se disséminent dans les régions saines, le long des membranes basales des vaisseaux sanguins ou de la glia limitans (entourant les vaisseaux sanguins) ou se trouve des protéines fibreuses telles que le collagène, la fibronectine, la laminine ou encore la vitronectine. Ces composants de la MEC ont été détectés sur la paroi des vaisseaux sanguins néoplasiques dans tous les GBM où ils peuvent agir comme promoteur de résistance et d'invasion (Vehlow and Cordes 2013). La fibronectine et la vitronectine augmentent dans les cas de tumeurs infiltrantes et les isoformes de la fibronectine avec un extra domaine A ou B (EDA et EDB) semblent se limiter à la tumeur et sont absents des régions saines.

La laminine a également été observée au niveau de bord invasif des GBM et la vitronectine entoure les cellules tumorales ayant envahi le parenchyme cérébral sain indiquant leurs implications dans la

progression des glioblastomes (Vehlow and Cordes 2013). En effet, les cellules de glioblastomes peuvent sécréter leurs propres protéines de la MEC. Kawataki *et al.* en 2007 ont observé qu'*in vitro* les lignées A172, T98G, KG1C et U251 ont été capables de synthétiser les laminines Lm-411, Lm211, Lm-511, et en moins grande quantité, Lm-221, Lm-421 et Lm-521 (Kawataki et al. 2007).

Le collagène I a, quant à lui, été détecté au sein des tissus connectifs interstitiels intra et inter tumoraux et pouvant servir de guidance pro-invasive. Le collagène XVI a également été identifié dans les échantillons de GBM de patients, bien plus fortement exprimé que dans le cerveau normal (Vehlow and Cordes 2013). De plus, le collagène XVI a été vu comme exprimé *in vitro* par les lignées de cellules souches de glioblastomes U-87 et 86HG39 et des cultures primaires. Il est également exprimé de manière importante dans les cellules de GBM au niveau des vaisseaux sanguins (Senner et al. 2008).

Les cellules de glioblastome sécrètent des protéines de la MEC dans le microenvironnement et cette action pourrait dépendre des conditions de croissance 3D *in vivo* et *in vitro*. Néanmoins la plupart des études *in vitro* se font sur des supports bidimensionnel (2D) qui n'intègrent pas les effets supplémentaires des interactions des cellules tumorales avec la MEC en tant qu'environnement tridimensionnel (3D). Comme en culture, les cellules de glioblastome peuvent sécréter des protéines de la membrane basale comme la laminine, la vitronectine, la fibronectine ou encore du collagène, l'invasion peut-être rendue possible ou favorisée par la sécrétion autonome de protéines de la MEC par les cellules de GBM (Vehlow and Cordes 2013).

Dans les tumeurs malignes, il y a une augmentation de l'AH favorisant l'augmentation de la croissance, de la motilité et de l'invasion. Dans les gliomes, il induit l'expression de CD44, PTEN, de MMP et d'OPN (ostéopontine) (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

Les Syndecans-1 sont des protéoglycans héparanes sulfates transmembranaires se liant aux thrombospondines dont l'expression est augmentée dans les glioblastomes, en particulier dans le type mésoenchymateux et est interprétée comme une conséquence de l'activation de NF- $\kappa$ B.

Les glypican-1 sont également exprimés par les cellules de gliomes et permet l'augmentation de leur réponse au FGF-2 (fibroblast growth factor 2).

Dans les gliomes de haut grade, la plupart des isoformes de brévican sur-salicylés sont présents, bien qu'absents autour de gliomes de bas-grade. Les brévican permettent une amélioration de l'expression de la fibronectine à la surface des cellules de gliomes et, après clivage protéolytique par ADAMTS4, ils se lient à la fibronectine, ce qui va conduire à une augmentation des intégrines, favorisant ainsi la motilité des cellules de gliomes (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

Presque toutes les tumeurs solides expriment la glycoprotéine tenascine-C (TN-C), mais la concentration la plus élevée a été trouvée dans les gliomes et sa quantité est corrélée à la malignité. Elle agit directement sur les comportements des cellules de gliomes via sa liaison aux intégrines et indirectement via ses liaisons aux brévican et aux neurocan. Elle est donc impliquée dans la migration, la régulation de

l'assemblage des adhérences focales ou le changement dans l'expression de gènes permettant de moduler la composition de la MEC et stimule l'invasivité via l'induction de MMP.

La tenascine-R (TN-R) quant à elles, est inversement corrélée à la malignité car diminuée dans les glioblastomes (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

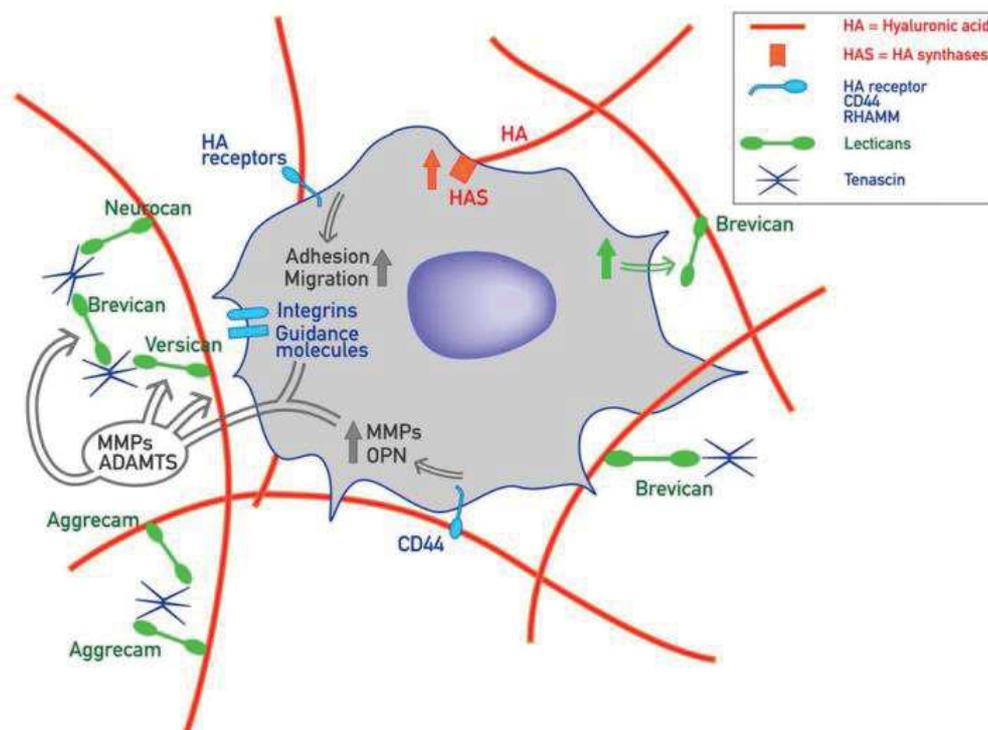


Figure 14 : Les cellules de gliome sculptent leur matrice extracellulaire. Les composants de la MEC se lient aux cellules de gliomes via des récepteurs tels que CD44, RHAMM les intégrines. Ces récepteurs régulent l'adhésion, la migration ou l'expression de divers gènes, en particulier des protéases telles que les MMP, ADAMTS ou OPN (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

#### 4.5- Dégradation de la MEC pendant l'invasion tumorale :

En plus de la sécrétion de protéines matricielles dans le microenvironnement, les cellules de glioblastome expriment des enzymes de dégradation et de remodelage de la MEC permettant l'infiltration. (Rao 2003)

- **Les protéases :**

Les protéases facilitent la dissémination des cellules tumorales en clivant les composants protéiques de la MEC. Dans ce processus, elles doivent être localisées en extracellulaire ou concentrées dans des régions spécialisées de la membrane plasmatique (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018). Dans les glioblastomes, trois groupes de protéases sont corrélées à l'agressivité et l'invasion grâce à leurs capacités de dégradation des constituants de la MEC : les sérine protéases, les cystéine protéases et les métalloprotéinases (MMP)

comprenant les ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) et les ADAMT (avec un motif thrombospondine) (Rao 2003)(Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018). À la surface de la cellule, les protéases peuvent être liées à la membrane plasmique par l'intermédiaire de récepteurs plus ou moins spécifiques (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

Du côté des sérine protéases, l'activateur de plasminogène de type urokinase (uPA) ainsi que son récepteur membranaire (uPAR) ont été identifiés comme induisant la dégradation de la fibronectine ou de la laminine et contribuant à l'agressivité des cellules de GBM. L'uPA se situerait majoritairement en bordure de la tumeur tandis que l'uPAR peut se situer à l'intérieur.

La cathepsine B est une cystéine protéase elle aussi associée au phénotype invasif et, liée à la dégradation de la laminine et du collagène. De plus, sa surexpression est corrélée à une survie globale plus courte des patients et une inhibition de son expression permet de diminuer l'invasion.

Les endopeptidases MMP peuvent être regroupées en fonction de leur structure et de la spécificité de leur substrat. Il existe des MMP pour les collagénases, les gélatinases, les stromelysines, les matrilysines ou encore des MMP de type membranaire. Toutes requièrent une activation par clivage enzymatique avant d'initier les dégradations des protéines matricielles (Nakada, Okada, and Yamashita 2003). Dans le cerveau sain, l'expression des MMP est basse alors qu'une surexpression est présente dans les GBM. Les MMP ont également été corrélées à la radiorésistance et à la chimiorésistance.

L'activité collagénase des MMP-2 est très augmentée dans les GBM en comparaison avec les gliomes de bas grade. Les MMP-9 quant à elles, sont associées au GBM exprimant l'EGFR III et ont été détectées en bordure de la tumeur et sur les sites de prolifération endothéliale, mettant en lumière leur rôle dans l'angiogenèse et leur implication dans l'agressivité des GBM. In vitro, la diminution des MMP-9 diminue l'infiltration des cellules de GBM (Vehlow and Cordes 2013). Leur expression peut-être régulée par l'activation de STAT3, l'EGF, la fibronectine, la vitronectine, les interleukines, par le facteur de nécrose tumorale TNF- $\alpha$  ou encore par le TGF- $\beta$ .

Inversement, MMP-2 et MMP-9 sont capable de convertir TGF $\beta$ 1 en sa forme active pro migratoire (Hottinger, Abdullah, and Stupp 2016).

Les MMP interagissent avec quatre isoformes d'inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases : TIMP1 à TIMP4. Les TIMP peuvent inhiber les MMP mais également permettre leur activation et un niveau élevé de leur expression est associé à un mauvais pronostic. Leur rôle paradoxal reste donc pour le moment difficile à définir (Hottinger, Abdullah, and Stupp 2016).

- **Les glucosidases :**

Les glycosidases ou glycosides hydrolases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des carbohydrates tel que les glycoprotéines ou les glycoaminoglycanes.

Les héparanases sont responsable de l'hydrolyse des héparanes sulfates. Leur expression est augmentée dans les gliomes et leur expression est corrélée à la prolifération, la migration et l'angiogenèse. Elles

modifient le microenvironnement tumoral en influençant les cellules de microglie ou les astrocytes réactifs, en améliorant l'excrétion de syndecan-1, dont le domaine extracellulaire à la surface de la cellule est associé aux cytokines et facteurs de croissances (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

Dans le cas des GBM, il y a de nombreuses modifications du niveau d'expression des protéoglycanes, mais également de leur régulation post-traductionnelle. Par exemple la sulfatation de la chaîne GAG des HS protéoglycanes est considérablement modifiée.

La 6O-sulfatation, qui est connue pour permettre les interactions des ligands ainsi que l'activation des voies des récepteurs tyrosine kinase (RTK), peut-être éliminée par les sulfatases extracellulaires telles que SULF1 et SULF2 (Wade et al. 2013) (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018). L'expression de SULF2 est augmentée dans les gliomes et confère un avantage de croissance à ces cellules. L'élimination de la 6O-sulfatation des HS protéoglycanes entraîne une activation plus importante des RTK tels que PDGFR et IGF1R, l'amélioration des facteurs trophiques, la biodisponibilité des chimiokines et, l'augmentation de la prolifération et de l'invasion des cellules tumorales (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

Les hyaluronidases pouvant dégrader l'acide hyaluronique, cela a été démontré comme pouvant modifier l'expression de CD44 impliqué dans plusieurs stades de la progression du cancer. Parmi les 3 types de hyaluronidases HYAL1, 2 et 3, HYAL1 est la plus présente dans les gliomes. Entre plusieurs lignées cellulaires de gliome malin (U87MG, U251MG, U343MG-A et U373MG), celles qui présentaient une activité hyaluronidase étaient plus invasives que celles qui étaient déficientes en hyaluronidase (S. G. Jin et al. 2009). Par conséquent, la modification des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes par les glycosidases semble être un mécanisme favorisant l'invasion par les cellules de gliome (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

La grande diversité de composition de la MEC cérébrale ou encore les nombreuses modifications qu'elle subit durant la progression tumorale vont conduire à des propriétés mécaniques variées du microenvironnement. En fonction des substrats rencontrés, les GSC vont donc devoir intégrer de nombreuses informations mécaniques, telle que la rigidité ou le confinement, relative à la concentration des protéines de la MEC, à son organisation ou réorganisation.

## 5- Les propriétés mécaniques du microenvironnement :

Les propriétés mécaniques des tissus varient grandement d'un tissu à un autre. In vivo, les cellules évoluent dans un microenvironnement complexe, hautement organisé où la composition diversifiée en protéines, sucres et autres cellules ainsi que leurs organisations dictent l'environnement mécanique local auquel une cellule est exposée. Cet environnement mécanique local est composé de forces endogènes générées par les cellules elles-mêmes, ainsi que de forces exogènes qui sont appliquées aux cellules par le microenvironnement. Les forces endogènes sont produites grâce au cytosquelette et à sa motilité, alors que les forces exogènes existent sous de multiples formes comprenant la gravité, les contraintes de cisaillement, la rigidité, les forces de traction et la compression, ou le confinement. Les cellules reçoivent les forces exogènes via leur interaction avec la MEC et la rigidité locale de la MEC joue un rôle important sur les comportements cellulaires. De plus, les forces physiques exogènes peuvent amener des modifications de l'environnement mécanique et en faire un microenvironnement dynamique en constante évolution (Handorf et al. 2015).

Les forces physiques contribuent au développement tissulaire et à l'homéostasie. Par exemple, la rigidité a un impact considérable en terme de développement sur la morphologie, la guidance axonale et la mise en place des structures du cerveau (Gangatharan, Schneider-Maunoury, and Breau 2018) ou encore sur le remodelage osseux (Handorf et al. 2015).

Dans le cas des os par exemple, lors d'une mobilité et d'une stimulation mécanique réduite, une diminution de la concentration de protéoglycans est observable associée à une diminution de la densité minérale osseuse. Lors des études sur l'effet de l'apesanteur lors des vols spatiaux, il a été vu que sans les forces physiques imposées par la gravité, la densité osseuse est drastiquement réduite dû aux ostéoblastes ne recevant pas les signaux physiques nécessaires à la production de MEC (Handorf et al. 2015). Ceci illustre l'implication des forces exogènes sur l'homéostasie tissulaire.

Par ailleurs, les cellules réarrangent constamment la MEC en modifiant la composition ou la topographie, permettant ensuite d'impacter les comportements cellulaires en retour également. Il s'agit donc d'une sorte de boucle de rétroaction entre les cellules et la MEC rendant les tissus hautement adaptatifs face aux propriétés qui leur sont imposées (Handorf et al. 2015).

### 5.1- La rigidité :

La rigidité est définie par la résistance d'un matériau à la déformation en réponse à une force appliquée et elle est exprimée par le module d'élasticité ou module de Young  $E$ . Nos tissus présentent un large panel de propriétés élastiques et sont composés d'une variété de protéines de MEC différentes dépendantes de la structure et des besoins biologiques des organes et les protéines composant ces MEC possèdent elles mêmes leurs propres propriétés élastiques. Par exemple l'os est beaucoup plus rigide que d'autres tissus car, il répond à la nécessité de fournir une structure au corps ou encore une protection des organes internes.

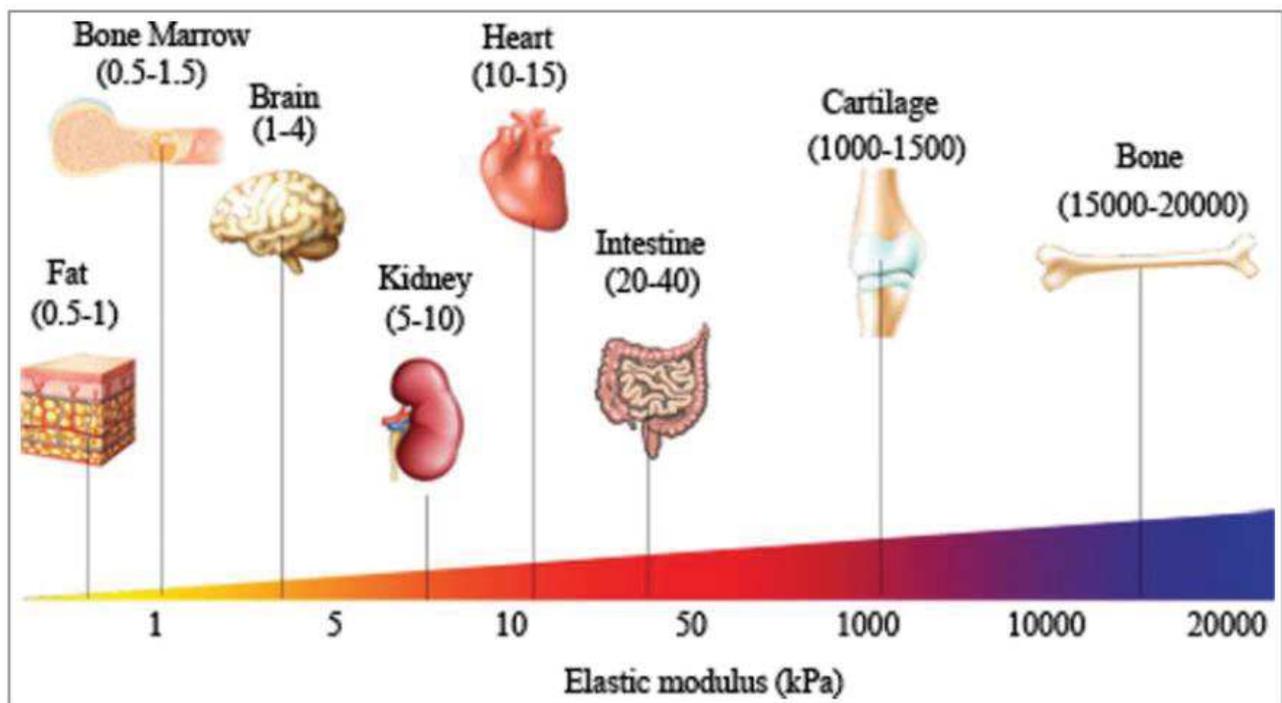


Figure 15 : Différents modules de rigidité entre les différents tissus humains suggèrent des propriétés mécaniques spécifiques à chacun d'eux. Les rigidités spécifiques de chaque organe sont corrélés à leurs fonctions (Handorf et al. 2015).

Dans le cerveau, lors de son développement, l'assemblage neuronal nécessite un contrôle et une coordination fine. La migration des neurones vers leur destination finale est essentielle pour les positionner aux bons endroits au bon moment permettant leurs bonnes intégrations dans le circuit. Pendant ou après leur migration, les neurones jeunes vont réaliser leur pousse axonale et donc acquérir les caractéristiques moléculaires des axones. Ces processus se déroulant durant le développement du système nerveux ont principalement été examinés d'un point de vue biochimique et moléculaire. Les conclusions sont que les événements permettant les adressages sculptant les circuits neuronaux sont régis par des guidages chimiques présents dans l'environnement des neurones. Néanmoins il a récemment été démontré, qu'en plus des signaux chimiques, les neurones *in vivo* sont exposés à divers signaux mécaniques tout au long de la vie, tel que la rigidité, la compression ou encore les forces de traction, influençant la dynamique et la morphologie de ceux-ci (Gangatharan, Schneider-Maunoury, and Breau 2018).

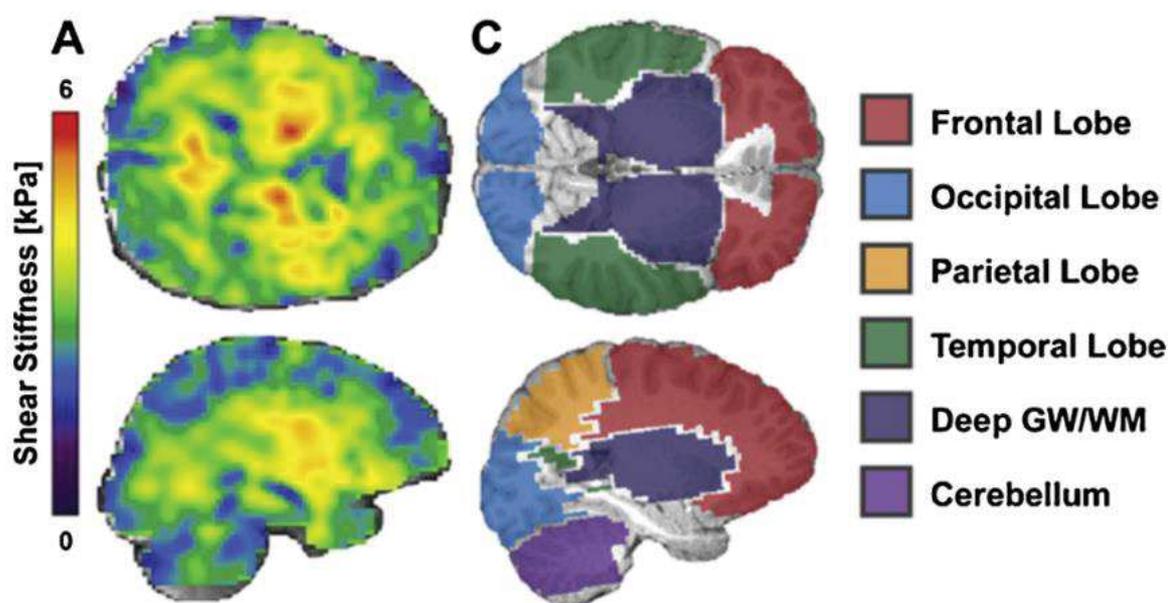
Par exemple, Koser et al. en 2016, suggèrent que la rigidité locale des tissus est détectée par les neurones *via* de canaux ioniques mécano-sensibles (tel que Piezo1) affectant les choix de trajectoire des axones (Koser et al. 2017).

Dans un cerveau, les différentes aires cérébrales présentent des rigidités différentes, dépendantes de leur constitution et de leurs besoins biologiques. De plus, ces propriétés mécaniques sont modulées au cours de la vie.

Il est connu que les propriétés mécaniques viscoélastiques lors du vieillissement sont affectées. En 2018, McIlvain G et al ont réalisé une caractérisation des rigidités cérébrales des différentes aires par Elastographie par Résonance Magnétique (MRE) chez l'humain adolescent et adulte (McIlvain et al. 2018). Ils ont ainsi pu déterminer que chez l'adolescent les lobes cérébraux temporaux et pariétaux étaient plus mous que chez les adultes, que les structures sous-corticales de la matière grise, les noyaux caudés et le putamen étaient significativement plus rigides chez les adolescents, et que l'hippocampe et l'amygdale de l'adolescent étaient beaucoup moins rigides que toutes les autres structures sous-corticales (Curtis L Johnson et al. 2015) (McIlvain et al. 2018).

Les propriétés mécaniques du cerveau sont donc modulées par des facteurs exogènes et par des facteurs endogènes tels que les modifications de la MEC mais également par le vieillissement (regroupant des facteurs endogènes et exogènes).

Cette étude propose également une cartographie des rigidités cérébrales, montrant l'hétérogénéité des propriétés mécaniques des aires et montrant que le cerveau sain présente un module d'élasticité compris entre 0,5 et 6kPa (McIlvain et al. 2018) (Curtis L Johnson et al. 2015).



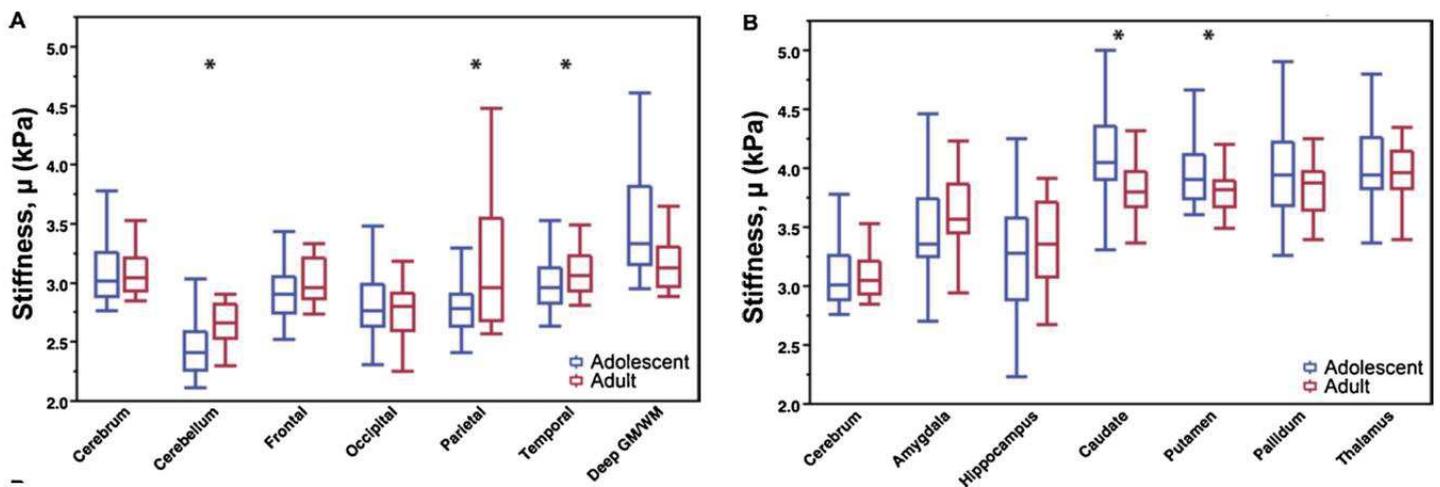


Figure 17 : Comparaison de la rigidité des différentes aires cérébrales chez l'adolescent et chez l'adulte a) dans les régions des lobes cérébraux, b) dans les structures de la matière grise sous-corticales (McIlvain et al. 2018).

Néanmoins, durant la progression tumorale il va y avoir des modifications importantes des propriétés mécaniques du microenvironnement, via le remodelage intensif de la MEC par les cellules tumorales et les cellules saines, et les tensions appliquées aux tissus durant la croissance de la tumeur.

### 5.1.1- La rigidité dans les cancers :

L'augmentation de la rigidité des tissus est une caractéristique de plusieurs états pathologiques, y compris les cancers. Dans le cas des cancers, l'augmentation de cette rigidité est due d'une part à la croissance tumorale, contraignant les tissus sains autour à des conditions physiques importantes comme l'augmentation du confinement, des tensions et de la compression appliquées sur les tissus.

Plus un matériau est rigide, plus il est résistant aux déformations et plus il est susceptible de développer des contraintes plus élevées. Durant la croissance tumorale, le stress exercé par la tumeur sur l'hôte doit être équilibré par un stress réciproque appliqué par l'hôte sur la tumeur. Par conséquent, les contraintes développées au sein d'une tumeur dépendent de la rigidité relative entre les deux tissus et d'un point de vue biomécanique, un raidissement est nécessaire pour qu'une tumeur puisse déplacer le tissu hôte et croître. L'estimation de Voutouri C. et al. (2014) (Voutouri et al. 2014) dit qu'une tumeur doit être au moins 1,5 fois plus rigide que les tissus normaux environnants, sinon le confinement par l'hôte prévaut à l'expansion de la tumeur (Gkretsi and Stylianopoulos 2018). Dans le cas de cancer du sein par exemple, la rigidité peut être augmentée jusqu'à dix fois ce qui est souvent l'indicateur d'un mauvais pronostic (Darci T. Butcher\*, Tamara Alliston et al. 2009).

La rigidité tumorale est principalement déterminée par la quantité de protéines de la MEC, comme le collagène et l'acide hyaluronique contenus dans la tumeur. Étant donné que l'intérieur de la tumeur est soumis

à la compression, sa rigidité est principalement déterminée par les protéines de la MEC à l'intérieur de la masse tumorale qui crée à l'intérieur de la tumeur des régions capables de résister aux contraintes de compression. Ces rigidités anormales rencontrées dans les cancers contribuent activement à la progression de la maladie en activant la motilité mécano-sensible au sein des cellules tumorales (Gkretsi and Stylianopoulos 2018).

### 5.1.2- La rigidité dans les gliomes :

Les tissus malins cérébraux présentent également des raidissements des tissus caractéristiques, comme dans les cas de cancer du sein, du colon ou du pancréas. Le cerveau in vivo est confiné dans un volume défini par le crâne et lors de la croissance tumorale la pression des fluides interstitiels est souvent augmentée localement dans la tumeur et dans les régions endommagées. Une telle pression locale comprimant le cerveau va donc impacter l'environnement mécanique local des cellules tumorales. Dans le cas des glioblastomes, la rigidité varie selon le grade du gliome. Pogoda et al. en 2014, ont mesuré la réponse à la compression des tissus cérébraux sains en comparaison avec les gliomes et ont observé que les gliomes se rigidifient plus vite sous la compression que les tissus sains et répondent plus fortement aux déformations mécaniques (Pogoda et al. 2014a).

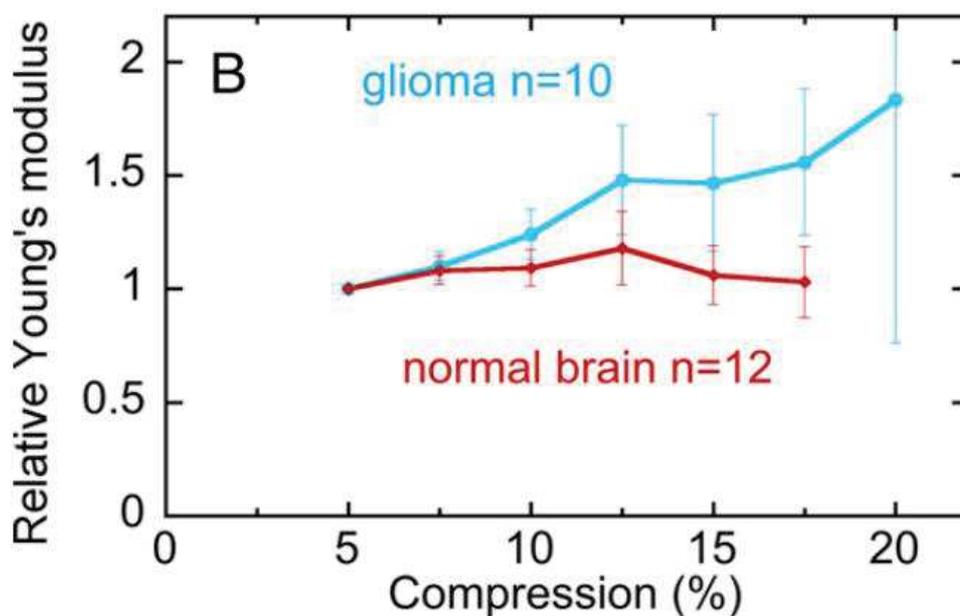


Figure 18 : Mesure d'élasticité des tissus de gliomes comparés à ceux de cerveaux de souris lors de l'application de compressions (Pogoda et al. 2014a).

En 2015, D.Chavet et al. ont réalisé une élastographie de contrainte de cisaillement sur 63 patients et ont montré que les méningiomes, les gliomes de bas grade et les gliomes de haut grade avaient respectivement un module de Young de  $33.1 \pm 5.9$  kPa,  $23.7 \pm 4.9$  kPa et  $11.4 \pm 3.6$  kPa, alors que le cerveau sain

possédait une rigidité de  $7.3 \pm 2.1$  kPa en moyenne (Chauvet et al. 2015). Inversement, il est également observé que les GBM hautement invasifs produisent des facteurs promoteurs de rigidité en quantité, tel que le collagène, la fibronectine ou la laminine (Mahesparan et al. 2003)

De manière générale, il est décrit que plus un substrat est rigide, plus la vitesse de migration des GSC est augmentée. Néanmoins, en 2017, Bangasser et al ont démontré un optimal de migration aux alentours de 100kPa pour les GSC, mettant ainsi en évidence des propriétés mécaniques spécifiques favorables à la migration et l'importance de la rigidité (Bangasser et al. 2017a).

En 2018, K.M. Pepin et al ont quant à eux, démontré que la rigidité tumorale était dépendante du statut tumoral. Ils ont observé que le statut IDH1 muté des GBM était corrélé à une rigidité plus importante. (Muldoon et al. 2016)

De nombreuses observations ont été faites quant aux mesures de rigidité des gliomes, certaines allant dans le sens d'une augmentation de la rigidité des GBM par rapport aux bas grade, d'autres observant l'inverse mais toutes attestant d'une rigidité accrue des gliomes en général comparativement au tissus sains. De plus, il est communément admis que l'augmentation de rigidité a un impact très fort sur les comportements migratoires des GSC, augmentant leur agressivité et probablement leur chimiorésistance (Singh, Brito, and Lammerding 2018).

Il est donc indispensable dans le cadre des études sur la migration des GSC (ou d'autres types cellulaires), de réaliser les observations dans un environnement mécanique approprié visant à mimer l'environnement in vivo.

## **5.2- Propriétés mécaniques de la MEC dans les cancers : élasticité et desmoplasie :**

Dans les cancers de manière générale, le raidissement de la MEC implique des interactions complexes de plusieurs processus différents. L'une des principales causes du raidissement est l'équilibre perturbé entre le dépôt de la MEC et sa dégradation conduisant à une augmentation des protéines matricielles dans le microenvironnement tumoral. De nombreux facteurs dans l'environnement tumoral, y compris l'hypoxie et le TGF- $\beta$ , favorisent la surproduction de composants de la MEC comme les collagènes fibrillaires, les isoformes de fibronectine, les TNC, OPN, SPARC et les POSTN dans les tumeurs. Les MMP qui dégradent la MEC, sont également augmentés, mais le bilan global de la synthèse et de la dégradation reste généralement en faveur d'une augmentation nette de la MEC.

Néanmoins, les propriétés mécaniques de la MEC ne sont pas seulement régulées par la quantité des composants de la MEC.

En effet, la réticulation des fibres composant la MEC peut moduler ses propriétés en la rendant plastique ou élastique. Plastique, si elle reste déformée après déformation ou élastique, si elle revient à sa position initiale. Les réticulations ont également un effet important sur les propriétés mécaniques de la MEC. Les liaisons inter-fibres empêchent les monomères et les fibres de glisser l'une par rapport à l'autre conduisant

à une diminution forte du comportement plastique de la MEC. La réticulation augmente la résistance de l'ECM à la force appliquée.

Enfin la MEC subit des déformations induites par les cellules via les forces exercées à la fois par la tumeur et par les cellules stromales (Mohammadi and Sahai 2018).

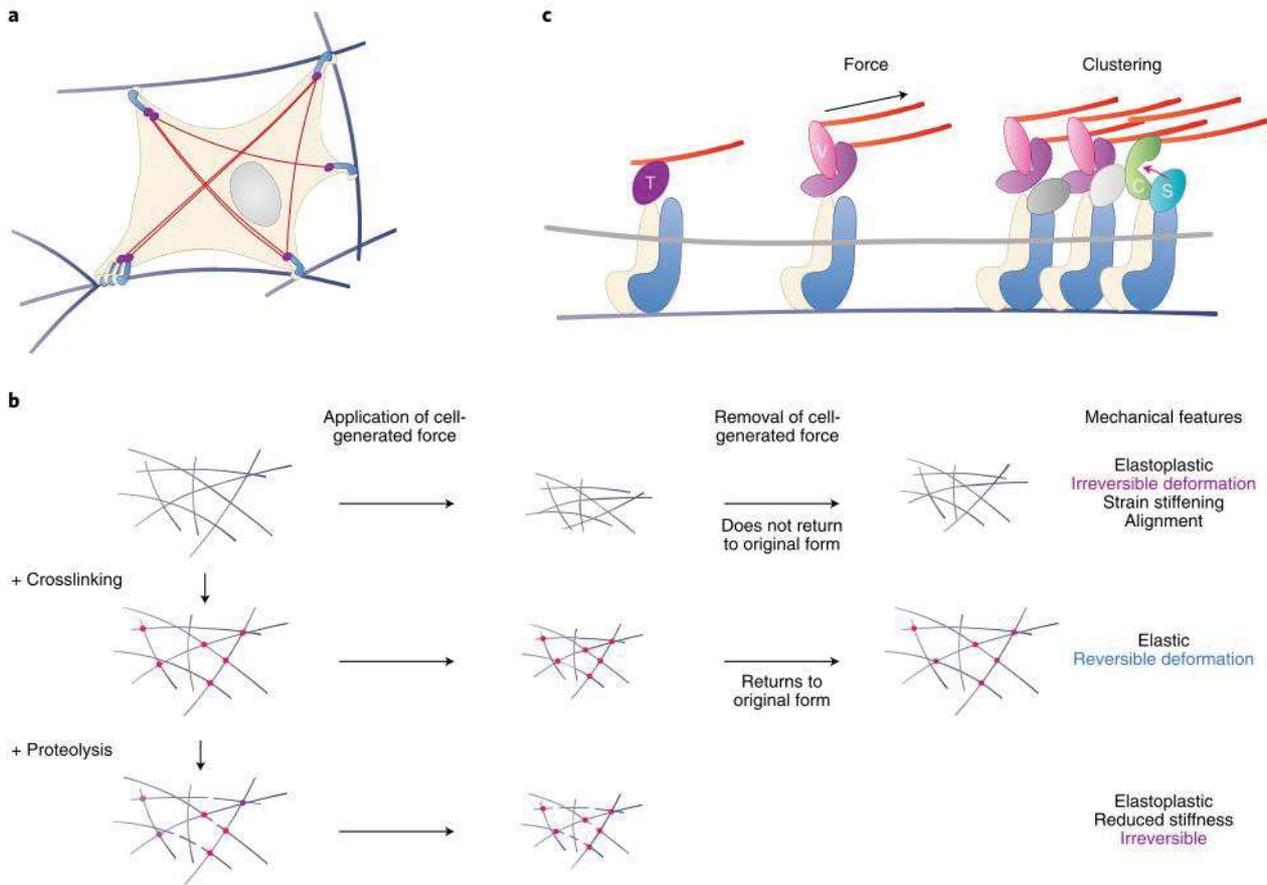


Figure 19 : Remodelage de la MEC par les cellules tumorales et impact sur la clusterisation des adhérences focales.(Mohammadi and Sahai 2018)

La régulation à la hausse des molécules de remodelage la MEC (telle que le TGF $\beta$  ciblant les gènes de la MEC), qui sont considérées comme responsables du développement de la desmoplasie dans les tumeurs (Papageorgis and Stylianopoulos 2015). La desmoplasie est une réponse fibrotique intense caractérisée par la formation d'une MEC dense comprenant une concentration importante de collagène fibrillaire, de fibronectine, de protéoglycanes et de tenascine C qui vont s'accumuler à l'intérieur de la tumeur. De plus, la desmoplasie est associée à une augmentation de la production et de la sécrétion de facteurs de croissance inflammatoires et tumorigènes et elle est également caractérisée par une population anormalement importante de cellules à caractéristiques souches (Gkretsi and Stylianopoulos 2018).

Par conséquent, la desmoplasie est fortement liée à la rigidité tumorale. À la périphérie des tumeurs, la croissance peut remodeler les fibres de collagène et changer leur orientation. Par conséquent, les fibres de collagène peuvent être étirées et exercer des contraintes de traction. La rigidité à la périphérie dépend donc également de la quantité de collagène (Gkretsi and Stylianopoulos 2018).

L'arrangement aléatoire des composants de la MEC, dit isotropes, sont indicatifs d'une MEC saine. L'arrangement organisé, aligné et parallèle, dit anisotrope des composants de la MEC est caractéristique d'un microenvironnement pathologique observé dans les tumeurs et, indicateur d'un mauvais pronostic.

La MEC alignée in vivo, résultant du processus desmoplastique, sert de « voie » de migration orientée pour les cellules cancéreuses. Les différents stades d'alignement, corrélés à la progression tumorale, sont bien visibles dans les cas de cancers du sein. L'alignement des fibres de la MEC peut être orienté parallèlement ou perpendiculairement à la périphérie de la tumeur (Xiwei Zheng, Cong Bi, Marissa Brooks 2015a).

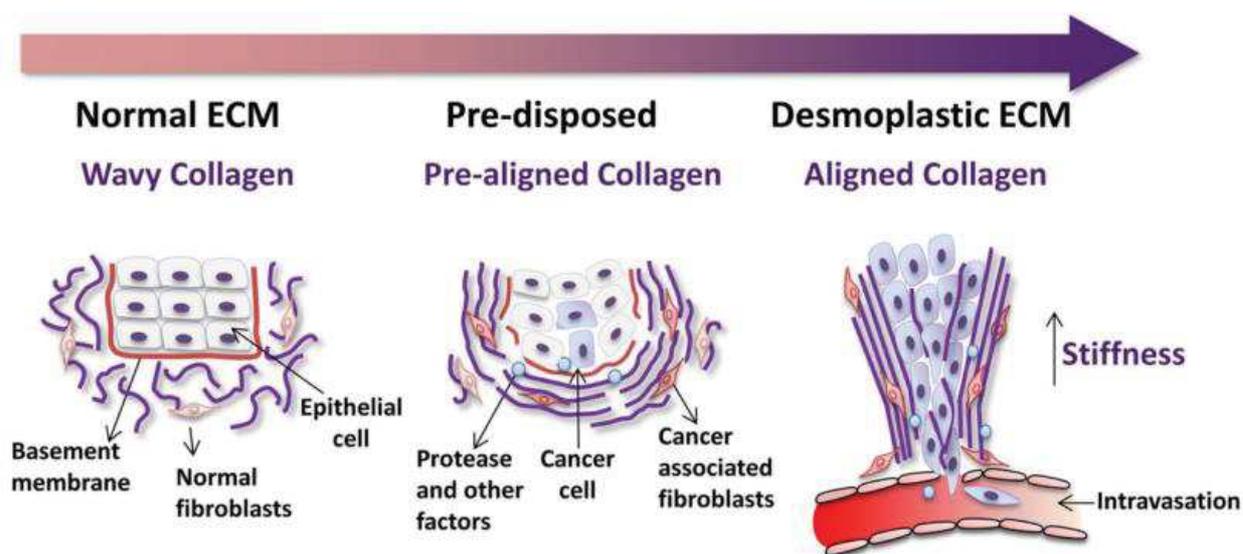


Figure 20 : Différentes étapes du processus desmoplastique de la MEC tumorale, conduisant à une augmentation de la rigidité matricielle et à une augmentation de l'agressivité.(Xiwei Zheng, Cong Bi, Marissa Brooks 2015a)

Comme dit précédemment, dans le cas des gliomes, la rigidité semble varier selon leur grade. Les GBM hautement invasifs produisent des facteurs favorisant l'augmentation de la rigidité intra et péri-tumorale comme le collagène, la fibronectine (FN) ou encore la laminine (Hottinger, Abdullah, and Stupp 2016) (Mahesparan et al. 2003). De plus, les cellules de gliome surexpriment les composants de base de la vascularisation cérébrale comme par exemple la ténascine (TN)-C, qui est associée à la progression du gliome (Bonnans, Chou, and Werb 2014). La vitronectine, quant à elle, est principalement produite par les cellules migrantes (Mahesparan et al. 2003).

En conséquence, lors des études in vitro des comportements migratoires, en plus de la rigidité, il semble indispensable de tenir compte de l'architecture de la structure sur laquelle est réalisée la migration, ainsi que

de l'alignement lors de l'induction des comportements migratoires. L'alignement, la rigidité ou encore le confinement, jouent un rôle majeur dans la migration.

## **6- Migration :**

### **6.1- La migration :**

La migration cellulaire joue un rôle central dans le développement et le maintien des organismes multicellulaires. Elle est impliquée au cours de l'embryogenèse car un processus de migration complexe est essentiel à la formation de tissus et à l'organogénèse. Elle joue aussi un rôle majeur au cours de la cicatrisation ou de la réponse immunitaire avec la migration des leucocytes. La migration cellulaire est également présente dans de nombreuses maladies et plus particulièrement dans le cancer conduisant à l'invasion et aux métastases. En effet, la transformation maligne est entre autres définie par l'invasion d'un parenchyme adjacent par des cellules ayant acquis un phénotype mobile et invasif.

Lors de la migration cellulaire physiologique ou pathologique, il va y avoir l'intégration fonctionnelle de signaux locaux permettant la modification de l'architecture cellulaire. Ce processus a lieu en plusieurs étapes (Lauffenburger and Horwitz 1996) (Franz, Jones, and Ridley 2002).

#### **a) La polarisation :**

Lors de l'initiation de la migration, les cellules acquièrent une asymétrie spatiale leur permettant de transformer des forces intracellulaires en une translocation de leur corps cellulaire.

Cette asymétrie se traduit par une différence de morphologie cellulaire mettant en évidence un axe avant / arrière. Cette polarisation cellulaire provient généralement de signaux extrinsèques qui sont interprétés via l'activation de voies de signalisation et, coordonnés par les unités intrinsèquement asymétriques du cytosquelette (Macara 2004). Les gradients de concentration ne sont pas nécessaires à l'obtention de cette polarisation. Durant cette étape des changements architecturaux vont avoir lieu avec notamment la réorganisation du centre organisateur de microtubules, qui vont alors se polariser pour faciliter la migration, ou encore de l'appareil de Golgi (Lauffenburger and Horwitz 1996) (Watanabe, Noritake, and Kaibuchi 2005). Il va alors y avoir l'apparition de protubérances membranaires larges à l'avant de la cellule appelées lamellipodes ou de protubérances membranaires longues, fines et en forme de pointes appelées filopodes.

Les lamellipodes contiennent un réseau très ramifié de filaments d'actine F alors que les filopodes sont formés par de longs faisceaux de filaments d'actine parallèles. L'acquisition de la polarité avant/arrière est contrôlée par de petites GTPases, telles que Cdc42, Rac1 et RhoA, qui régulent la dynamique de l'actine, l'organisation des adhérences et la formation des lamellipodes et/ou des filopodes. Cdc42 est actif vers l'avant

de la cellule et les perturbations de sa régulation vont affecter la directionnalité de la migration. Il va permettre l'activation locale de Rac1 et la polymérisation de l'actine à l'avant de la cellule dans les filopodes ou lamellipodes. Une fois que Rac1 et Cdc42 sont actifs sur le front cellulaire, les boucles de rétroaction moléculaires et les forces de traction mécanique vont travailler ensemble pour maintenir les protubérances dans le sens de la migration.

L'arrière de la cellule migrante est défini par les activités de Rho, de la myosine II et de protéases  $Ca^{2+}$  dépendantes. Rac1 activé à l'avant de la cellule va inhiber l'activité de Rho tandis que ce dernier va supprimer l'activité de Rac1 sur les côtés et à l'arrière de la cellule. RhoA à l'arrière affecte la contractilité de l'actomyosine par l'intermédiaire des Rho kinases (ROCK). De plus, de fortes adhérences à l'arrière de la cellule vont entraîner une augmentation des tensions, permettant l'ouverture des canaux calciques activés par l'étirement et finalement l'activation des protéases permettant le clivage des protéines des adhérences focales (Reig, Pulgar, and Concha 2014).

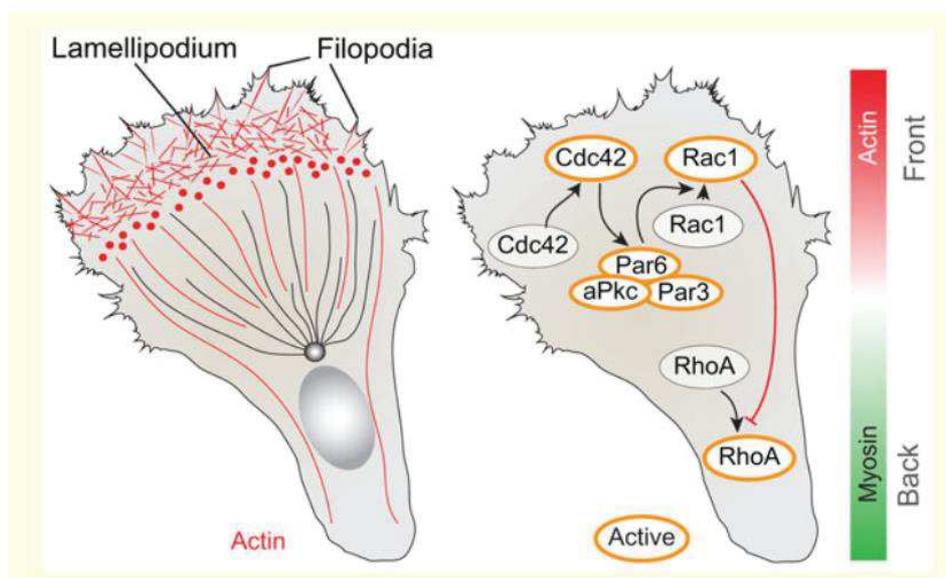


Figure 21 : Mécanisme de polarisation durant la migration cellulaire.(Reig, Pulgar, and Concha 2014)

Durant la migration, les positions du noyau, du centre d'organisation des microtubules (MTOC) et de l'appareil de Golgi sont également des caractéristiques de la polarisation des cellules migratrices. Le MTOC et l'appareil de Golgi se repositionnent devant le noyau dans la direction des protrusions grâce à l'activité de la myosine II. De plus, la myosine IIB semble jouer un rôle prépondérant dans la dynamique nucléaire pendant la migration, car lorsqu'elle est inhibée les cellules présentent : I) des protrusions multidirectionnelles, créant une confusion entre l'avant et à l'arrière - II) un Golgi et un MTOC mal localisés, affectant la rotation du noyau empêchant son repositionnement durant la migration polarisée et/ou directionnelle (Vicente-Manzanares et al. 2009).

## **b) La polymérisation de l'actine :**

Elle va permettre la formation de protrusions à l'avant de la cellule conduisant à la genèse de filopodes via la polymérisation de l'actine F. Arp2/3 va se lier au filament d'actine existant et favoriser la formation de nouveaux filaments d'actine. L'activité de Arp2/3 est régulée par les protéines WAVE/Scar, WASP et N-WASP. Le complexe WAVE/Scar est quant à lui sous le contrôle de la petite GTPase Rac alors que WASP et le N-WASP sont régulées par Cdc-42. De plus comme dit précédemment, l'augmentation locale de Rac activé est impliquée dans la formation des extensions cytoplasmiques telles que les lamellipodes, et donc impliquée dans la migration directionnelle (Reig, Pulgar, and Concha 2014) (Vicente-Manzanares 2005) (Lauffenburger and Horwitz 1996). Les formines quant à elles vont se lier à l'extrémité barbelée des filaments d'actine et favoriser sa croissance linéaire. Elles sont régulées par les petites GTPases RhoA et Cdc42 qui vont alors réguler mDia1 et mDia2 respectivement. Les formines nécessitent ensuite l'interaction avec la profiline qui va se lier à l'actine G pour enfin promouvoir la polymérisation de l'actine (Vicente-Manzanares 2005).

La polymérisation de l'actine est réalisée à partir de monomères d'actine libre (actine G) qui vont venir se fixer sur l'extrémité libre « barbelé » du filament d'actine. Les profilines lient l'actine libre et sont ensuite requises pour permettre la polymérisation de l'actine par Ena/VASP du côté barbelé (Vicente-Manzanares 2005). Des protéines d'encapsulation telles que la gelsoline dépendante du calcium, régulées par les phosphoinositides (PIP2) (Zigmond 2004), permettent de terminer la polymérisation restreignant ainsi les filaments d'actine sous les membranes plasmiques. Enfin les protéines de la famille des cofilines vont permettre la dépolymérisation des filaments à l'autre extrémité, dans le sens inverse à la migration (Pollard and Borisy 2003).

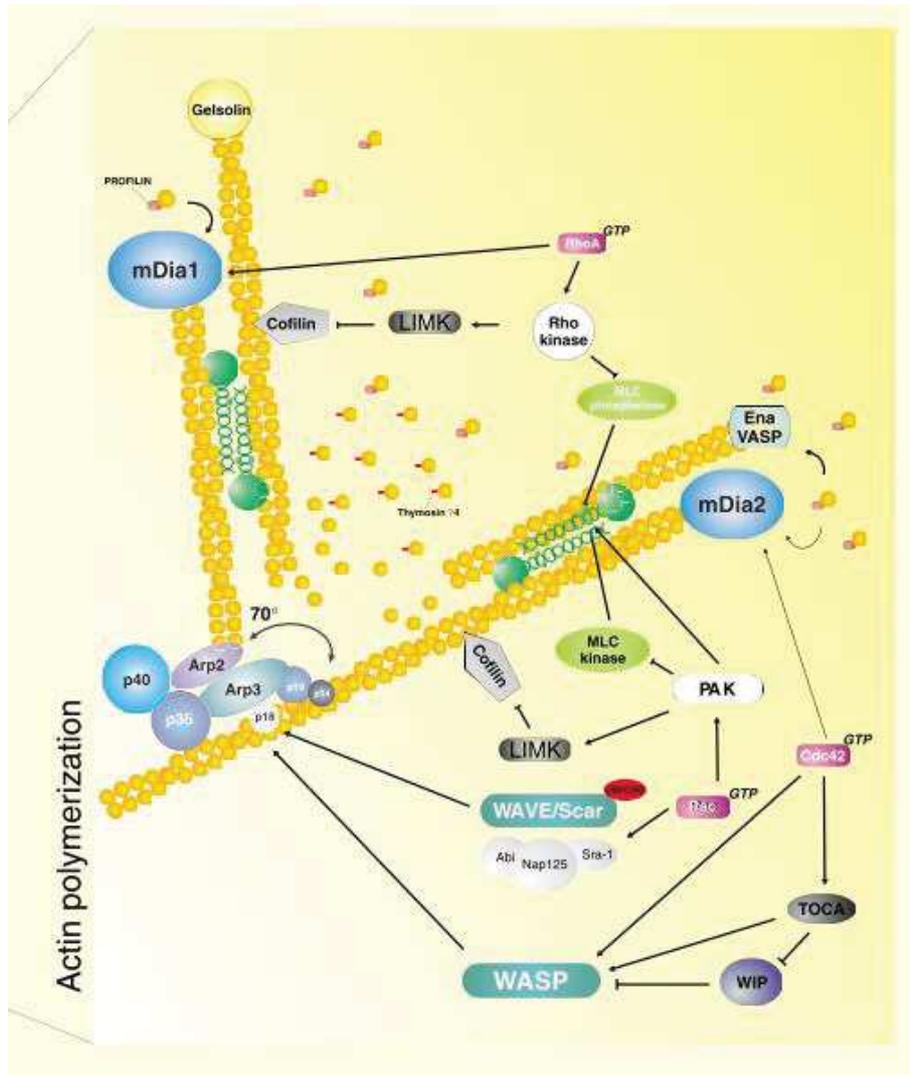


Figure 22 : Polymérisation de l'actine au bord avant de la cellule, permettant la formation de protrusion et la migration (Vicente-Manzanares 2005).

### c) Assemblage et désassemblage des adhérences focales :

- **Adhérences focales :**

Au cours de la migration, les cellules forment, utilisent et dissocient les adhérences focales. Les adhérences focales sont des points d'interactions moléculaires entre la cellule et le substrat. Elles s'assemblent et se désassemblent en réponse aux signaux extracellulaires et régulent la motilité cellulaire. Classiquement, il est décrit que durant la migration, les adhérences semblent s'assembler au niveau du front de migration de la cellule et se désassembler à l'arrière c'est-à-dire dans le sens opposé à la migration (Vicente-Manzanares 2005). Néanmoins il a été observé un désassemblage des adhérences focales à l'avant également des protrusions permet d'alimenter en composants les adhérences naissantes. Ceci permet donc que, dans les

protrusions, au fur et à mesure de la formation de nouvelles adhérences, ces dernières puissent se défaire ou encore se stabiliser pour former des adhérences matures plus importantes (Webb et al. 2004). Une tension plus élevée est appliquée sur les nouvelles adhésions à l'avant de la cellule que sur celles qui se rétractent à l'arrière. En effet, la tension est plus élevée sur la taline des adhérences à l'avant et sur les bords latéraux qu'au niveau des adhérences focales plus anciennes à l'arrière (Kumar et al. 2016) (De Pascalis and Etienne-Manneville 2017).

La dynamique et les caractéristiques des adhérences focales sont modulées par de nombreux facteurs tels que les propriétés mécaniques du microenvironnement ou les propriétés chimiques de leur substrat. Bien plus souvent analysées sur des surfaces 2D, la formation d'adhérences focales se produit également au sein de réseau 3D (Kubow E. Kristopher et al. 2011).

- **Assemblage des adhérences focales :**

Les intégrines sont des protéines transmembranaires constituant l'une des bases des adhérences focales et sont les récepteurs majeurs des protéines de la MEC. Elles constituent l'un des principaux récepteurs d'adhésion cellulaire et possèdent un rôle majeur dans la signalisation induite par des signaux venant de l'extérieur de la cellule. Elles forment une famille de récepteurs de surface cellulaire hétérodimérique composée d'un assemblage de sous unités  $\alpha$  et  $\beta$ . 24 différentes formes de couplage des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont connues à ce jour. Les associations de ce type de sous-unités varient en fonction des protéines de MEC reconnues et du sous-type cellulaire. L'activation des intégrines et leur clustérisations va dépendre du type de sous-unités constituant l'hétérodimère. Lors de la liaison d'un substrat aux intégrines, leur activation va avoir lieu soit par changement conformationnel dû à la liaison des intégrines aux protéines de la MEC (outside-in activation), soit par la liaison intracellulaire d'une protéine adaptatrice aux intégrines (inside-out activation). Une fois les intégrines activées et hétérodimérisées, la création de regroupements appelés « adhérences naissantes » va s'initier puis former un déclencheur mécanique permettant le couplage au réseau d'actine (Wehrle-Haller 2012).

La taline, qui est une grande protéine qui existe sous forme d'homodimère, va s'intercaler et établir un lien entre les intégrines et le cytosquelette d'actine (Nayal, Webb, and Horwitz 2004). Elle se liera aux intégrines via son domaine FERM et grâce à l'augmentation locale de PIP2 (Martino et al. 2018). Des molécules liées à la transduction du signal vont dans un deuxième temps se lier également aux intégrines permettant leur activation et régulant la signalisation liée au cytosquelette d'actine.

Le domaine « tête » de la taline peut se lier directement à FAK ou aux intégrines au niveau de la queue cytoplasmique de celles-ci grâce à la présence du PIP2, tandis que la queue de la taline va pouvoir se lier à la vinculine ou à l'actine via l' $\alpha$ -actinine (Nayal, Webb, and Horwitz 2004).

La vinculine se lie à la paxilline qui s'ajoute aux nouvelles adhérences focales lorsque la tension exercée sur celles-ci est minimale. L'interaction de la vinculine avec l'actine est nécessaire pour réguler le flux rétrograde

de l'actine, ralentissant le flux et conduisant à des forces de traction plus élevées. Au fur et à mesure de l'augmentation de la tension, la vinculine se détache progressivement du bas de l'adhérence et est transportée vers le haut de l'adhérence par le flux rétrograde (De Pascalis and Etienne-Manneville 2017).

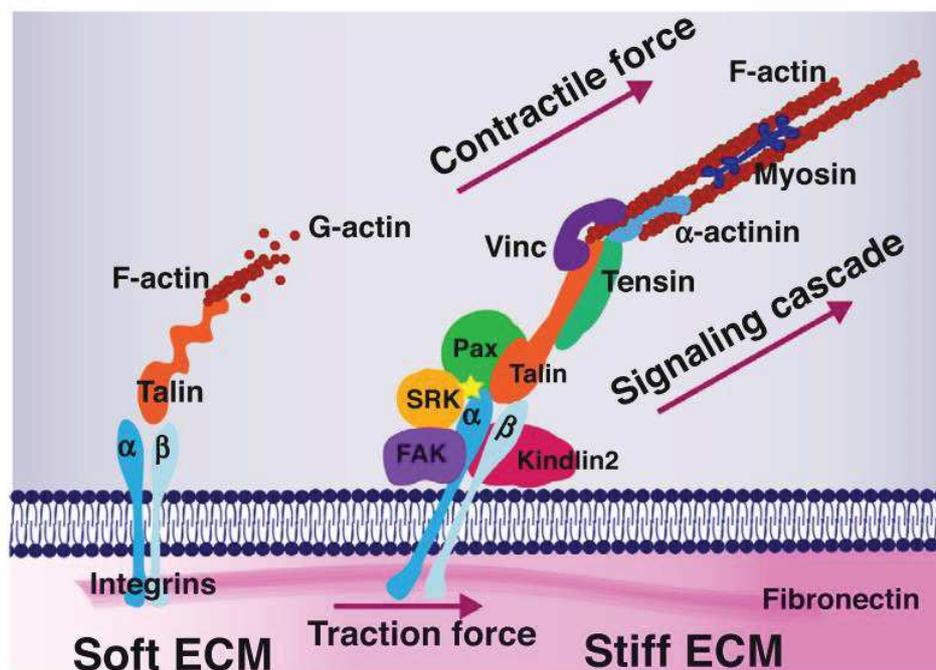


Figure 23 : Assemblage des adhérences focales. Les groupements d'intégrines des forment après activation via la liaison à la taline ce qui va fournir un échafaudage initial pour l'initiation de la polymérisation de l'actine. Ensuite d'autres protéines impliquées dans les adhérences focales vont s'attacher et constituer une adhérence focale mature. Les forces interne et externes vont permettre leur stabilisation via des cycles d'étirement transitoire de la taline et de sa liaison à la vinculine jusqu'à la maturation de l'adhérence. Sur un substrat rigide, la contractilité de la myosine va permettre l'étirement et la rétraction de la taline, favorisant la formation de regroupement d'intégrines, de la polymérisation de l'actine et activer différentes voies de signalisation (Bosch-Fortea and Martín-Belmonte 2018).

- **Désassemblage des adhérences focales :**

Le désassemblage des adhérences focales est indispensable à la migration car elle assure la mobilité et le recyclage des intégrines et des protéines adaptatrices. Ce désassemblage va avoir lieu soit de manière contrôlée à l'intérieur de la cellule soit via la régulation négative de la taline. La protéolyse de la taline par la calpaïne (protéase dépendante du calcium) est essentielle au désassemblage des adhérences focales. Par conséquent, le désassemblage des autres protéines impliquées dans les adhérences est également dépendant de celle-ci (comme la paxilline ou la vinculine) (Franco et al. 2004a). Le clivage de la taline par la calpaïne est majoritairement vu au niveau des adhérences focales « jeunes » se situant au niveau du front de migration et

est donc impliqué dans un renouvellement rapide des adhérences (M. Saxena et al. 2017). Kank2 a de plus récemment été identifié comme une composante des adhérences focales car formant une "ceinture" autour des adhérences focales plus matures en se liant à la taline. Cette interaction déplace l'actine en maintenant la taline active et donc sépare les intégrines de l'actine, réduisant les forces transmises au cytosquelette et favorisant le désassemblage des adhérences (Sun et al. 2018) (De Pascalis and Etienne-Manneville 2017) . La perte de traction peut aussi favoriser le désassemblage des adhérences focales. En effet une diminution des forces de traction favorise l'association de l'adaptateur clathrine Dab2 avec l'intégrine  $\beta 3$  tout en excluant la taline et favorise ainsi l'endocytose des intégrines médiée par la clathrine (Yu et al. 2015) (De Pascalis and Etienne-Manneville 2017).

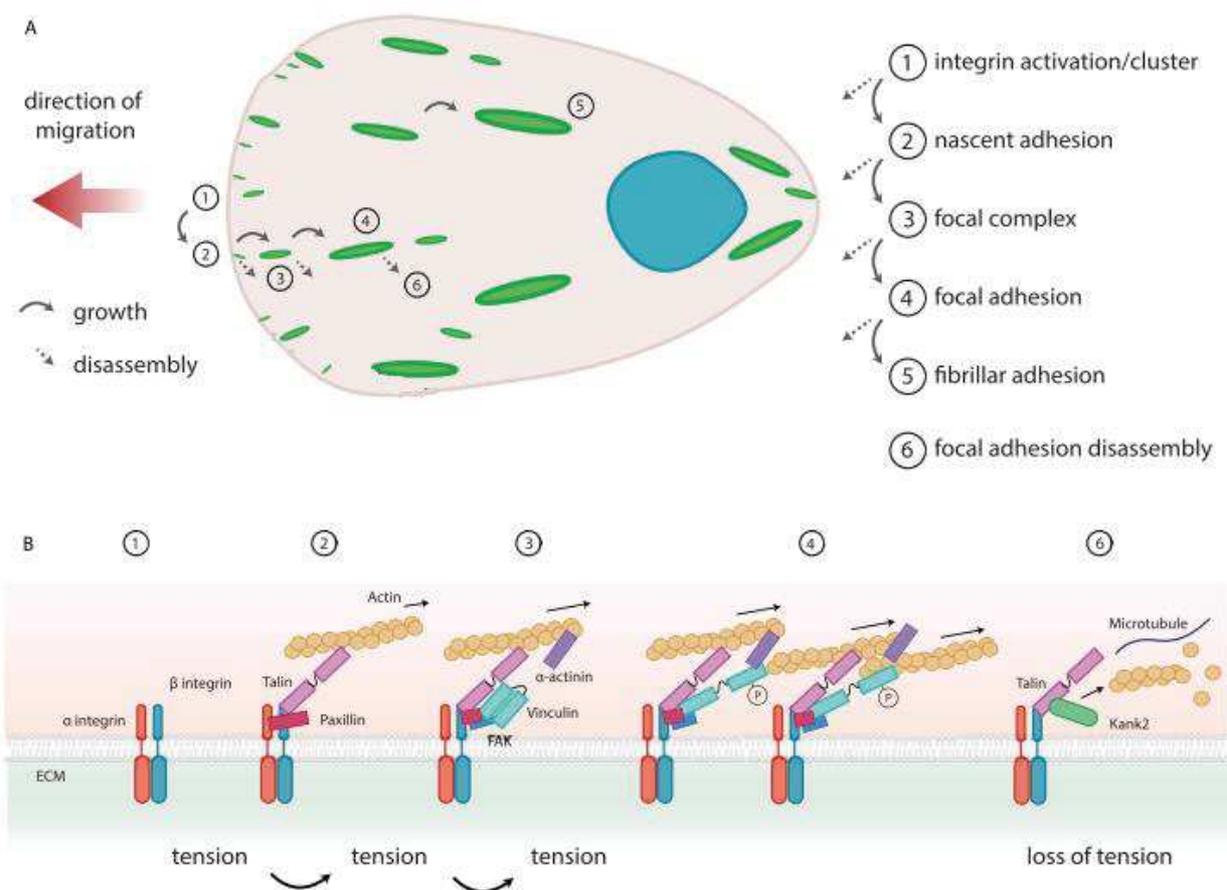


Figure 24 : Désassemblage des adhérences focales (A). Représentation de la rotation des adhérences focales dans une cellule, mettant en évidence la formation, la maturation et le désassemblage des adhérences focales (verte). La flèche indique le sens de migration. Durant les différents stades de la maturation (de 1 à 6) les FA peuvent croître (flèche pleine) ou être désassemblées (flèche en pointillé) à chaque étape. (B) Formation des

adhérences focales, depuis les intégrines jusqu'à la maturation. Le désassemblage a lieu lors de la perte de tension (De Pascalis and Etienne-Manneville 2017).

Par conséquent, l'analyse de l'expression des protéines constituant les adhésions focales lors d'un processus migratoire est nécessaire à la compréhension de la migration. Il est également indispensable d'étudier la dynamique de ces protéines dans un environnement adapté.

#### **d) Contractilité durant la migration :**

Les adhésions et les protrusions à l'avant de la cellule ainsi que la rétraction à l'arrière permettent les mouvements directionnels et la locomotion. Ces mouvements sont médiés par la dynamique des adhésions focales mais également par le remodelage du cytosquelette. Il en résulte la génération de forces de traction. La régulation différentielle et l'organisation de l'actomyosine permet aux cellules d'adopter différentes stratégies migratoires, dépendantes du type cellulaire et de la structure des tissus, conduisant à des cascades d'activation signalétique et d'expression de gènes. Durant la liaison de cellules à l'ECM, la sensibilité à l'environnement est médiée par l'action combinée des intégrines et de la contractilité de l'actomyosine. La contraction basée sur l'actomyosine est contrôlée par les petites Rho GTPases Cdc42, Rac et RhoA. L'activation de ROCK par RhoA va permettre la phosphorylation de la chaîne légère MLC (Myosin Light Chain) de la myosine II par la MLC kinase ce qui va alors conduire à l'augmentation de la contractilité. Un mécanisme similaire a été démontré pour Cdc42, agissant par l'intermédiaire de MRCK. Inversement, PAK peut également être activé par Rac qui va alors inactiver la MLC kinase en la phosphorylant, entraînant une diminution de la contractilité. PAK a également la possibilité de phosphoryler MLC directement conduisant à une augmentation de la contractilité cellulaire. La prédominance du premier ou du second mécanisme de PAK semble être dû à sa localisation spatiale ou à des régulations différentielles. (Vicente-Manzanares 2005) .

De plus, la contractilité du cytosquelette d'actomyosine ainsi que les adhésions focales sont également régulées par le calcium. La myosine II, qui est la protéine de liaison à l'actine la plus importante, est activée par phosphorylation de la MLC par la MLC kinase dépendante du complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline. En outre, la protéine kinase C (PKC) co-activée par le calcium régule négativement l'activité de la myosine II en inhibant la phosphorylation de la MLC et en perturbant l'assemblage de la myosine II via la phosphorylation des chaînes lourdes. Enfin, la protéine S100A4 fixant le calcium va se lier à la chaîne lourde de myosine IIA empêchant la formation du complexe actomyosine dans les protrusions. (C. Wei et al. 2012)

## **6.2- Comportement migratoire des Cellules souches de Glioblastome :**

### **6.2.1- Glioblastomes : Métastases ?**

Malgré leurs différences génétiques, et peut-être des cellules d'origine divergentes, tous les gliomes malins partagent une caractéristique conservée : l'agressivité invasive. Néanmoins, les métastases extra-neurales sont très rares, 2% de tous les gliomes malins primaires observés quand le patient survit au-delà de deux ans. Les métastases malignes des glioblastomes impliquent habituellement les ganglions lymphatiques, les poumons et quelques rares fois, les os et le foie.

Plusieurs suppositions existent quant au faible nombre de cas de métastases extra-neurales observées. Parmi elles, la faible espérance de vie du patient ne permettant pas le temps aux cellules potentiellement métastatiques d'envahir d'autres organes que le cerveau ou encore la possibilité que les GSC ne trouvent pas un environnement suffisamment adapté en dehors du SNC pour proliférer et migrer (Chistiakov and Chekhonin 2018) (Hottinger, Abdullah, and Stupp 2016) (Beauchesne 2011).

### **6.2.2- Les voies de migration utilisées par les cellules de GBM :**

#### **6.3.2.1- Structures de Scherer :**

En 1938, Hans Joachim Scherer, neuropathologiste allemand, publia un manuscrit dans lequel il réalisa des coupes sur le cerveau de 100 patients atteints de gliome. Il observa que les gliomes migrent le long des structures cérébrales existantes qu'il appela " structures secondaires " formées de l'interaction entre les cellules de gliome et le microenvironnement neuronal. En reconnaissance de son travail précurseur, ces structures sont souvent appelées " structures de Scherer " et comprennent les voies d'invasion par les cellules de gliomes telles que : le parenchyme cérébral, les vaisseaux sanguins, les tractus de matière blanche (notamment le corps calleux) et l'espace sub-arachnoïdien sous la couverture méningée du cerveau. Il suggéra que les cellules de gliome envahissantes adoptent la morphologie des structures sur lesquelles elles migrent. Il décrit donc les cellules venant d'une même tumeur comme pouvant apparaître avec des formes très différentes en fonction de leurs zones migratoires et possédant donc une grande adaptabilité, leur conférant un caractère multiforme (Scherer 1940) (Scherer 1938) (Cuddapah et al. 2014b).

Toutes ces structures préférentielles de migration possèdent des conformations fibrillaires (corps calleux, vaisseaux sanguins) et contraignent les cellules migrantes à se déformer pour passer au travers des tissus sains.

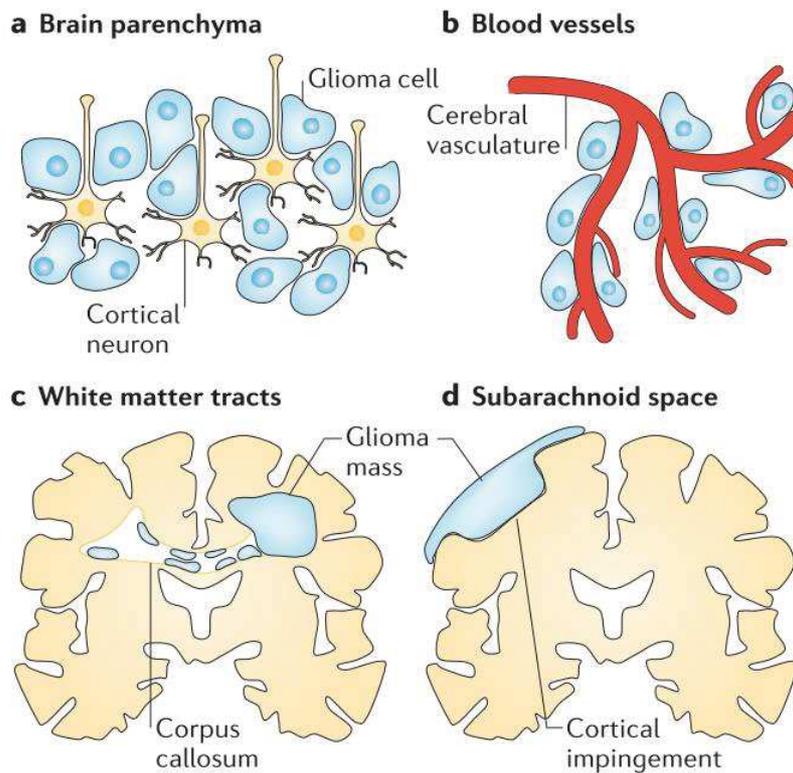


Figure 25 : Différentes structures de Scherer également appelées Structures secondaires (Cuddapah et al. 2014b)

### a) Les voies préférentielles de migration :

Les voies de migration des cellules de gliomes peuvent être divisées en deux compartiments : l'espace périvasculaire et le parenchyme cérébral. Ces espaces diffèrent entre autres au niveau des contraintes mécaniques qu'ils imposent. L'espace périvasculaire est rempli de fluide, dans la continuité de l'espace subarachnoïdien et entoure tous les vaisseaux sanguins.

Le parenchyme contient des corps cellulaires neuronaux et gliaux, des fibres nerveuses et des espaces extracellulaires étroits et tortueux, fournissant une résistance physique considérablement plus grande que l'espace périvasculaire.(Cuddapah et al. 2014b)

Il est difficile de savoir si les GSC atteignent les voies préférentielles de migration par hasard ou si cela résulte d'un processus chimiotactique ou physique. Actuellement, notre connaissance sur la question est limitée, d'autant plus qu'il est difficile d'évaluer dynamiquement la migration cellulaire au sein de ces structures. Cependant, il est certain que les vaisseaux sanguins constituent un substrat essentiel pour la migration des GSC (Cuddapah et al. 2014b). En effet, il a été montré que lorsqu'elles sont greffées dans un cerveau de souris, la grande majorité (>85 %) des GSC entrent en contact avec un vaisseau sanguin (Sontheime 2009). Le recrutement des cellules de gliomes dans les vaisseaux sanguins se fait par

l'intermédiaire de la bradykinine, qui agit comme signal chimiotactique (Sontheime 2009) (Cuddapah et al. 2014b).

La bradykinine est produite dans les cellules endothéliales vasculaires et la liaison à ses récepteurs (B2R) couplés à la protéine G (GPCR) provoque l'augmentation du calcium intra cellulaire dépendante d'IP3R3. Ce changement de concentration de calcium intracellulaire active les canaux ioniques soutenant les changements de forme et de volume des cellules nécessaires à l'invasion cellulaire (Yoo et al. 2010) (Cuddapah et al. 2014b).

Bien que la bradykinine ne soit pas le seul agent responsable d'un chimiotactisme elle a tout de même été identifiée comme une cible thérapeutique prometteuse.

Autour des vaisseaux sanguins se trouve l'espace de Virchow-Robin, qui est dans la continuité de l'espace subarachnoïdien et, est séparé du parenchyme par la membrane basale créée par les astrocytes au niveau de leur « pieds terminaux » ou « endfeet ». Le LCR présent dans ce compartiment est évacué dans les veines collectrices le long des méninges (permettant ainsi l'élimination des déchets). Par conséquent, les cellules de gliomes entrant dans cet espace vont avoir une connexion et une conduction vers la surface du cerveau et donc l'espace subarachnoïdien. Cet espace périvasculaire présente peu de résistance à la migration des cellules de gliomes (Cuddapah et al. 2014b).

Les déplacements des cellules de gliomes peuvent donc être conduits par le mouvement du LCR les acheminant jusqu'à cet espace subarachnoïdien ou par l'effet topoinducteur médié par les vaisseaux sanguins qui jouent un rôle dans le déplacement le long des membranes basales (Cuddapah et al. 2014b).

En effet, il a été observé que l'orientation et la conformation du substrat sur lequel se trouvent les cellules, influencent directement le sens de migration et la morphologie des cellules. Par exemple, A. Beliveau et al. en 2016 ont montré que des lignées de cellules souches de glioblastomes lorsqu'elles sont déposées sur des nanofibres de PCL (polycaprolactone), migrent parallèlement au sens des fibres et présentent une rigidité cytosquelettique moins élevée (Beliveau et al. 2016a).

#### **b) Déformabilité nécessaire à la migration au travers du parenchyme sain :**

Que les cellules de gliome migrent le long de la membrane basale des vaisseaux sanguins, dans le parenchyme cérébral ou sur les tractus de la substance blanche, l'espace extracellulaire limité du cerveau va contraindre leur migration. Les mesures *in vivo* dans le néocortex murin suggèrent que la largeur de l'espace extracellulaire sain dans le cerveau est de 38-64 nm (Thorne and Nicholson 2006), ce qui est beaucoup plus petit que la taille des cellules de gliome en migration (Cuddapah et al. 2014b). Néanmoins elles parviennent à migrer dans cet environnement étroit car elles possèdent une capacité étonnante à modifier leur taille ou encore leur volume et sont capables de modifier leur volume dès lors qu'elles rencontrent une barrière poreuse.

Pour diminuer drastiquement leur volume, les cellules de gliome doivent se vider de l'eau libre, c'est-à-dire non liée à des protéines, à des acides nucléiques ou des molécules.

Pour permettre la circulation de l'eau cytoplasmique au travers des membranes cellulaires, les GSC expriment des aquaporines (AQP) telles qu'AQP1 ou AQP4, permettant de se déplacer en fonction de la pression osmotique imposée par les ions traversant les canaux. De plus, les cellules de gliomes utiliseraient leurs canaux  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$  (activé par le calcium) pour réguler leurs formes et leurs volumes cellulaires. Elles seraient également capables d'augmenter leur concentration intracellulaire de  $\text{Cl}^-$  (jusqu'à dix fois) pour ensuite permettre une sortie de  $\text{Cl}^-$  plus importante que la normale (Son et al. 2007) (Cuddapah et al. 2014b) ; Ce processus est permis grâce à la présence du co-transporteur  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  NKCC1 qui fait entrer du  $\text{Cl}^-$  dans les cellules de gliome migrantes, contre son gradient de concentration en utilisant le gradient de concentration du  $\text{Na}^+$ . Une fois la concentration intra cellulaire de  $\text{Cl}^-$  augmentée, les canaux  $\text{Cl}^-$  des cellules de gliome s'ouvrent pour permettre la sortie de  $\text{Cl}^-$  induisant une diminution du volume cellulaire. NKCC1 est exprimé constitutivement dans les gliomes et est corrélé à un très mauvais pronostic. L'activité de NKCC1 est d'ailleurs régulée par l'EGF, la PI3K et AKT fortement impliqués dans les processus migratoires. De plus NKCC1 peut réguler la vitesse de migration via la régulation de la dynamique des adhérences focales, ainsi que la contractilité des cellules de gliome migrantes (Garzon-Muvdi et al. 2012) (Cuddapah et al. 2014b).

CIC3 est également responsable de l'efflux de  $\text{Cl}^-$ , suivi d'un efflux d'eau, ce qui permet aux cellules de gliome de s'adapter à leur environnement au fur et à mesure qu'elles se déplacent. L'augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intra cellulaire induit l'activation de CIC3 via sa phosphorylation par la CaMKII (Protéine kinase II dépendante du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline) (Cuddapah and Sontheimer 2010) (Cuddapah et al. 2014b).

Pour maintenir l'électroneutralité, les canaux CIC3 permettant les flux de  $\text{Cl}^-$  sont couplés à une conductance cationique. Les cellules de gliome expriment donc de multiples membres de la famille des canaux KCa, activés par l'augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$ , tels que KCa1.1 et KCa3.1. Ils vont permettre le maintien de la conductivité cationique en équilibrant l'efflux de  $\text{Cl}^-$  (Habela et al. 2008) (Cuddapah et al. 2014b).

Les canaux  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$  impliqués dans l'invasion des gliomes sont sensibles à la concentration de calcium intracellulaire. Par conséquent, toute augmentation du calcium entraîne une augmentation simultanée de la conduction de  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$ , entraînant alors un changement de volume hypothétique. De nombreux ligands, tel que la bradykinine ou l'EGF augmentent la migration des cellules gliome en augmentant également la concentration de calcium intracellulaire (Cuddapah et al. 2014b).

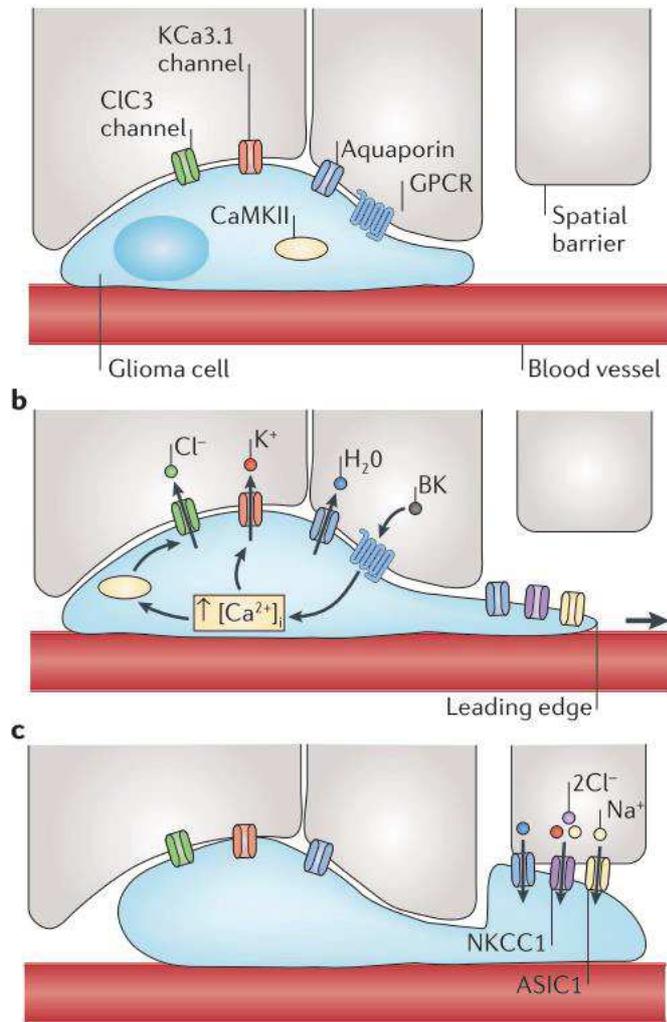


Figure 26 : Mécanisme impliqué dans la déformabilité des cellules de gliome durant la migration. Les cellules de gliome rencontrent des barrières spatiales lorsqu'elles migrent au travers du parenchyme sain. **A-** Les cellules de gliome expriment divers canaux, ClC3, des canaux KCa ou encore des aquaporines. **B-** La stimulation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) comme l'EGFR ou du récepteur à la bradykinine B2R, ainsi que l'ouverture des canaux KCa et ClC3, provoquent une augmentation de la concentration de Calcium intracellulaire, conduisant à l'activation de la CaMKII dépendante. La CaMKII activée conduit à l'efflux de  $Cl^-$  et  $K^+$ , obligeant l'eau à sortir de la cellule (dans le sens de son gradient osmotique). Cette diminution de volume permet aux cellules gliome de diminuer leur volume cytoplasmique et de passer dans de petits espaces. **C-** Après avoir franchi la barrière spatiale, les cellules gliome vont retrouver leur volume grâce aux  $Na^+$ ,  $K^+$  et  $Cl^-$  passants par les co-transporteurs NKCC1 et les canaux ASIC1 (Cuddapah et al. 2014b).

## **6.2.3- Différents types migratoires rencontrés:**

### **6.3.3.1- La migration amiboïde et la migration mésenchymateuse**

Lorsque la machine d'assemblage de l'actine a été inhibée dans des fibroblastes de sorte à empêcher la formation de lamellipodes, il a été observé que cela n'a pas systématiquement aboli les capacités migratoires des cellules (Wu et al. 2013). Ceci suggère que le lamellipode n'agit pas en conduisant la migration mais plutôt comme un dispositif de détection et de pilotage, alors que les forces propulsant la cellule sont générées ailleurs (Cramer 2010) (Paluch, Aspalter, and Sixt 2016b).

Ensuite des divergences ont été mises en évidence entre les études des lamellipodes et la dynamique d'adhésion des cellules mésenchymateuse et les études de la motilité cellulaire de la locomotion des leucocytes, qui présentent des vitesses beaucoup plus rapides que celles généralement observées pour les cellules mésenchymateuses, qui est alors défini comme amiboïde (Friedl, Borgmann, and Bro 2001)(Paluch, Aspalter, and Sixt 2016b).Ceci a permis de décrire deux types migratoires, mésenchymateux et amiboïdes rencontrés dans le cas des GSC et qui sont dépendants des paramètres physico-chimiques environnementaux.

#### **a) La migration amiboïde :**

Les leucocytes en migration sont caractérisés par une forme cellulaire arrondie, une faible adhérence cellule-substrat et des changements constants de forme cellulaire. Ces caractéristiques morpho-dynamiques typiques sont souvent décrites comme amiboïdes parce qu'elles ont d'abord été décrites chez les amibes migratrices, qui ont mérité leur nom en raison de leur forme variable (Paluch, Aspalter, and Sixt 2016b). Il a de plus été vu que même dans des environnements dans lesquels les cellules ne présentaient pas d'adhérence significative, les leucocytes se déplaçaient efficacement. L'hypothèse a donc émergé sur le fait que les tractions sont médiées dans ce cas-là par les importants changements de forme amiboïde des cellules, ce qui a permis l'intercalation dans la géométrie complexe des matrices et pourrait ainsi fournir des points d'appui pour la génération de force (Paluch, Aspalter, and Sixt 2016b).

Les cellules amiboïdes présentent un mode migratoire typiquement utilisé par des cellules très mobiles telles que les cellules dendritiques, les leucocytes, les cellules souches hématopoïétiques et certaines cellules cancéreuses. La migration amiboïde est associée à une diminution de la polarité et des adhérences focales (Kurniawan, Chaudhuri, and Lim 2016), une distribution diffuse des protéines d'adhésion cellulaire et une dépendance à la contractilité de l'actomyosine (C. D. Paul, Mistriotis, and Konstantopoulos 2017). Ce mode peut être classé en deux types en fonction des structures migratoires impliquées : la présence de blebs ou filopodes riches en actine. Comme il y a moins d'adhérences médiées par l'intégrine, les cellules peuvent se déplacer à travers différents microenvironnements tissulaires, quelle que soit la nature chimique de la matrice

(Kurniawan, Chaudhuri, and Lim 2016). La migration amiboïde est donc beaucoup plus rapide que la migration mésenchymateuse (2-20  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (Paňková et al. 2010a), et semble être utilisée par les cellules cancéreuses pour échapper aux agents chimio thérapeutiques ciblant les voies des intégrines (Friedl and Wolf 2010) (Kurniawan, Chaudhuri, and Lim 2016).

La migration amiboïde va être rencontrée *in vitro* dans des conditions où les adhérences cellules-matrices sont supprimées ou très faibles. Les cellules peuvent migrer en utilisant soit une migration amiboïde à haute contractilité médiée par un phénomène de blebbing membranaire, soit une migration par protrusion qui se produit dans des conditions de contractilité cellulaire faible mais de confinement élevé (Y. J. Liu et al. 2015). Les blebs sont des protubérances sphériques qui n'ont pas d'actine filamenteuse lors de leur formation initiale et entraînent une locomotion cellulaire.

La migration en condition de confinement des cellules cancéreuses présentant un blebbing amiboïdal est favorisée par une colocalisation de la machinerie contractile des myosines (MLC) avec les liaisons actine-membrane plasmique médiées par les protéines ezrine-radixine-moesine (ERM) (Kurniawan, Chaudhuri, and Lim 2016).

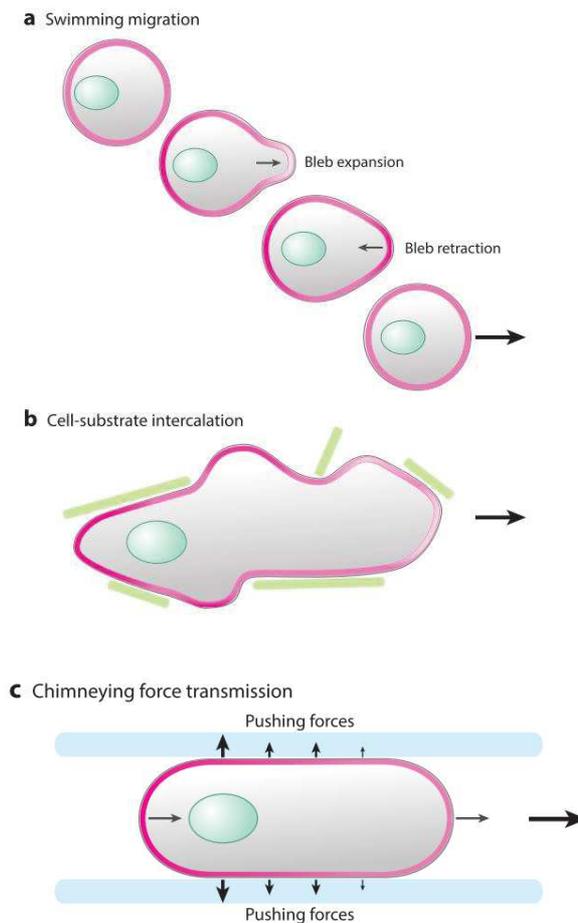


Figure 27 : Mécanismes physiques de génération et de transmission de force pendant la migration amiboïde indépendante des adhérences focales. La ligne rose représente le cortex d'actomyosine, le rose foncé montre une forte contractilité du cortex et le rose clair une force faible. (a) Migration de type « natation » des cellules présentant du blebbing. Les déformations asymétriques lors de l'expansion et de la rétraction des blebs, combinées à des interactions avec l'environnement permet la locomotion cellulaire (b). L'intercalation des protubérances dans les interstices du substrat peut servir de point d'appui pour favoriser la migration cellulaire. Ce type de migration peut être particulièrement efficace dans les matrices 3D et dans les environnements surpeuplés et/ou inhomogènes in vivo. (c) Migration des cellules en confinement. Les forces de poussée latérales contre le substrat environnant maintiennent le corps cellulaire en place, ce qui permet une contractilité corticale élevée à l'arrière et une expansion à l'avant pour entraîner la locomotion (Paluch, Aspalter, and Sixt 2016b).

Durant la migration amiboïde, les cellules sont capables de se déplacer en utilisant pas ou peu les intégrines. Malawista et de Boisfleury Chevance (1997) ont vu que les granulocytes neutrophiles migrent en confinement en l'absence d'adhérence médiée par les intégrines. Ils ont montré que l'inactivation totale des intégrines par chélation des cations divalents n'entravaient pas la migration si les cellules étaient confinées

entre deux lamelles de verre étroitement adjacentes, alors que la migration sur un substrat plan ouvert était abolie dans ces conditions (CHEVANCE 1997) (Paluch, Aspalter, and Sixt 2016b).

Friedl et al (1998a) ont ensuite montré que le blocage de l'intégrine par des anticorps fonctionnellement actifs n'affectait pas la migration des lymphocytes dans les gels de collagène 3D (Friedl et al. 1998)(Paluch, Aspalter, and Sixt 2016b).

Lämmermann et al (2008) ont éliminé in vivo toutes les intégrines sur les leucocytes et ont formellement prouvé que la migration interstitielle in vivo des cellules dendritiques peut se produire en l'absence d'intégrines (Tim et al. 2008) (Paluch, Aspalter, and Sixt 2016b).

Néanmoins, la généralité de l'indépendance de l'intégrine n'est pas établie, et par exemple Overstreet et al. en 2013, ont montré que dans des conditions inflammatoires, la migration des lymphocytes T dans la peau semble dépendre de l'adhésion par l'intégrine (Overstreet et al. 2014) (Paluch, Aspalter, and Sixt 2016b).

Les conditions de migration d'une cellule à migrer indépendamment des intégrines ne sont pas claires bien qu'il soit largement décrit que la migration amiboïde apparaisse en conditions de confinement et de faible adhésion (Y. J. Liu et al. 2015).

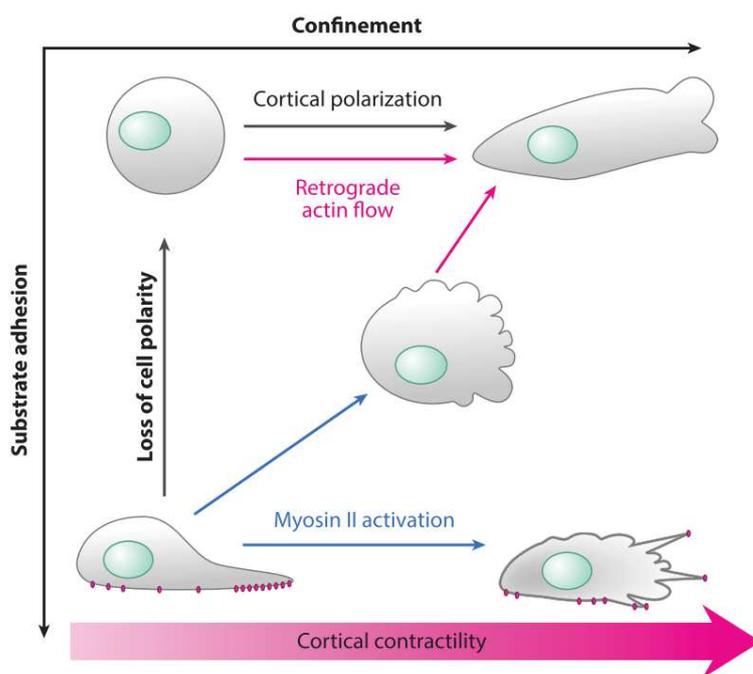


Figure 28 : Paramètres favorisant les transitions entre la migration adhésive et non adhésive. Un faible niveau d'adhérence au substrat, une forte activation de la contractilité de l'actomyosine et des niveaux élevés de confinement tendent à favoriser une migration indépendante de l'adhérence. Ces différents paramètres ne sont pas forcément indépendants ce qui fait que la transition entre la migration adhésive et non adhésive est un problème complexe et multiparamétrique (Paluch, Aspalter, and Sixt 2016b).

La contractilité accrue des cellules utilisant la migration amiboïde comme les stratégies invasives via la voie de signalisation Rho/ROCK, leur permet de se faufiler à travers les espaces pré-existants, ou d'exercer

une force suffisante pour déformer la MEC environnante. Ce type de migration permet aux cellules de se déplacer dans des substrats 3D indépendamment de la dégradation de la MEC. La faible adhésion au substrat permet aux cellules qui adoptent un mouvement amiboïde de se transloquer dans l'environnement 3D à des vitesses relativement élevées, allant de 2  $\mu\text{m}/\text{min}$  dans des cellules de mélanomes A375m2, à 25  $\mu\text{m}/\text{min}$  lors de la migration à vitesse maximale des lymphocytes dans un gel de collagène (Paňková et al. 2010b).

### **b) La migration mésenchymateuse :**

La migration mésenchymateuse est le type migratoire décrit plus classiquement et qui est dépendant des adhérences focales. Ce type de motilité des cellules peut être comparé à celui des fibroblastes, des kératinocytes, des cellules endothéliales et de certaines cellules tumorales. Les cellules avec une motilité de type mésenchymateuse ont une forme spécifique allongée en forme de fuseau. En particulier dans les matrices 3D, les cellules sont polarisées, créant un front de migration évident avec un ou plusieurs pseudopodes ou filopodes à l'avant et le corps cellulaire, contenant le noyau, à l'arrière. (Paňková et al. 2010a) (Paňková et al. 2010b).

Les caractéristiques de ce type de migration sont d'une part une morphologie allongée, et d'autre part une augmentation des forces de traction et une contraction cytosquelettique hautement polarisée (Kurniawan, Chaudhuri, and Lim 2016).

La translocation des cellules mésenchymateuses commence par la formation de filopodes et de lamellipodes riches en actine F sur le front de migration. Ce processus est conduit par les petites GTPases de la famille Rho, principalement par Rac et Cdc42 (Reig, Pulgar, and Concha 2014) (Paňková et al. 2010a). Des interactions avec la MEC sont présentes sur les deux pôles cellulaires via les adhérences focales et les fibres d'actine contractile qui leur sont attachées génèrent des forces de traction entre le bord antérieur et le bord postérieur de la cellule (Wehrle-Haller 2012) (Vicente-Manzanares 2005) (Webb et al. 2004) (Paňková et al. 2010b). Les hétérodimères d'intégrine qui se regroupent en grappes donnent naissance aux adhérences focales qui recrutent ensuite des enzymes protéolytiques dégradant la MEC pour effectuer son remodelage et générer physiquement des voies de migration pour les cellules. La vitesse de migration des cellules mésenchymateuses dans les matrices 3D est en moyenne d'environ 0,1 à 0,5  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Cette vitesse plus faible que dans le cas de la migration amiboïde est due à la rotation relativement lente des adhérences focales pendant la translocation (Paňková et al. 2010b).

### 6.3.3.2 – La migration individuelle et la migration collective :

Dans le cas des glioblastomes, la migration collective est majoritairement rencontrée en périphérie de la tumeur et dans les zones péri-nécrotiques, alors que la migration individuelle ou intermédiaire l'est au niveau du corps calleux ou encore dans l'espace périvasculaire.

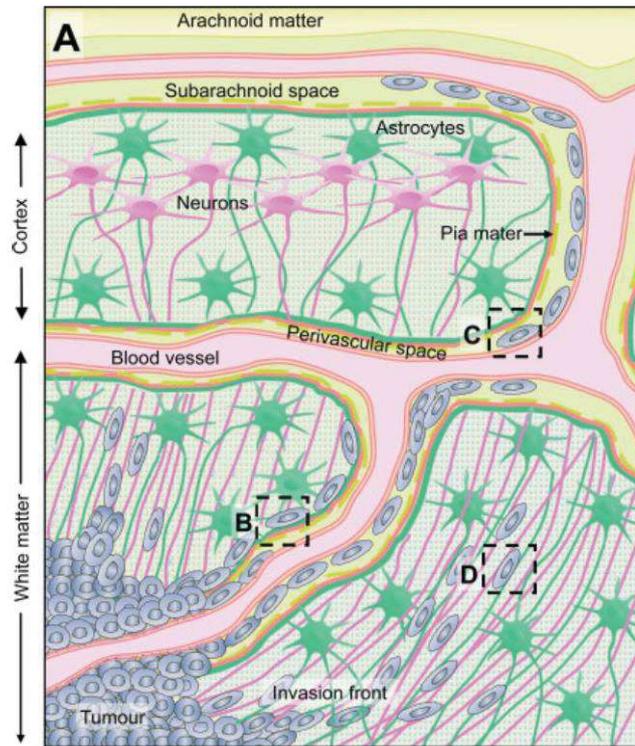


Figure 29 : Migration depuis les abords du GBM (A) Guidage le long de la glia limitans et de l'espace périvasculaire, ainsi que par les faisceaux neuronaux et astrocytaires. (B) Guidage le long des vaisseaux à l'interface vaisseaux-stroma. (C) Guidage dans l'espace périvasculaire. (D) Migration des cellules de gliome le long des faisceaux de la substance blanche (P. G. Gritsenko, Ilina, and Friedl 2012a).

#### a) La migration individuelle :

En l'absence d'adhésion cellule-cellules, les cellules tumorales envahissent le parenchyme sain de manière individuelle. L'invasion unicellulaire utilise une stratégie différente, dépendante des adhérences cellule-matrice, de la contractilité du cytosquelette et de la capacité à remodeler la MEC pendant la migration comme décrit précédemment. (Friedl et al. 2012) La migration mésenchymateuse et la migration amiboïde sont deux types de migrations rencontrées dans la migration individuelle.

### **b) Comportements migratoires intermédiaires :**

Le mode de migration dit intermédiaire peut se produire sous la forme d'un mouvement dirigé de cellules se déplaçant individuellement dans des flux multicellulaires. Une caractéristique clé de ce type de migration est que le cytosquelette de chaque cellule agit indépendamment pour générer des forces de tractions sur la matrice, mais aussi que les cellules établissent entre elles des adhérences faibles ou transitoires. Par conséquent ce comportement migratoire est un intermédiaire entre la migration individuelle et la migration collective. La coordination du flux multicellulaire est souvent assurée par des structures orientées qui alignent les cellules en mouvement par guidage au contact. Un relais chimiotactique peut coordonner la migration en flux. La nature transitoire des adhérences cellules-cellules et la capacité indépendante de chaque cellule à générer une force de traction signifie que le flux multicellulaire permet une migration rapide ( $\geq 1 \mu\text{m} / \text{min}$ ). Les flux de migrations multicellulaires ont été observés dans des modèles orthotopiques de cancer du sein, de mélanome et de glioblastomes (Friedl et al. 2012).

### **c) La migration collective :**

La migration collective est un processus fondamental qui permet le mouvement coordonné de groupes de cellules qui restent reliées entre elles. Les mouvements collectifs permettent la formation et le remodelage des structures tissulaires durant le développement, tels que la fermeture du tube neural, la migration en feuillets du blastoderme et de l'ectoderme et contribuent à la morphogenèse des canaux, des glandes et des vaisseaux ainsi qu'à la régénération épithéliale. De plus, lorsqu'elle est réinitiée pendant la croissance tumorale, les migrations collectives contribuent à l'invasion et à la formation de métastases (Haeger et al. 2015).

Pendant la migration collective, les jonctions cellules-cellules assurent l'adhésion supracellulaire, la polarisation et le couplage mécanique nécessaires pour détecter et intégrer les signaux de guidage externes et forcer la transmission de l'information mécanique à travers la migration collective. En connectant le cytosquelette d'actine à travers de multiples corps cellulaires, les jonctions cellules-cellules forment la base de l'intégration des forces générées par les cellules individuelles au sein des groupes et de leur polarité multicellulaire avant/arrière (Haeger et al. 2015). Par conséquent, les cellules à l'intérieur d'un groupe peuvent ne pas s'associer directement avec la MEC qui se trouve sur les bords externes de la migration collective. et n'entrer en contact qu'avec les cellules voisines et toute la MEC présente le long des jonctions cellules-cellules. Ces jonctions cellule-cellule sont notamment constituées de cadhérines, de protéines des jonctions serrées et de récepteurs d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines qui maintiennent ensemble la cohésion mécanique des cellules, la polarité multicellulaire avant/arrière, la synchronisation cytosquelettique, la signalisation juxtacrine des cellules-cellules et probablement le couplage mécanique via les desmosomes (Friedl et al. 2012).

Durant ce type de migration, les cellules dite « leaders » étendent leurs filopodes et leurs pseudopodes pour entraîner le mouvement de l'ensemble du groupe de cellule. Il a été rapporté que les cellules « leaders » génèrent des forces de traction vers l'avant en sécrétant des MMP pour dégrader les matrices et ainsi se frayer un passage (Kurniawan, Chaudhuri, and Lim 2016).

Traditionnellement, l'invasion par les cellules cancéreuses est décrite comme étant réalisée par des cellules individuelles pénétrant dans les tissus. Néanmoins, de façon générale, la migration la plus fréquemment observée dans de nombreux cancers est la migration collective. Dans le cas de carcinomes typiques, comme le cancer du sein ou du poumon, il y a une présence majoritaire de migrations collectives péritumorales et les obstructions vasculaires dont elles sont responsables entraînent l'atteinte du système vasculaire. Ceci suggère que l'intravasation collective peut-être aussi un mécanisme important de dissémination à distance (Friedl et al. 2012).

La morphologie de l'organisation des migrations collectives est très variée. Les migrations collectives envahissantes peuvent être constituées de faisceaux de seulement une ou deux cellules, à de larges masses incluant des cellules qui n'entrent pas en contact avec la MEC et peuvent même former des structures luminales. Celles-ci sont fréquemment observées dans les carcinomes invasifs du sein, de la prostate et du pancréas. Des combinaisons spécifiques d'adhésions cellule-cellule, cellule-matrice et de protéolyse contribuent probablement à déterminer la taille et la forme d'une migration collective. Par conséquent, la structure de front des cellules de migration collective peut varier, probablement en fonction des propriétés de protéolyse, de protubérance et du type de tissu rencontré. Ce type de migration est lent avec une vitesse allant de 0.1 à 1  $\mu\text{m}/\text{min}$ . (Friedl et al. 2012)

**a**

		Cell-cell junctions	Supracellular contractility	Turnover cell-matrix adhesions	
Individual-cell migration	Amoeboid	-	-	+	
	Mesenchymal	-	-	++	
	Multicellular streaming	?	-	+	
		(+)	-	++	
	Multicellular migration	Collective cell migration	++	++	++
		Collective cell migration	++	++	++
		Collective cell migration	++	++	++
		Collective cell migration	++	++	?
	Whole-tissue dynamics	Tissue folding	++	+++	-
		Expansive growth	++	?	?

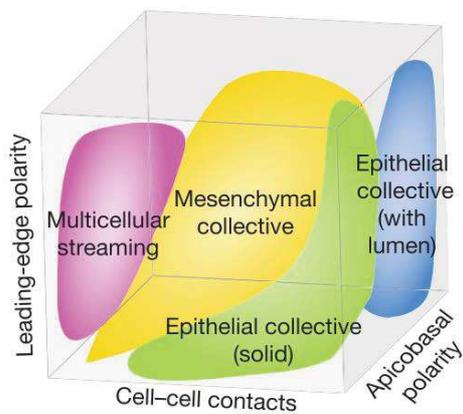


Figure 30 : Différents types d'invasions des cellules cancéreuses. (a) Représentations des types de migrations individuelles amiboïdes ou mésenchymateuses, du flux cellulaire multicellulaire avec ou sans jonctions faibles cellules-cellules, de la migration collective, du repliement tissulaire et de la croissance expansive. Chaque modèle pourrait être décrit comme des processus distincts, néanmoins les différences entre chacune d'entre elles ne sont pas si distinctes car il y a des mélanges des différents types migratoires ou des conversions entre les différents comportements migratoires conduisant à des phénotypes mixtes ou transitoires. L'intensité des phénomènes proposés, comme le « turn-over » des adhérences focales, la contractilité supra-cellulaire ou les jonctions cellules-cellules, est indiquée par les signes moins et plus. (b) Relations entre la polarité au front de migration, l'adhésion cellule-cellule et la polarité apico-basale dans les migrations collectives (Friedl et al. 2012).

## **6.3- Rôle des interactions cellules/MEC impactant la migration des cellules de gliome :**

### **6.3.1- Récepteur à l'Acide hyaluronique (AH):**

Les cellules de gliome expriment de grandes quantités de récepteurs de l'AH pour établir des contacts avec le tissu cérébral permettant ensuite son invasion. Les récepteurs à l'AH, CD44 et RHAMM sont omniprésents dans les lignées cellulaires de gliome ainsi que dans les échantillons de tumeur. De plus, l'expression augmentée des récepteurs RHAMM et CD44 est présente dans les gliomes de haut grade et RHAMM est particulièrement exprimé au niveau des bords invasifs des gliomes alors que CD44 semble plus fortement exprimé au centre de la tumeur (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

CD44 est une glycoprotéine transmembranaire qui possède un domaine cytoplasmique lié aux protéines adaptatrices du cytosquelette et aux protéines régulatrices telles que les kinases Src et les Rho GTPases. Le récepteur CD44, lorsqu'il est clivé, voit son domaine extracellulaire favoriser l'invasion, tandis que le domaine intracellulaire est acheminé au noyau où il agit comme facteur de transcription et joue un rôle dans l'adhérence des cellules de gliomes (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

RHAMM se liant également à l'AH bien connu est exprimé à la surface des cellules, dans le cytoplasme, le cytosquelette et le noyau. Les interactions de l'AH avec les RHAMM peuvent déclencher un certain nombre de voies de signalisation impliquant la protéine kinase C (PKC), les kinases des adhérences focales (FAK), les kinases MAP, les Ras GTPases, la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), les tyrosines kinases et les composants cytosquelette (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018). La liaison aux protéines de la MEC va également déclencher l'activation des adhérences focales.

### 6.3.2- Les intégrines :

Comme décrit précédemment, les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétéro-dimériques constituées de 2 sous unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Elles permettent la médiation de l'adhésion cellules/MEC, et dans une moindre mesure cellules-cellules, et après liaison, le déclenchement de cascades de signalisation intracellulaire.

Cette fonction dans l'intégration des informations de la MEC leur a valu leur nom. Elles agissent comme récepteurs pour une variété de protéines de la MEC contenant la séquence arginine-glycine-aspartate (RGD), comme les collagènes, les tenascines, la fibronectine et la laminine, ainsi que les thrombospondines et la vitronectine (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

L'arsenal d'intégrines exprimées à la surface de la cellule est important pour le phénotype cellulaire. L'expression des intégrines ainsi que les composants de la MEC correspondants, facilitent l'infiltration des cellules tumorales dans les tissus cérébraux normaux et sont parmi les principaux contributeurs de l'activité invasive des gliomes. L'expression aberrante de la sous-unité  $\beta 1$  peut favoriser l'infiltration des gliomes (Friedlander, Allen, and Kelly 1996) et la surexpression constante des intégrines  $\alpha 3 \beta 1$  est un régulateur clé de la migration des cellules gliomes (Zhou et al., n.d.) (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

De plus les intégrines  $\alpha \nu \beta 3$  sont observées à la périphérie des gliomes de haut grade, et les intégrines  $\alpha \nu \beta 5$  sont exprimées davantage au centre de la tumeur. De plus, l'expression des  $\alpha \nu \beta 3$  coïncide avec l'expression des MMP-2 dans les cellules tumorales au niveau du front de migration (Aiello et al. 2018)(Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

Cell receptor	ECM/cell ligand	Glioma cells*
Integrin		
$\alpha_1\beta_1$	Type I and IV collagens, laminin	—
$\alpha_2\beta_1$	Type I and IV collagens	$\leftrightarrow$
$\alpha_3\beta_1$	Laminins including laminin-332, type IV collagen	$\uparrow$
$\alpha_6\beta_1$	Laminins	$\leftrightarrow$
$\alpha_6\beta_4$	Laminins	$\uparrow$
$\alpha_9\beta_1$	Tenascins, fibronectin	$\uparrow$
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectin	$\leftrightarrow/-$
$\alpha_V\beta_3$	Vitronectin, laminin, thrombospondin, tenascins, type IV collagen, osteopontin, periostin, tropoelastin	$\uparrow$
$\alpha_V\beta_5$	Vitronectin, laminin, thrombospondin, tenascins, type IV collagen, osteopontin, periostin	$\uparrow$
Syndecans (1–4)	Laminin, type I collagen, tenascins, fibronectin, thrombospondin, vitronectin	$\leftrightarrow$
$\alpha$ - and $\beta$ -dystroglycans	Laminin, perlecan	$\downarrow$
CD44	Hyaluronan, type IV collagen	$\uparrow$
ICAM-1	Hyaluronan, LFA-1	$\uparrow$
NCAM	NCAM, L1-CAM, neurocan	$\downarrow$
L1-CAM	L1-CAM, NCAM	$\uparrow$
N-cadherin	N-cadherin	$\downarrow$
E-cadherin	E-cadherin	—

Figure 31 : Molécules d'adhésion cellules/MEC et cellule/cellule exprimées dans les cellules de gliome par rapport aux tissus cérébraux normaux.

Expression dans des échantillons de gliomes comparés à des tissus humains normaux :

$\leftrightarrow$  : non altérée

- : non exprimée

$\uparrow$  : up-regulation

$\downarrow$ , down-regulation.

Ce tableau montre des tendances issues de la littérature regroupée par Pavlo G. Gritsenko

Olga Ilina and Peter Friedl en 2012, avec une régulation divergente de l'expression en fonction des sous-groupes de patients (P. G. Gritsenko, Ilina, and Friedl 2012a).

### 6.3.3- Haptotaxis et haptokinesis

L'organisation structurale et moléculaire des tissus donne des repères importants pour la migration individuelle ou collective et l'organisation de la migration collective. Les cellules ou les groupes cellulaires interagissent avec la MEC et/ou les cellules environnantes, les détectent, interprètent, et suivent ainsi la topographie de leur environnement selon un processus appelé guidage de contact ou haptokinésis dont la médiation est assurée par des récepteurs d'adhérence spécifiques. Dans le cas où ces repères physiques et/ou moléculaires sont inhomogènes et agissent comme un gradient, la détection directionnelle provoque la polarité du signal intracellulaire et le mouvement le long du gradient. On parle de durotaxis, en cas de repère physique inhomogène agissant comme un gradient et d'haptotaxis, dans le cas d'un gradient moléculaire et physique. (Haeger et al. 2015).

Pour permettre l'haptokinésis, les récepteurs adhèrent au substrat et par conséquent, perçoivent la configuration spatiale environnementale, et se couplent aux repères topographiques. Il peut s'agir de composants de la MEC comme ceux des membranes basales ou de structures tissulaires complexes comme les voies nerveuses, les fibres musculaires ou les cellules adipeuses. À différents niveaux, ces structures sont suivies par les cellules migrantes et les groupes cellulaires, et servent de guide. Chaque topographie possède un alignement des sites d'adhérence en orientation parallèle au substrat. Il s'ensuit une adaptation du cytosquelette d'actine et donc de la forme des cellules et de la direction de migration (Haeger et al. 2015).

L'haptotaxis combine les principes de guidage physique et chimique en y intégrant la notion de gradient, en dirigeant donc la migration le long d'un gradient de ligands. Les gradients de ligands peuvent résulter de différents niveaux ou distributions de protéines de la MEC comme le collagène, la fibronectine ou la laminine, et les chimio-attractants liés à la matrice. Les cellules orientent généralement leur migration vers une disponibilité croissante des sites d'adhérences. Cependant, le mouvement des cellules peut aussi s'orienter vers une diminution de la densité des ligands en fonction du type de cellules et des récepteurs d'adhérence impliqués (Haeger et al. 2015).

Le processus d'haptotaxis puis d'haptokinesis pourrait être impliqué dans la migration des GSC le long du corps calleux ou encore le long de la membrane basale des vaisseaux sanguins.

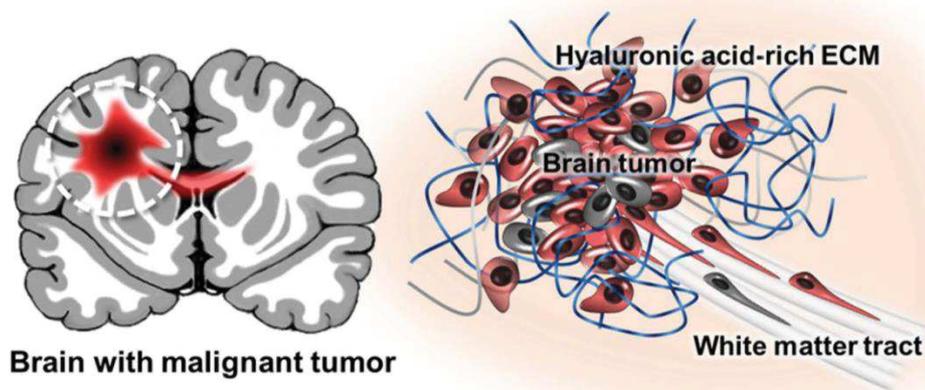


Figure 32 : Illustration du microenvironnement favorable à la migration des cellules de gliome. La MEC riche en acide hyaluronique et les GSC migrant le long du tractus de la matière blanche.

### 6.3.3.1- Guidage axonal dans les gliomes :

Les molécules les plus connues impliquées dans le guidage axonal sont les nétrines, les éphrines (Eph), la plexine, les Slits et leurs récepteurs Robo, ainsi que les sémaphorines (Sema) et leurs récepteurs neuropiline (NRP). En plus de leurs fonctions dans le développement du SNC, elles jouent un rôle clé dans les processus associés au cancer (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

Les nétrines sont une famille de protéines apparentées à la laminine et qui sont impliquées dans le guidage axonal des axones dans le système nerveux en développement chez les vertébrés. Dans le SNC mature, la nétrine-1 est exprimée dans les neurones et les cellules gliales, où elle peut fonctionner comme un inhibiteur autocrine de la motilité cellulaire. La nétrine-1 favorise l'invasivité des cellules de GBM *in vivo*, de manière RhoA, CREB (Protéine liant l'AMPc et se fixant au CRE) et cathepsine (Cat) B dépendante (Shimizu et al. 2013). En présence de laminine-1, la nétrine-1 sert de répulsif pour la migration des cellules U87MG. *In vivo*, l'interaction non-nétrine-1/récepteur joue probablement un rôle important dans le mouvement des cellules de gliome le long des vaisseaux (Naumann et al. 2013) (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

Les ligands de la famille des éphrines (Eph) ont été identifiés comme récepteurs de tyrosine kinase (RTK) et EphB2 et sont significativement régulés à la hausse dans les gliomes humains et dans les cellules souches dérivées de GBM. Les éphrines peuvent stimuler la migration via la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) ou la petite GTPase Cdc42 qui sont des médiateurs essentiels de la migration. Les éphrines sont également des régulateurs négatifs de la voie Ras/MAPK qui exerce des fonctions anti-mitogènes. Elles pourraient être impliquées dans le comportement "Go or Grow" des gliomes. La paire Slit/Robo fonctionne dans le guidage axonal et la régulation des points de ramification dans le système nerveux. Dans la gliomagenèse, la voie Slit/Robo est impliquée dans la prolifération et la motilité cellulaire car elle peut attirer ou repousser la migration (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

Les sémaphorines constituent la plus grande famille des protéines membranaires sécrétées servant de guidage répulsif pour la croissance des axones *in vitro* et *in vivo*. Les sémaphorines de classe 3 (Sema3) sont des protéines chimio-répulsives se liant à un complexe de récepteurs composé de neuropiline NRP1 et 2 et de plexine. Les sémaphorines et ses récepteurs sont exprimés dans les gliomes humains et leur signalisation en aval implique une réorganisation du cytosquelette. Plus l'expression de Sema3G est élevée, meilleur est le pronostic des patients atteints de gliome (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

#### 6.4- Propriétés mécaniques impactant la migration :

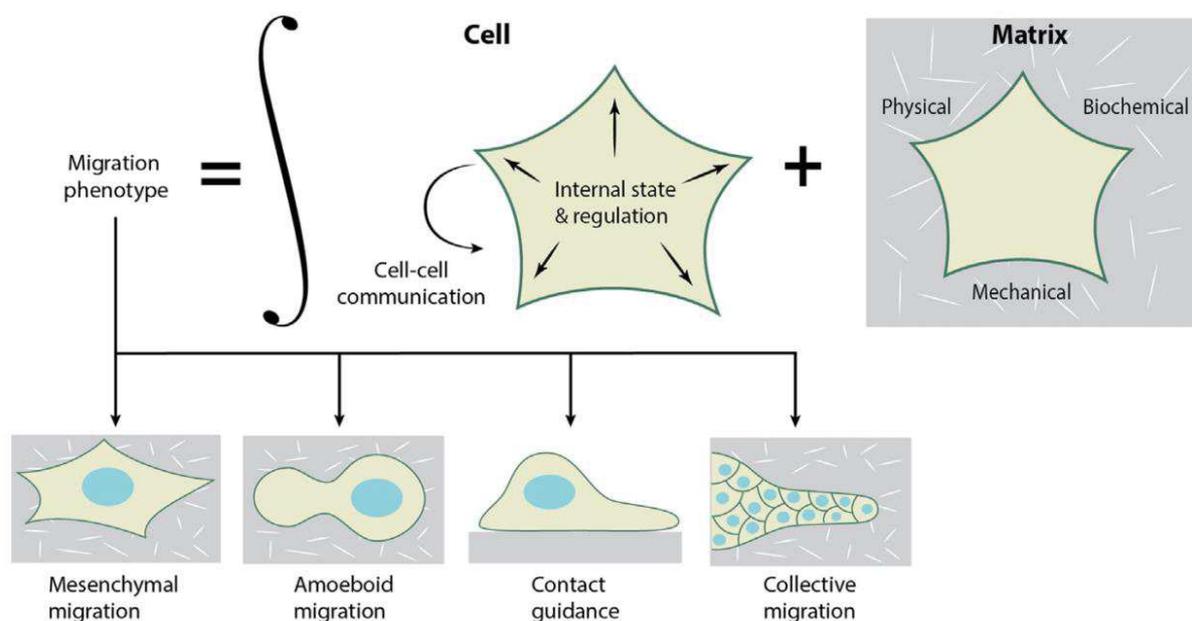


Figure 33 : Illustration des interactions dynamiques entre la cellule et la matrice pendant la migration cellulaire. Durant la migration au travers de la MEC, la cellule intègre continuellement des informations physiques, biochimiques et mécaniques provenant de sa régulation interne, d'autres cellules et/ou de la matrice, ce qui donne lieu à différents phénotypes migratoires. Ainsi elles peuvent s'adapter en adoptant différents phénotypes et se montrer plastiques (Kurniawan, Chaudhuri, and Lim 2016).

Les cellules en migration intègrent de nombreux signaux intrinsèques et extrinsèques, d'ordre physique ou chimique, impactant directement leur migration et, dans le cas des cellules cancéreuses, leur capacités invasives.

### 6.4.1- Rigidité :

Le cytosquelette d'actine maintient l'intégrité structurelle d'une cellule et contribue à leurs propriétés mécaniques. Il est également impliqué dans la transduction de signalisation cellulaire, contrôlant ainsi une variété de réponses des cellules. Il a été démontré que la rigidité de la MEC induit une réorganisation et une contractilité du cytosquelette d'actine, contrôlant ainsi l'adhésion, la migration, la progression du cycle cellulaire et la différenciation. La traduction de la rigidité de la MEC en signaux intracellulaires permettant de modifier le comportement cellulaire est principalement médié par les intégrines et les mécanorécepteurs (Handorf et al. 2015).

#### 6.4.1.1 - Rigidité et adhérences focales :

Comme décrit précédemment, les intégrines se regroupent pour initier l'assemblage de molécules adaptatrices, telles que la kinase d'adhérence focale (FAK), la vinculine, la paxilline, la tensine et la taline, pour former des adhérences focales entre les cellules et la MEC. Une fois les adhérences focales établies, les filaments d'actine peuvent ensuite s'organiser pour transmettre la tension cytosquelettique dans une cellule. De plus, l'assemblage des d'adhérences focales est capable d'activer un certain nombre de voies de signalisation permettant de réguler les activités cellulaires. Les matrices rigides augmentent le nombre d'adhérences focales, leurs tailles et les forces de tractions générées entre les FA et la MEC par rapport aux matrices souples (Handorf et al. 2015).

Les adhérences focales dans les cellules fonctionnent comme des mécano-détecteurs générant des forces pour tirer la MEC, amenant ainsi les cellules à migrer vers des zones avec une MEC plus rigide. La rigidité de la MEC est capable de réguler l'activité de FAK pour déclencher l'activation ultérieure des signalisations intracellulaires permettant de réguler les activités cellulaires. Par exemple, Shih et al. ont démontré qu'une matrice rigide améliore l'activité de FAK et augmente l'activation de ERK1/2 en aval, favorisant la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses (During and Differentiation 2011) (Handorf et al. 2015).

La voie de signalisation Rho/ROCK joue également un rôle crucial dans la régulation de la mécano-transduction cellulaire en réponse à la rigidité des matrices. Il a été démontré que l'activité de Rho est régulée par la rigidité de la MEC car les matrices rigides conduisent à une activation accrue de RhoA et à la contractilité du cytosquelette d'actine.

De plus, Chaudhuri *et al.* ont démontré que dans l'épithélium mammaire, les signaux mécaniques induits par la rigidité de la MEC sont transmis par la voie des intégrines  $\beta$ 4-Rac1-PI3K, et que les phénotypes malins des cellules sont induits lorsque la rigidité de la MEC est augmentée (Chaudhuri et al. 2014) (Handorf et al. 2015).

De plus Alberto Elosegui-Artola *et al* en 2016, ont montré que la rigidité des matrices était transmise par la formation de « clutch » ou du regroupement des protéines des adhérences focales actine/taline/intégrine,

et que la régulation de la transmission des forces était régulée par la dynamique du clutch. La transduction du signal mécanique débute avec les talines lorsque les cellules passent sur un substrat dont la rigidité dépasse un seuil (dans cette étude leur maximum est avant 100kPa et le seuil se situe après 10kPa). En dessous de ce seuil les intégrines relâchent l'adhérence focale avant que les talines puissent se mettre en configuration permettant d'effectuer leur transmission. Au-dessus du seuil, les talines se lient à la vinculine, entraînant la croissance de l'adhésion et la translocation nucléaire de YAP. Ils ont donc vu que la contractilité de la myosine, la liaison des intégrines et la stabilité mécanique de la taline régulent différemment et de façon non linéaire la transmission des forces à partir d'un seuil de transduction (Elosegui-Artola et al. 2016).

- **Influence de la rigidité sur la migration des cellules cancéreuses :**

De manière générale, la littérature décrit que l'augmentation de la rigidité de l'environnement permet une augmentation de la capacité migratoire dans les cancers. Comme décrit précédemment, durant la croissance tumorale il y a un processus clair de rigidification du microenvironnement appelé processus desmoplastique lié, à la sécrétion de protéines de la MEC comme la fibronectine ou le collagène, aux MMP ou encore au « crosslinking » des fibres de collagènes par la lysyl oxydase (LOX). Dans le cas du cancer du sein, où la rigidité peut augmenter jusqu'à 10 fois, cette augmentation est souvent vue en périphérie de la tumeur, sur le front de migration, suggérant que ces propriétés physiques vont agir comme promoteur de la progression de la maladie (Handorf et al. 2015).

Bien qu'il reste à élucider les mécanismes exacts par lesquels la rigidité accrue de la MEC augmente l'invasivité des cellules cancéreuses, il est connu que les cellules réaliseraient des adhérences cellulaires plus fortes et plus grandes avec les MEC lorsqu'elle est rigide, provoquant le regroupement des intégrines et l'activation des adhérences focales. L'augmentation du regroupement des intégrines entraîne une mécano-transduction améliorée qui favorise la migration cellulaire. De plus, le remodelage de la MEC a également été observé au niveau de futurs sites secondaires de métastases, appelés niches pré-métastatiques, formés en partie, par des protéines LOX sécrétées par la tumeur primaire (Erler and Weaver 2009). Le remodelage de la MEC dépendant de LOX et le raidissement de la matrice à des sites éloignés agissent pour faciliter la colonisation et la croissance des cellules tumorales, soulignant ainsi le rôle critique que joue la rigidité de la MEC pour encourager un microenvironnement tumoral et la migration (Handorf et al. 2015).

De plus, Leight et al. en 2012 ont démontré que la rigidité de l'environnement en présence de TGF  $\beta$  pouvait permettre le passage de celui-ci d'une configuration pro-apoptotique à une configuration pro transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), favorisant donc l'invasivité et l'agressivité des cellules MCF-7 de cancer du sein (Leight et al. 2012a).

- **Influence de la rigidité sur la migration des cellules de gliome :**

Chez les gliomes, il y a une augmentation de la rigidité intra et péri-tumorale due à l'augmentation de la compression et donc du confinement, ainsi qu'au processus desmoplastique induit par les cellules de gliomes et les cellules du micro environnement. Les cellules de gliome migrantes vont alors utiliser les propriétés mécaniques de ce micro-environnement pour favoriser leur migration (Umesh et al. 2014a).

Lorsque des cellules de glioblastome sont posées sur une surface 2D rigide, elles présentent un taux de migration plus élevé, à l'image des autres types de cancers. Également comme dans les autres types de cancers, la mécanotransduction passe par les intégrines ainsi que par les adhérences focales, les protéines FAK, les GTPases de la famille Rho et la myosine II contractile non musculaire qui permettraient d'exercer des forces de traction sur la MEC en favorisant la contractilité de l'acto-myosine (Umesh et al. 2014a).

Ulrich *et al* en 2009 ont montré que lorsque différentes lignées de glioblastome (U373-MG, U87-MG, U251-MG, SNB19, C6) étaient déposées sur un substrat rigide recouvert de fibronectine, elles migraient et se propageaient plus rapidement en formant des adhérences focales matures. Ils décrivent également une augmentation de la prolifération sur des matrices rigides (Ulrich, De Juan Pardo, and Kumar 2009a).

De plus, Umesh *et al.* en 2014, ont vu que la rigidité permettait l'augmentation de l'activité de l'EGFR et de sa phosphorylation ainsi que celle de ces effecteurs Akt et PI3k et permettrait le regroupement des récepteur à l'EGF qui se condensent alors au niveau des adhérences focales (Umesh et al. 2014a).

Enfin Bangasser *et al.* en 2017, ont mis au point une simulation permettant de prédire la rigidité optimale pour la migration des cellules souches de glioblastome. Ils ont ensuite prouvé expérimentalement ce qu'ils avaient prédit en montrant l'existence de ce maximum de migration à 100kPa sur des cellules U251 de gliome et la dépendance de cet optimum à la myosine II contractile (Bangasser et al. 2017b).

#### **6.4.1.2 - Durotaxie :**

Les cellules sont également capables de répondre à un phénomène appelé durotaxie, c'est-à-dire qu'elles seraient en capacité de migrer en direction de matrices plus rigides lorsqu'elles se trouvent sur des supports mous et présentent ainsi une réponse directionnelle en réponse à un gradient de rigidité du substrat. La durotaxie est prévalente chez les fibroblastes qui migrent vers des régions de rigidité maximale lorsqu'ils sont placés sur une matrice de rigidité variable et présentent une signalisation mécano-sensorielle graduée, y compris concernant les adhérences focales dont la médiation est assurée par les intégrines et la génération de traction via la contractilité médiée par la myosine II. Cependant, il reste à explorer les mécanismes par lesquels les cellules intègrent des gradients de rigidité pour la détection de direction (Haeger et al. 2015).

### 6.4.2 - Confinement :

Un mode de migration important *in vivo* est celui se déroulant à travers des espaces confinés. Ces espaces se présentent sous forme de pores dans le MEC du stroma tumoral ou sous forme de « tunnels » dans les vaisseaux sanguins. En plus des modifications de rigidité, le remodelage des MEC, par les cellules tumorales et les cellules de l'environnement tumoral, offre de nouvelles possibilités pour la migration en condition de confinement.

Les mécanismes sous-jacents par lesquels les cellules détectent et s'adaptent aux différents microenvironnements physiques restent à déterminer. Différents mécanismes ont été proposés et impliquent trois grandes classes de mécanorécepteurs : les canaux ioniques activés par étirement, les éléments du cytosquelette et de la matrice nucléaire, et les composants des adhérences focales (C. D. Paul, Mistriotis, and Konstantopoulos 2017).

Le confinement influence fortement la migration des cellules tumorales. Plus le confinement est augmenté, plus il devient difficile pour les cellules de se déformer suffisamment pour se faufiler dans les espaces étroits. Le noyau, qui est le composant cellulaire le plus rigide, aurait un rôle limitant dans la migration en situation de confinement et empêcherait les mouvements cellulaires en 3D lorsque les pores de la MEC seraient inférieurs à un seuil critique (C. D. Paul, Mistriotis, and Konstantopoulos 2017).

Dans un gel de collagène, la migration des cellules tumorales serait freinée lorsque la taille des pores est inférieure à  $7 \mu\text{m}^2$ , correspondant à 10% de la taille de la section transverse du noyau. En dessous de ce seuil, il n'y aurait pas de translocation nucléaire et les cellules ne pourraient pas migrer en absence de remodelage de la matrice (Bui et al. 2016) (C. D. Paul, Mistriotis, and Konstantopoulos 2017).

L'inhibition de la lamine A, un des composants clef de la lamina nucléaire améliore la migration de cellules de glioblastomes au travers de pores étroits. De plus, *in vivo* suite à une xénogreffe, les cellules montreraient un niveau réduit de lamine A et une augmentation de l'élongation nucléaire. A l'inverse, l'augmentation de la lamine A supprimerait la migration en condition de confinement (C. D. Paul, Mistriotis, and Konstantopoulos 2017).

Dans les microenvironnements avec de petits pores empêchant le mouvement des cellules, les MMP travaillent généralement avec les forces contractiles générées par les cellules pour cliver les fibres de la MEC créant ainsi des voies de migration. Ce mode migratoire dépendant des MMP est associé à une migration mésenchymateuse (C. D. Paul, Mistriotis, and Konstantopoulos 2017).

Les cellules régulent leur signalisation pour maintenir un équilibre optimal entre la signalisation RAC1 et celle de RHOA/myosine II. Une augmentation de RAC1 va avoir lieu pour permettre une locomotion efficace sur des surfaces 2D non confinées, alors qu'une forte augmentation de RhoA/myosine II va avoir lieu lors d'une migration confinée (C. D. Paul, Mistriotis, and Konstantopoulos 2017).

L'invasion des cellules cancéreuses peut également se dérouler de manière indépendante du MMP. Dans le cas de cellules de cancer du sein, il a été vu que les cellules déforment les fibres de collagène via des

protéines kinase associées à Rho (ROCK), une voie indépendante des protéinases. La suppression de ROCK dans ces cellules a modifié la localisation de la chaîne légère de myosine et réduit l'invasion (Wyckoff et al. 2006) (C. D. Paul, Mistriotis, and Konstantopoulos 2017). La capacité des cellules cancéreuses à envahir, via un mode amiboïde indépendant des MMP par rapport à un mode mésenchymateux dépendant du MMP, peut être attribuée non seulement aux propriétés intrinsèques des cellules, mais aussi à l'architecture 3D du microenvironnement local comme décrit précédemment (C. D. Paul, Mistriotis, and Konstantopoulos 2017).

La migration en situation de confinement a montré divers mécanismes dépendants de l'adhérence au substrat. En présence d'adhérence aux matrices, la migration sera dite à « pseudopodes ». Dans le cas d'une migration à faibles adhérence, la migration sera dite « amiboïde ».

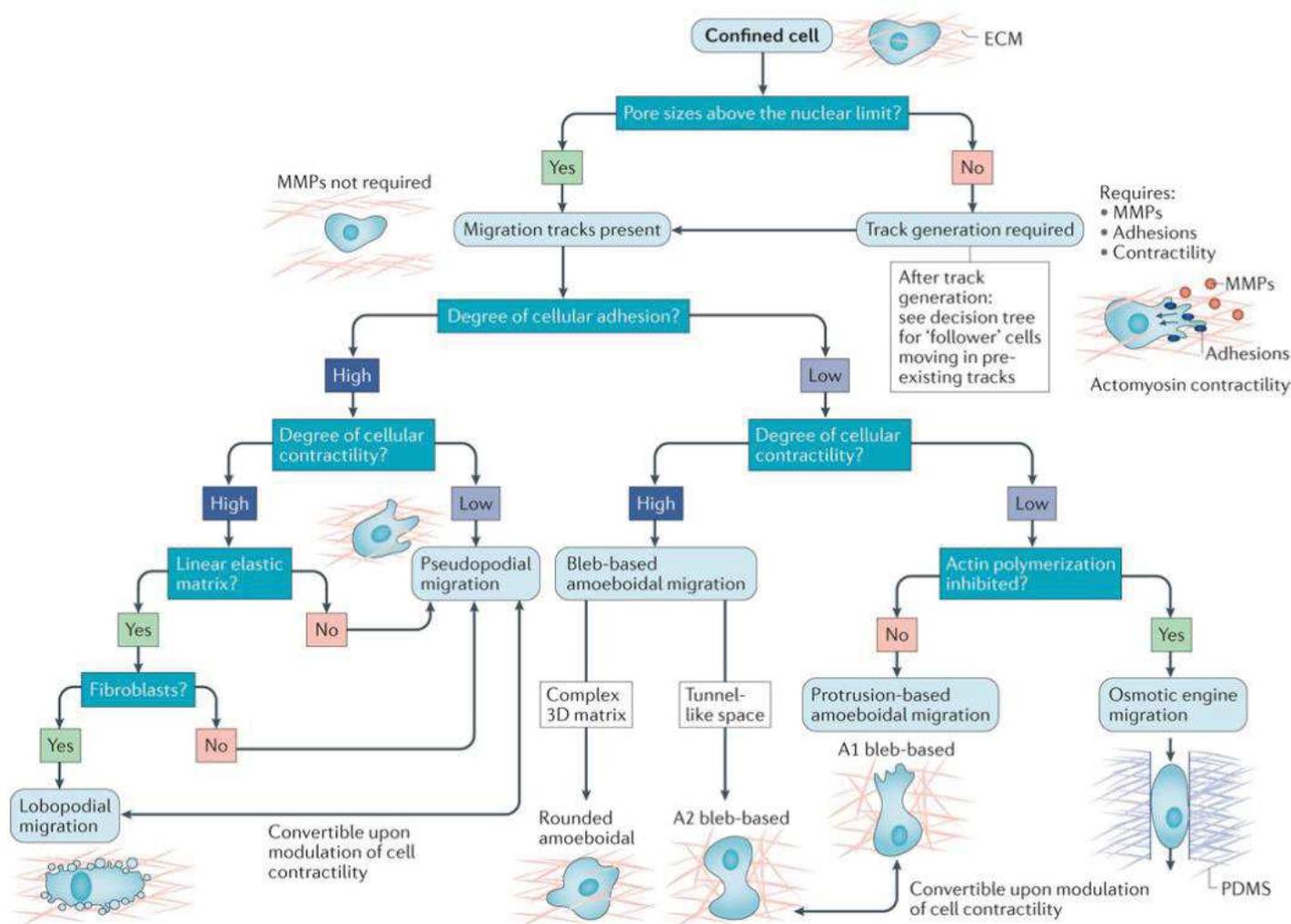


Figure 34 : De nombreux signaux extrinsèques et intrinsèques influent sur les modes migratoires (C. D. Paul, Mistriotis, and Konstantopoulos 2017).

Il a été récemment rapporté que le confinement des cellules A375 (cellules de mélanome humaines) induit une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire via le canal cationique Piezo1 activé par étirement PIEZO1 (Hung et al. 2016). Cette augmentation du taux de calcium intracellulaire induite par le

confinement régule négativement l'activité de la PKA via une voie dépendante de la phosphodiesterase 1 (PDE1). Dans cette étude de Hung, Konstantopoulos et al, il est nécessaire d'inhiber à la fois Piezo1 et la myosine II pour permettre une abolition des changements de régulation de la PKA induite par le confinement. L'inhibition seule de Piezo1 ou de la myosine II ne suffit pas, suggérant que les modules de signalisation Piezo1/PDE1/PKA et myosine II représentent deux mécanismes indépendants dans la détection du confinement. Ainsi, les signaux activés par Piezo1 et la myosine II en réponse au confinement sont intégrés dans un circuit de signalisation qui optimise la locomotion cellulaire (Hung et al. 2016). De plus, Piezo1 serait impliqué dans les capacités d'extravasation durant les processus métastatiques.

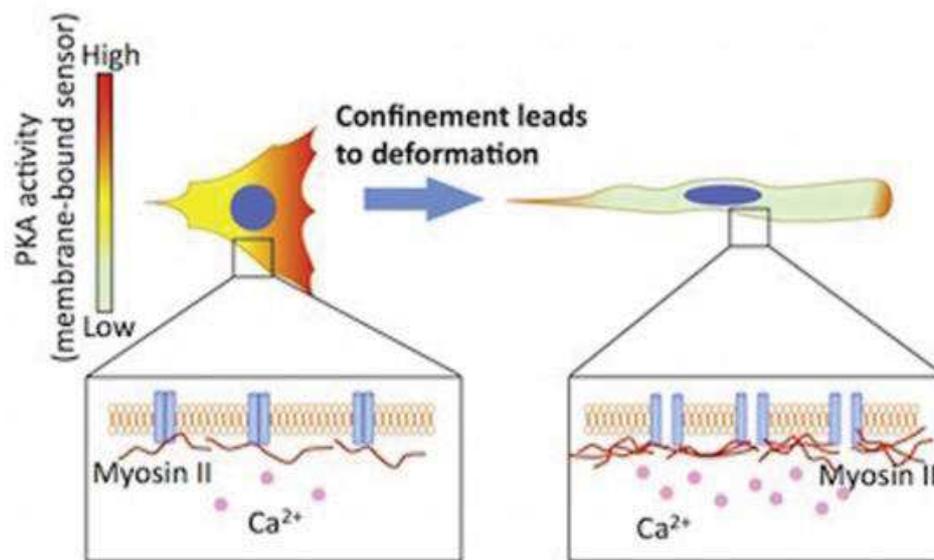


Figure 35 : Piezo1 et confinement. L'augmentation de calcium en situation de confinement a lieu via l'ouverture des canaux Piezo1. L'activité de la PKA est diminuée dans les espaces confinés par rapport au non confinés et cette diminution est dépendante de l'augmentation du calcium due à l'ouverture de Piezo1. De plus, cette augmentation du calcium permet l'augmentation de l'activité de la myosine II (Hung et al. 2016).

De plus, il a été vu que la présence de protéines de MEC est nécessaire à la sensibilisation de Piezo1 aux déformations mécaniques des membranes (Gaub and Muller 2017). Enfin, ce mécanorécepteur serait activé par les forces de traction exercées au niveau des adhérences focales (Nourse and Pathak 2017).

## **7- Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) :**

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus qui permet à une cellule épithéliale polarisée, qui interagit normalement avec la membrane basale, de subir de multiples changements biochimiques qui lui permettent d'acquérir un phénotype de cellule mésenchymateuse, qui inclut une capacité migratoire accrue, un caractère invasif, une résistance élevée à l'apoptose et une production considérablement augmentée de protéines de la MEC (Kalluri and Weinberg 2009).

La réalisation de l'EMT est marquée par la dégradation de la membrane basale sous-jacente et la formation d'une cellule mésenchymateuse qui peut migrer loin de la couche épithéliale dans laquelle elle a pris naissance. Un certain nombre de processus moléculaires distincts sont engagés afin d'initier une EMT. Il va y avoir l'activation des facteurs de transcription, l'expression de protéines de surface cellulaire spécifiques, la réorganisation et de l'expression de protéines du cytosquelette et la production d'enzymes de dégradation de la MEC (Kalluri and Weinberg 2009).

L'EMT est un processus réversible d'où le nom de « transition » et peut réaliser un processus inverse appelé transition mésenchymo-épithéliale (MET) impliquant la conversion de cellules mésenchymateuse en cellules de type épithéliale.

L'EMT est un mécanisme reconnu pour distribuer les cellules dans les embryons, former des cellules mésenchymateuses dans les tissus lésés et initier le comportement invasif et métastatique dans les cancers (Kalluri and Weinberg 2009).

### **7.1- L'EMT dans le développement :**

Au cours d'étapes spécifiques de l'embryogenèse et du développement des organes, les cellules de certains épithéliums semblent être plastiques et donc capables de passer de l'état épithélial à l'état mésenchymateux via les processus EMT et MET. L'EMT n'étant pas irréversible, plusieurs séries d'EMT et MET sont nécessaires pour la différenciation finale spécialisée et l'acquisition de la structure tridimensionnelle complexe des organes internes. Ces cycles séquentiels sont appelés EMT primaire, secondaire et tertiaire. Ainsi, lorsque le développement épithélial est achevé, les cellules épithéliales possèdent généralement des fonctions spécifiques au tissu qu'elles constituent, tandis que les cellules mésenchymateuses de ces tissus jouent plutôt un rôle de soutien (Thiery et al. 2009).

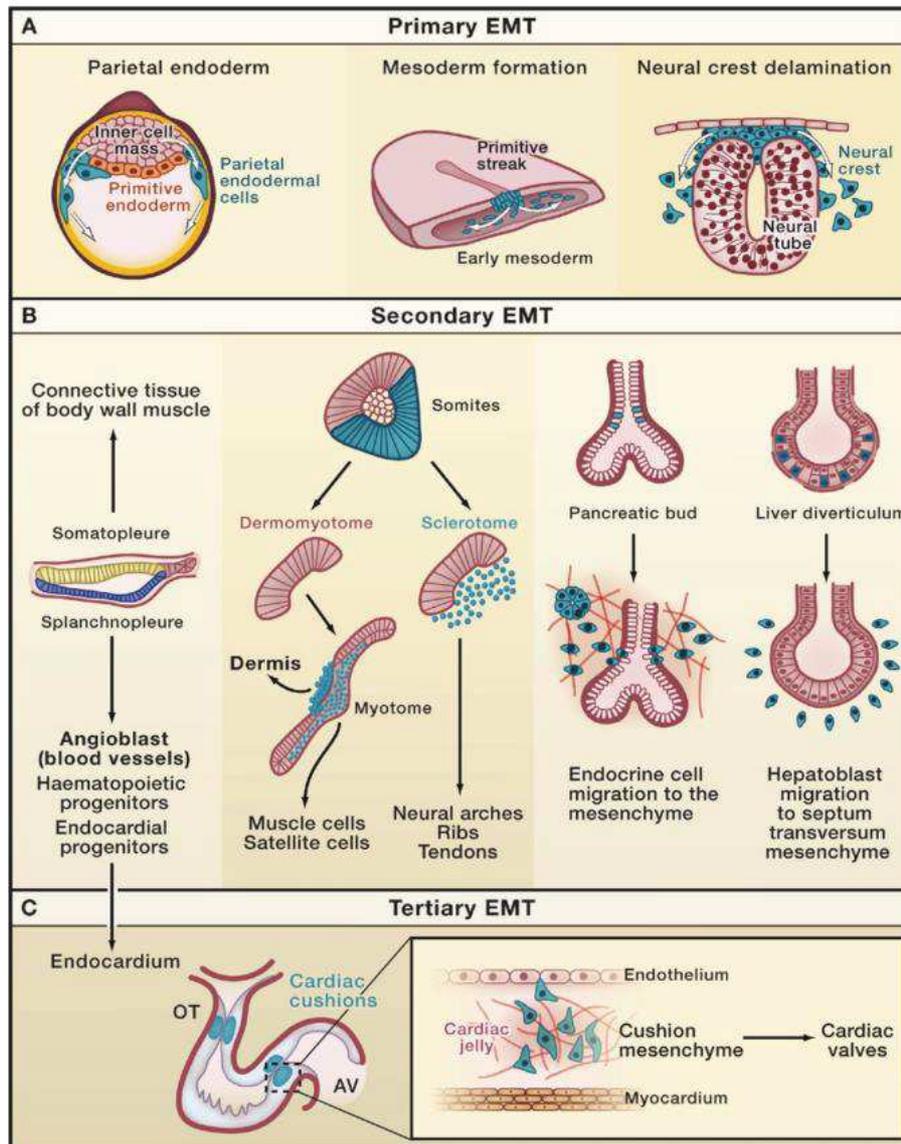


Figure 36 : EMT successifs durant le développement embryonnaire (Thiery et al. 2009).

L'EMT primaire se produit tôt au cours du développement embryonnaire, avant même l'implantation. Le premier EMT après implantation est celui subi par les progéniteurs mésendodermiques lors de la gastrulation, alors que la délamination des cellules de la crête neurale du tube neural dorsal arrive plus tard.

Les cellules mésodermiques précoces sont subdivisées en couches de cellules mésodermiques axiales, paraxiales, intermédiaires et latérales qui se condenseront en structures épithéliales transitoires : la notochorde, les somites, la somatopleure et la splanchnopleure respectivement. Ces structures transitoires subiront une EMT secondaire, conduisant à la genèse de cellules mésenchymateuses qui se différencieront en type cellulaire spécifique.

Les tissus endodermiques, y compris le bourgeon pancréatique et le diverticule hépatique, présentent également des changements morphologiques rappelant un EMT secondaire permettant la dissociation des cellules endocrines des hépatoblastes.

Un exemple d'EMT tertiaire apparaît lors de la formation de ces « bourrelets » mésenchymateux cardiaques au niveau du canal atrio-ventriculaire ou de la voie d'écoulement. Les « bourrelets » mésenchymateux sont les précurseurs des valves cardiaques (Thiery et al. 2009).

## **7.2- L'EMT au cours du développement tumoral :**

L'EMT a été impliquée dans la migration des cellules tumorales et confère des propriétés métastatiques aux cellules cancéreuses en améliorant leur mobilité, leur capacité d'invasion et leurs résistances à l'apoptose. De plus, les cellules tumorales dérivées de l'EMT acquièrent des propriétés de cellules souches et présentent une résistance thérapeutique marquée.

L'évolution parcourue par une tumeur primaire pour devenir métastatique est complexe et implique des processus en plusieurs étapes comprenant, l'invasion locale de cellules cancéreuses dans les tissus voisins au site primaire et une dissémination dans la circulation (intravasation). Les cellules tumorales circulantes (CTC) vont ensuite se déplacer à travers la circulation sanguine ou lymphatique, s'extravaser dans les organes distants et rester habituellement inactives après la colonisation. Cependant, dans certains cas, la dormance est rompue, entraînant une progression vers la macrométastase. Chaque étape de la cascade métastatique est associée à une signalisation réciproque entre les cellules tumorales et le microenvironnement (Mittal 2018).

Dans des conditions physiologiques normales, les cellules épithéliales sont séparées de la MEC par des membranes basales. Cette barrière empêche l'interaction entre les cellules épithéliales et leur microenvironnement. La déstabilisation de la membrane basale permet le contact entre les différentes protéines de signalisation de la MEC et les cellules épithéliales. La signalisation cellulaire qui en résulte peut améliorer la progression de l'EMT en activant différentes voies de signalisation (Mittal 2018).

Ainsi, plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la régulation de l'EMT ; incluant le « transforming growth factor » (TGF) ou facteur de croissance transformant, les « bone morphogenic protein » ou protéine morphogène osseuse (BMP), les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR), les facteurs de croissance des hépatocytes (HGF), les Wnt/ $\beta$ -caténines et voies Notch (Akmarina, Said, and Williams 2011). Les cellules cancéreuses en cours de l'EMT présentent à la fois des changements morphologiques et des altérations moléculaires, comme en témoigne la diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux, comprenant la E-cadhérine, le ZO-1 et l'occludine, et l'expression accrue des marqueurs mésenchymateux comprenant la N-cadhérine, la vimentine, la protéine 1 spécifique des fibroblastes et la fibronectine. Par conséquent l'un des marqueurs de l'EMT est le changement de l'expression des cadhérines, passant de l'expression de la E-cadhérine avant EMT, à la N-cadhérine durant l'EMT avant de revenir à la E-cadhérine durant la MET (Mittal 2018).

De plus, les programmes de base de l'EMT impliquent l'activation des facteurs de transcription de l'EMT, tel que les Snail, Zeb1 et 2 ou Twist, des miARNs et des régulateurs épigénétiques accompagnent la plasticité cellulaire, et Zeb1 est l'un des grands inhibiteurs de l'expression de la E-Cadhérine (Portillo 2014).

En plus de favoriser la transformation des tumeurs primaires à un stade précoce en tumeurs invasives, l'EMT a été impliquée dans la production de cellules cancéreuses présentant des caractéristiques semblables à celles des cellules souches, notamment une augmentation de l'auto-renouvellement, des capacités d'initiation de tumeurs et de la résistance à l'apoptose et à la chimiothérapie (Mani et al. 2009) (Shibue and Weinberg 2018) (Mittal 2018).

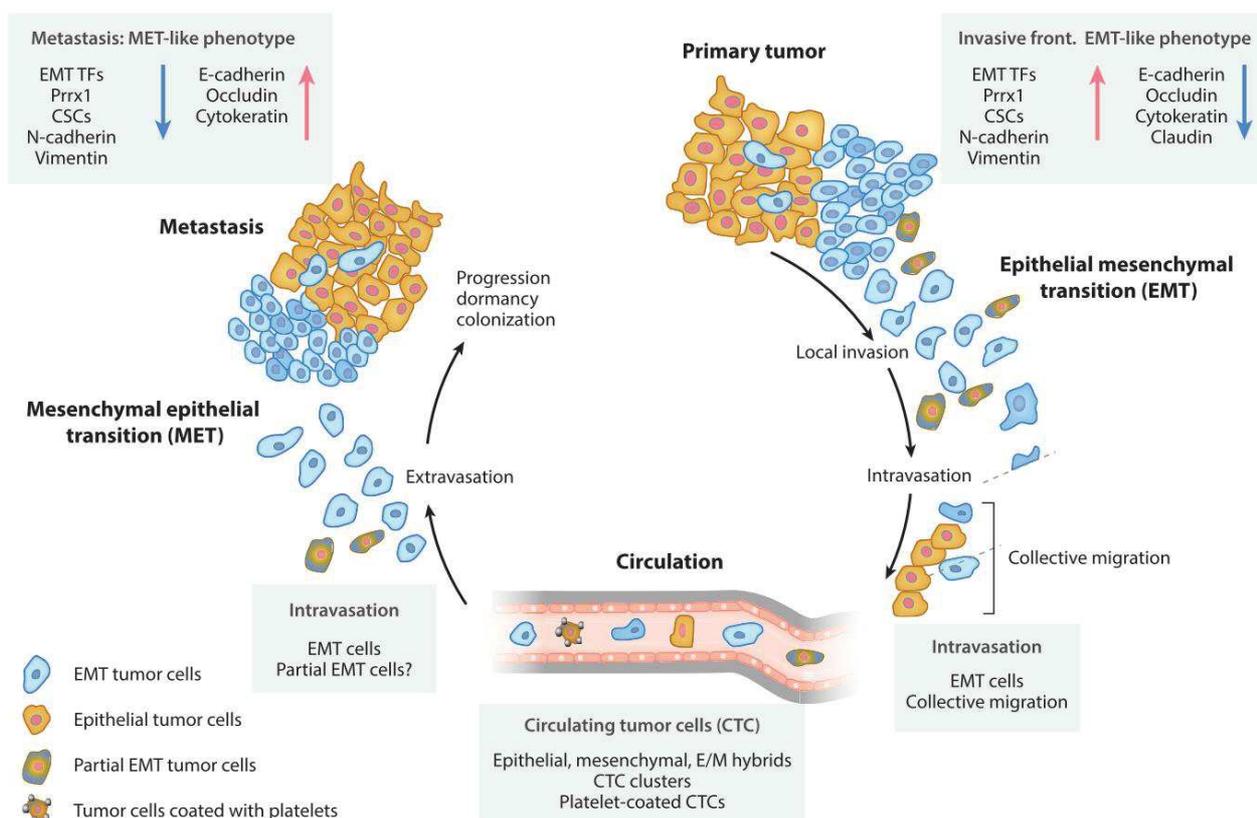


Figure 37 : EMT et métastases. Les cellules cancéreuses subissant une EMT dans la tumeur primaire sont associées à des changements moléculaires conduisant à la perte des adhésions cellulaires qui favorise la migration et l'invasion locales, à l'entrée dans les vaisseaux sanguins (intravasation), à la survie des cellules individuelles et à la dissémination suite à la sortie des vaisseaux (extravasation) dans le parenchyme des organes distants. Une fois la colonisation d'un organe effectuée, les cellules cancéreuses ayant réalisé une EMT peuvent se différencier de nouveau en un phénotype épithélial par un processus de la MET via leurs interactions avec le microenvironnement tumoral, leur permettant alors de progresser vers la macrométastase (Mittal 2018).

Néanmoins, la seule présence de cellules cancéreuses ayant subi une EMT dans la tumeur primaire ou la circulation périphérique ne peut pas être utilisée pour conclure que l'EMT est réellement nécessaire pour la métastase. Le devenir des cellules cancéreuses épithéliales de la tumeur primaire au site métastatique dans le contexte de la plasticité EMT doit être déterminé. Par conséquent le traçage génétique des lignées et des

approches de microscopie vidéo intravital dynamique ont commencé à révéler la nature temporelle et spatiale de l'EMT en fonction de la progression métastatique (Mittal 2018).

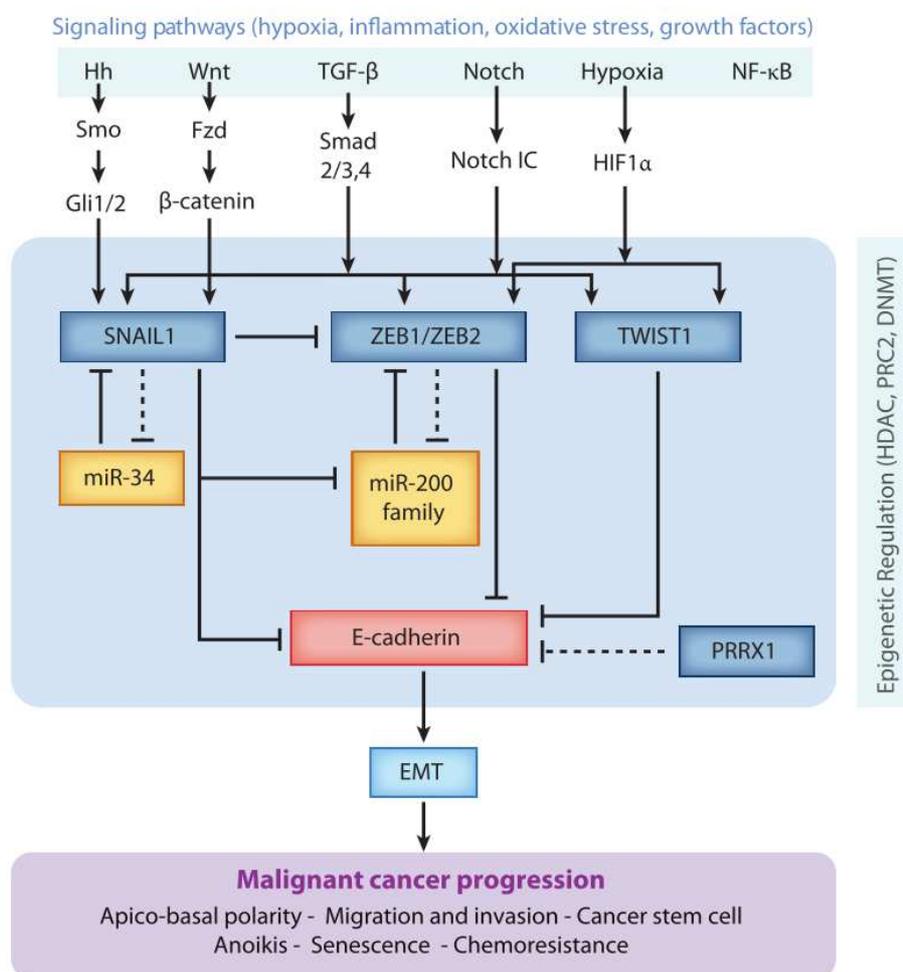


Figure 38 : Les voies de signalisation communes activent les régulateurs EMT. Ils sont également régulés par des miARNs et des régulateurs épigénétiques permettant ensuite d'induire des changements phénotypiques (Mittal 2018).

Ainsi il a été vu que dans les cas de tumeurs mammaires, les cellules mobiles capables de métastase à distance sont celles ayant une signalisation TGF  $\beta$ -Smad2/3 promotrice d'EMT active. Celles ne disposant pas de cette voie activée réaliseraient des migrations collectives passives vers les ganglions lymphatiques (Giampieri et al. 2010) (Mittal 2018).

Dans un modèle murin de cancer du pancréas mené par Kras/p53, des cellules tumorales marquées envahissant et pénétrant dans le flux sanguin ont présenté un phénotype mésenchymateux et se sont implantées sur le foie à un stade très précoce du développement tumoral primaire, avant même que la malignité ne puisse être détectée par une analyse histologique. Ces cellules tumorales post-EMT ont obtenu l'expression de marqueurs mésenchymateux typiques, dont la fibronectine, Zeb1 et Fsp1 et ont perdu l'expression de l'E-cadhérine (Rhim et al. 2013).

De plus, le blocage de l'EMT par la surexpression miR-200, ciblant les régulateurs principaux de l'EMT Zeb1 et Zeb2 et répresseurs transcriptionnels clés de l'E-cadhérine, ont permis un blocage de l'EMT (Wellner et al. 2008) (Mittal 2018).

Néanmoins, l'inhibition d'un seul facteur de transcription de l'EMT, comme Zeb1/2, Snail ou Twist, peut être compensée par les autres facteurs de transcription de l'EMT (W. Li and Kang 2017). De plus, la délétion génétique de seulement Zeb1 dans un modèle de cancer du pancréas, a entraîné une réduction d'environ 60 % des métastases, ce qui suggère un rôle de l'EMT piloté par Zeb1 dans les métastases, mais le doute subsiste sur la nécessité de l'EMT dans les 40 % de métastases restants (Krebs et al. 2017) (Mittal 2018).

### **7.3- Impact des propriétés mécaniques sur l'EMT :**

Outre les facteurs biochimiques d'un environnement fibrotique tumoral, le microenvironnement tumoral est associé à une rigidité tissulaire 20 à 50 fois plus importante que dans les tissus sains. Dans les modèles de tumeurs mammaires de souris, la progression tumorale est également caractérisée par un raidissement progressif des tissus (Jose I. Lopez, Inkyung Kang†, a, Weon-Kyoo Youb, Donald M. McDonaldb 2013).

De façon générale, les signaux mécaniques peuvent affecter les signalisations impliquées dans l'EMT physiologique associée au développement ou à la maladie. Les signaux mécaniques du micro environnement sont détectés et transmis à travers la membrane plasmique par des récepteurs d'adhérence de surface transmembranaire tels que les intégrines au sein des adhérences focales et les cadhérines jonctions adhérentes. Ces changements extracellulaires, bien que distincts, sont impliqués dans la traduction de signaux mécaniques en signaux intracellulaires qui, en fin de compte, entraînent la transcription des gènes impliqués dans l'initiation ou le renforcement de l'EMT et donc dans l'augmentation de la migration et de l'invasion (Przybyla, Muncie, and Weaver 2016).

La régulation mécanique de l'EMT implique des réarrangements cytosquelettiques, une relocalisation des protéines des adhérences focales et une réorganisation au niveau des tissus. En plus de déclencher directement les voies de signalisation, les signaux mécaniques peuvent également affecter la capacité des cellules épithéliales à répondre aux signaux induisant l'EMT, modifiant ainsi fonctionnellement des voies de signalisation.

L'augmentation de la rigidité de la matrice a été vue comme régulant la signalisation TGF- $\beta$ 1, un puissant inducteur d'EMT dans les cellules tumorales (Leight et al. 2012b). Twist1 quant à lui, s'est avéré essentiel dans le cas de l'EMT et de l'invasion tumorale induite par une forte rigidité matricielle (S. C. Wei et al. 2015). Le signal de Twist 1 issu de la mécano-transduction, en coopération avec TGF- $\beta$ 1, peuvent en induire l'EMT et l'invasion tumorale. En réponse à la rigidité croissante de la MEC, Twist1 est libérée de son ancrage cytoplasmique à G3BP2 pour se transloquer dans le noyau, entraînant ainsi le programme transcriptionnel de l'EMT et l'invasion tumorale. De ce fait, une expression réduite du G3BP2 en combinaison

avec une rigidité accrue de la matrice prédit une faible survie chez les patientes atteintes d'un cancer du sein. De plus la périphérie de la tumeur est plus rigide que le centre, ce qui correspond à l'observation selon laquelle les cellules du front invasif des tumeurs sont sujettes à subir une EMT avant la dissémination (W. Zhang et al. 2017).

Cela soulève la possibilité que le mouvement des cellules tumorales individuelles soit contrôlé localement par les propriétés mécaniques de la niche qui l'entoure. Cette hypothèse correspond bien avec l'observation selon laquelle la durotaxie (migration cellulaire directionnelle vers un substrat plus rigide) est assurée par un signal différentiel des adhérences focales à l'échelle de la cellule unique. Les adhérences focales sont capables de détecter de minuscules changements dans la rigidité de la matrice, ce qui dirige la polarisation de l'adhésion focale et le mouvement des cellules. Ceci fournit un mécanisme potentiel par lequel les cellules tumorales peuvent migrer préférentiellement vers la périphérie de la tumeur, facilitant ainsi la dissémination (Sergey V. Plotnikov<sup>1</sup>, Ana M. Pasapera<sup>1</sup>, Benedikt Sabass<sup>2</sup> 2013).

D'autres signaux mécaniques, incluant la géométrie des tissus et les forces intracellulaires, ont également permis la modulation de l'EMT. YAP/TAZ, le co-activateur de transcription clé dans la voie Hippo, est régulé par divers indices mécaniques, comprenant la rigidité de la matrice et la forme des cellules. Bien qu'il ne soit pas un des régulateurs principaux de l'EMT, YAP est tout de même impliqué dans son induction (Dupont et al. 2011). Ces résultats suggèrent que de multiples voies de signalisation de mécano-transduction distinctes pourraient empiéter sur le programme de l'EMT pour favoriser l'invasion des cellules tumorales (W. Zhang et al. 2017).

Pendant l'événement EMT de formation de la crête neurale, le passage de la E à la N-cadhérine conduit à une redistribution des forces intracellulaires des jonctions cellule-cellule vers les adhérences cellule-matrice, favorisant ainsi le désassemblage des jonctions adhérentes ("Cadherin Switch during EMT in Neural Crest Cells Leads to Contact Inhibition of Locomotion via Repolarization of Force," n.d.). En accord avec cette notion, la tension tissulaire peut entraîner la progression tumorale par la déstabilisation des jonctions adhérentes et la translocation nucléaire de  $\beta$ -caténine liée à la diminution de la E-Cadhérine (Samuel et al. 2011) (W. Zhang et al. 2017). Ceci soulève la possibilité que les cellules tumorales qui ont subi une EMT perdent leur adhérence cellule-cellule via un processus de mécano-transduction. Ainsi, les cellules tumorales disséminées peuvent répondre différemment aux signaux mécaniques (W. Zhang et al. 2017).

## 7.4 – L'EMT dans les Gliomes – « Glial to Mesenchymal Transition » : GMT

Les facteurs d'induction de l'EMT dans les gliomes varient typiquement de ceux observés dans les cancers épithéliaux parce qu'il y a peu de membrane basale dans le cerveau, si ce n'est autour des vaisseaux sanguins. De plus, le facteur de contact cellulaire le plus important, la E-cadhérine, est rarement exprimé dans les gliomes. Les gliomes adoptent un phénotype qui pourrait être considéré comme mésenchymateux à plusieurs égards, et c'est pourquoi les termes "transition glio-mésenchymateuse" (GMT) ou processus « EMT-like » ont été proposés. La compréhension des différences entre l'EMT classique et la GMT commence à être approfondie depuis peu.

Considérant que la E-cadhérine est rare dans les gliomes, la transition E-Cadhérine à N-cadhérine n'est pas essentielle pour la GMT (probablement du au fait que la E-cadhérine est peu exprimé dans le cerveau sain (Schwechheimer, Zhou, and Birchmeier 1998)). Il est supposé que le rôle de la N-cadhérine serait lié à sa distribution dans la membrane cellulaire, qui altérerait la capacité de motilité de la cellule tumorale, ou à son niveau d'expression. Si l'on regarde les signatures épithéliales et mésenchymateuses basées sur l'EMT induite par le TGF $\beta$ , la plupart des gliomes possèdent un phénotype plus mésenchymateux. De plus, les lignées cellulaires de gliome les plus courantes présentent également une signature mésenchymateuse prédominante également. Cependant, les cellules de GBM passent probablement dans différents spectres de caractéristiques épithéliales et mésenchymateuses au cours de la tumorigenèse et de la progression tumorale (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018).

Les cellules de gliome envahissantes, une fois qu'elles se sont infiltrées, ont montré de faibles niveaux d'expression de gènes de l'EMT et une augmentation de l'expression des protéines attribuées aux cellules souches de gliomes, suggérant que leurs caractéristiques mésenchymateuses peuvent être atténuées une fois l'infiltration réalisée. Par conséquent les phénotypes cellules souches tumorales et les caractéristiques épithéliales/mésenchymateuses sont régulées simultanément (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018). En effet Nevo *et al.* ont montré que les cellules de GBM envahissantes expriment un niveau élevé d'Olig2 par rapport aux marqueurs de l'EMT et que la diminution d'OLIG2 conduit à une diminution des marqueurs de l'EMT Twist et Slug (Nevo et al. 2014)(Iser et al. 2017). Enfin, il a été démontré que le knockdown de ZEB1 dans les cellules GBM inhibe les régulateurs des cellules souches SOX2, CD133 et OLIG2 renforçant la relation étroite entre l'EMT et le caractère souche (Siebzehnrbul et al. 2013a) (Iser et al. 2017).

- **Twist** : Twist est une protéine transcriptionnellement active pendant la différenciation cellulaire et la détermination de la lignée. Lors de l'EMT, Twist permet la suppression de la E-cadhérine et la régulation à la hausse la N-cadhérine et de la production fibronectine.

Dans le cas des GBM, il est régulé à la hausse dans les gliomes malins et favorise l'invasion des cellules gliomes via l'activation de Slug, indépendamment du changement E-cadhérine / N-Cadhérine (Iwadata 2016). La sous-expression de Twist1 inhibe l'EMT en réduisant l'expression de N-cadhérine, de vimentine, de  $\beta$ -caténine et de Sox2 (marqueur de NSC). De même, l'inhibition de Sox2 a diminué l'expression de Twist1, ce qui suggère que Twist1 et Sox2 sont nécessaires pour maintenir le caractère souche des cellules souches de gliome et induisent l'EMT (Velpula et al. 2011a) (Iser et al. 2017). Enfin, l'up-regulation de Twist1 est assimilée à une expression accrue des gènes liés à l'EMT comme FN1, POSTN, MMP2, Slug et HGF (Mikheeva et al. 2010).

- **Slug :** Slug est un membre de la famille des activateurs transcriptionnels jouant un rôle important dans la suppression du phénotype épithélial dans de nombreux cancers et est étroitement associé à l'augmentation de la migration et de l'invasion des gliomes malins (Iwadata 2016). L'expression de Snail est contrôlée par des voies de signalisation multiples, telles que Wnt, TGF $\beta$ , HIF-1 $\alpha$  ou encore PI3K/Akt (Iser et al. 2017).
- **ZEB :** Son expression est induite en réponse à TGF $\beta$  et Wnt et aux facteurs de croissance qui activent le signal RAS-MAPK. ZEB1 a une fonction importante dans la progression de la GBM, agissant comme facteur pro-tumoral, est inversement corrélé à la survie des patients atteints de GBM et promeut l'expression de marqueurs de l'EMT spécifiques comme N-cadhérine, Vimentine ou Snail (Iser et al. 2017). Wang et al ont observé que les patients atteints de GBM présentant des niveaux élevés de ZEB2 ont démontré une récurrence significativement plus précoce que les patients présentant de faibles niveaux de ZEB2 (Wang et al. 2014). Le facteur de croissance du tissu conjonctif (aussi connu sous le nom CCN2 ou CTGF) rend également les cellules de gliome très invasives par l'activation de NF- $\kappa$ B, qui déclenche ensuite l'expression de ZEB1 (Edwards et al. 2011)(Iwadata 2016).
- **Wnt/ $\beta$ -caténine :** Dans de multiples types de cancer, la  $\beta$ -caténine est séquestrée dans le cytoplasme par la E-cadhérine, puis la  $\beta$ -caténine est transloquée dans le noyau suite à la régulation à la baisse de la E-cadhérine étant directement corrélée avec l'acquisition du phénotype EMT. Bien que la majorité des GBM n'expriment pas l'E-cadhérine, la localisation nucléaire de

$\beta$ -caténine est principalement observée sur les bords invasifs des tumeurs (I. Paul et al. 2013). De plus, les GBM qui expriment des niveaux élevés de Wnt/ $\beta$ -caténine sont corrélés avec des temps de survie des patients plus courts (Sandberg et al. 2013). Les cellules GBM, dans lesquelles la voie WNT/ $\beta$ -caténine est activée, déclenchent l'expression d'un ensemble d'activateurs EMT, dont Twist1, ZEB1, Snail et Slug (Gong and Huang 2012). De plus, les niveaux d'expression élevés du récepteur de la caténine WNT/ $\beta$ , Frizzled-4, favorisent l'expression de Snail et l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux en GBM (X. Jin et al. 2011) (Iwadata 2016).

- **Notch** : Notch est un récepteur de surface cellulaire dont la signalisation est un inducteur primaire de l'EMT dans de nombreux cancers épithéliaux, y compris le cancer du poumon, du sein et du pancréas. (Iwadata 2016). Fan *et al.* (Xing Fana, b, Leila Khakic, Thant S. Zhua, Mary E. Soulesa, Caroline E. Talsmaa, Naheed Gulc, Cheryl Kohc, Jiangyang Zhangd, Yue-Ming Lih, Jarek Maciaczyki and Francesco DiMecog, j, Sara Piccirillok, Angelo L. Vescovik, and Charles G. Eberhartc, e 2010) ont rapporté que l'inhibition de cette voie de signalisation par les inhibiteurs de la  $\gamma$  sécrétase réduit le nombre de cellules souches CD133 positives dans les GBM. En effet, Notch est un régulateur majeur de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine mais aussi des cellules souches de gliome dans leurs microenvironnements. Notch est également corrélé avec l'activation de la voie d'activation de la PI3K/Akt (Iwadata 2016).

#### **7.4.1- EMT et microenvironnement des GBM :**

Les altérations génétiques et épigénétiques subies par les cellules cancéreuses les rendent sensibles aux signaux inducteurs d'EMT. Comme dit précédemment, les cellules cancéreuses mésenchymateuse mobiles sont typiquement observées sur le front d'invasion, suggérant que les signaux de différenciation pro EMT proviennent généralement du microenvironnement tumoral (Charles et al. 2012). Les signaux environnementaux sont capables de générer des phénotypes tumoraux très agressifs. (Iwadata 2016)

Un microenvironnement hypoxique est un puissant inducteur d'EMT dans divers types de cancer épithélial (Charles et al. 2012). Dans les gliomes, les processus inflammatoires ou un microenvironnement hypoxique au sein de la tumeur ou des tissus voisins sains peuvent entraîner le recrutement de macrophages ou de microglies dans l'environnement tumoral (Ye et al. 2012). Ces cellules libèrent un certain nombre de facteurs de croissance, dont du TGF- $\beta$ , de L'EGF, du PDGF et du FGF2, qui déclenchent l'expression des facteurs de transcription nécessaires à l'initiation de l'EMT, ainsi que de nombreuses protéines qui augmentent l'invasivité dans le cerveau sain environnant (Iwadata 2016).

Les matrix metalloprotéinases (permettant la dégradation de la MEC) MMP-2 et MMP-9 sont régulées par SNAI-1 et SNAI-2 (SLUG) qui favorise l'EMT et augmente l'activité invasive et migratoire des cellules tumorales. Ainsi, les cellules cancéreuses en EMT favorisent l'initiation de métastases. La stromélysine, ou MMP-3, quant à elle favorise l'EMT par l'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui à leur tour vont entraîner une surexpression de SNAI (Pala et al. 2013).

## 8 – Glycosylation :

### 8.1- Généralités :

Les glycanes constituent le groupe de molécules le plus complexe et le plus abondant des organismes vivants. Ils peuvent s'attacher aux protéines, pour former des glycoprotéines et des protéoglycanes, ou aux lipides, pour former des glycosphingolipides. La majorité des protéines ou des lipides couplés à un glycan sont exprimés à la surface des cellules où ils vont former un réseau épais appelé glycocalyx. Ils peuvent également être sécrétés dans le milieu extracellulaire afin d'être incorporés dans les MEC. Par conséquent les protéines ou lipides glyco-conjugés sont des acteurs majeurs de la motilité et des interactions cellulaires. Ils participent également à de nombreux processus biologiques clés comme l'adhésion cellulaire, la migration, la croissance, la différenciation, la transduction du signal, l'activation des récepteurs ou encore la modulation de la réponse immunitaire (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015).

Une dérégulation de la machinerie de glycosylation cellulaire est souvent associée à des processus physio-pathologiques comme par exemple le cancer, (Kizuka and Taniguchi 2016). Les glycanes jouent en effet plusieurs rôles dans différentes étapes de la progression tumorale régulant la prolifération, l'invasion, les métastases et l'angiogenèse (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015).

Le glycome désigne l'ensemble des structures glycanes (composition et organisation structurale des sucres) d'un type cellulaire donné. Ce glycome dépend de l'expression d'enzymes de type glycosyltransférase et glycosidase mais aussi de la compartimentalisation des substrats.

Les substrats utilisés dérivent à la fois du glucose extracellulaire et de la dégradation intracellulaire des protéines et lipides glyco-conjugés. Les cellules tumorales ont modifié leur métabolisme énergétique au profit de la glycolyse aérobie (effet Warburg 1956) afin d'obtenir un flux glycolytique important donc un apport en carbone considérable.

Le glucose (Glc) extracellulaire présent à une concentration de 5 mM est transporté dans les cellules où il est rapidement phosphorylé en glucose 6-phosphate (G-6P) par l'hexokinase qui présente un  $K_m$  de 100 nM (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015). Ce G-6P peut alimenter le métabolisme des pentoses phosphates pour la synthèse des nucléotides ou poursuivre dans la voie glycolytique. L'isomérisation du G-6P conduit au Fructose-6P (F-6P) qui peut à son tour poursuivre dans la voie glycolytique ou alimenter la voie de biosynthèse des hexosamines. Cette voie aboutit à la synthèse d'UDP N-acétyl glucosamine (GlcNAc) qui va

servir de substrat majeur pour plusieurs types de glycosylation comprenant les O-glycans, les N-glycans, les glycosaminoglycans et les glycolipides (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015).

### **8.1.1- L'O-glycosylation :**

L'O-glycosylation correspond à l'appariement d'un  $\alpha$ -N-acetylgalactosamine ( $\alpha$ GalNAc) sur l'oxygène du groupement -OH des sérines (Ser) ou thréonines (Thr) d'une protéine cible. Cette réaction catalysée par la ppGalNac transférase a lieu dans le lumen du cis-Golgi pour produire l'antigène Tn. Différents sucres sont ensuite catalytiquement liés à ce Tn-antigène pour générer les motifs O-glycosylés comme les T, ST, Stn -antigènes. Les O-Glycans sont abondants à la surface cellulaire et sur les protéines de la MEC, en particulier sous forme de mucines qui sont des protéines fortement O-glycosylées dans lesquelles la quantité de glucides peut représenter 50% en poids de la molécule (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015).

### **8.1.2- La N-Glycosylation :**

La N-glycosylation, consiste en l'ajout d'un glycan sur l'azote (N) des acides-aminés asparagines (Asn) compris dans la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr, où X est n'importe quel acide aminé excepté la proline.

Ces glycans N-liés comprennent un motif pentasaccharidique conservé de séquence Man $\alpha$ 1-6(Man $\alpha$ 1-3)Man $\beta$ 1-4GlcNac $\beta$ 1-4GlcNac $\beta$ 1-Asn. Ce noyau pentasaccharide est ajouté à la chaîne polypeptidique durant la biosynthèse des protéines dans le réticulum endoplasmique (RE). Différentes modifications s'opèrent dans l'appareil de Golgi. Les changements dans la structure oligosaccharidique des N-glycans ont souvent été observés dans les cancers. En effet, la plupart des récepteurs aux facteurs de croissance à la surface des cellules comprenant l'EGFR (Corporation 2000) et le récepteur au TGF  $\beta$  (Purchios et al. 1988) ou encore les intégrines (Loss, Fibronectin, and Actmty 1994) sont N-glycosylés (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015).

Aux N-glycans se lient les galectines 1 et 3 (Patnaik et al. 2018) à la surface cellulaire, formant des treillis qui permettent aux récepteurs de rester plus longtemps aux membranes (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015). Il a d'ailleurs été démontré que l'oncogenèse permet d'augmenter l'expression des N-glycans avec une plus grande affinité pour les galectines et d'augmenter encore le temps aux membranes des récepteurs (Salдова et al. 2014) (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015). L'inhibition de la voie de biosynthèse des N-glycans est d'ailleurs une cible intéressante pour inhiber la progression du cancer (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015).

- **Dans le RE :**

La voie de biosynthèse des N-glycans commence sur la face cytoplasmique de la membrane du RE avec l'assemblage de sept résidus oligosaccharide liés au dolichol-phosphate. Le dolichol lié aux résidus GlcNac, mannose (Man) et glucose (Glc) sera ensuite transféré sur l'Asn d'un peptide naissant. Vont ensuite avoir lieu plusieurs cycles de processus d'ajouts et d'éliminations de Glc permettant le bon repliement des protéines. Une fois les protéines correctement repliées, les résidus Glc et Man seront éliminés (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015).

L'inhibition du repliement des protéines dans la lumière du RE conduit à un stress de celui-ci. Si le problème de repliement est trop sévère, il induira l'apoptose et la dégradation des cellules endommagées. De ce fait, de nombreuses tentatives ont été faites pour aggraver pharmacologiquement le stress de RE dans les cellules cancéreuses afin d'améliorer l'apoptose et d'atteindre la mort des cellules tumorales (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015).

- **Dans l'appareil de Golgi :**

La glycoprotéine est alors transférée dans le Golgi où elle va être démannosylée par l' $\alpha$ -mannosidase I formant la structure Man<sub>5</sub> GlcNAc<sub>2</sub>, qui est un substrat pour N-acetylglucosamine transférase I (Mgat1). L'ajout du premier résidu GlcNAc catalysé par Mgat1 génère le GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, qui est le substrat pour la Mgat3 ou l' $\alpha$ -mannosidase II en fonction des branchements de glycans nécessaires à réaliser. L' $\alpha$ -mannosidase II élimine deux résidus Man pour former le cœur GlcNAcMan<sub>3</sub> GlcNAc<sub>2</sub> précurseur de N-glycans complexes (Schachter 1986) (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015). Au fur et à mesure que la glycoprotéine progresse dans le Golgi, le noyau GlcNAcMan<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> peut être modifié par une série de Mgat (Mgat-2, 4, et 5) qui ajoute des GlcNAc sur des positions distinctes du noyau trimannosyle générant différentes branches de N-glycans complexes.

Inversement, l'action du Mgat3 sur le produit de la Mgat1 oriente l'ajout de glycans vers les structures « hybrides » de type « high mannose » (Harpaz and Schachter 1980) (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015).

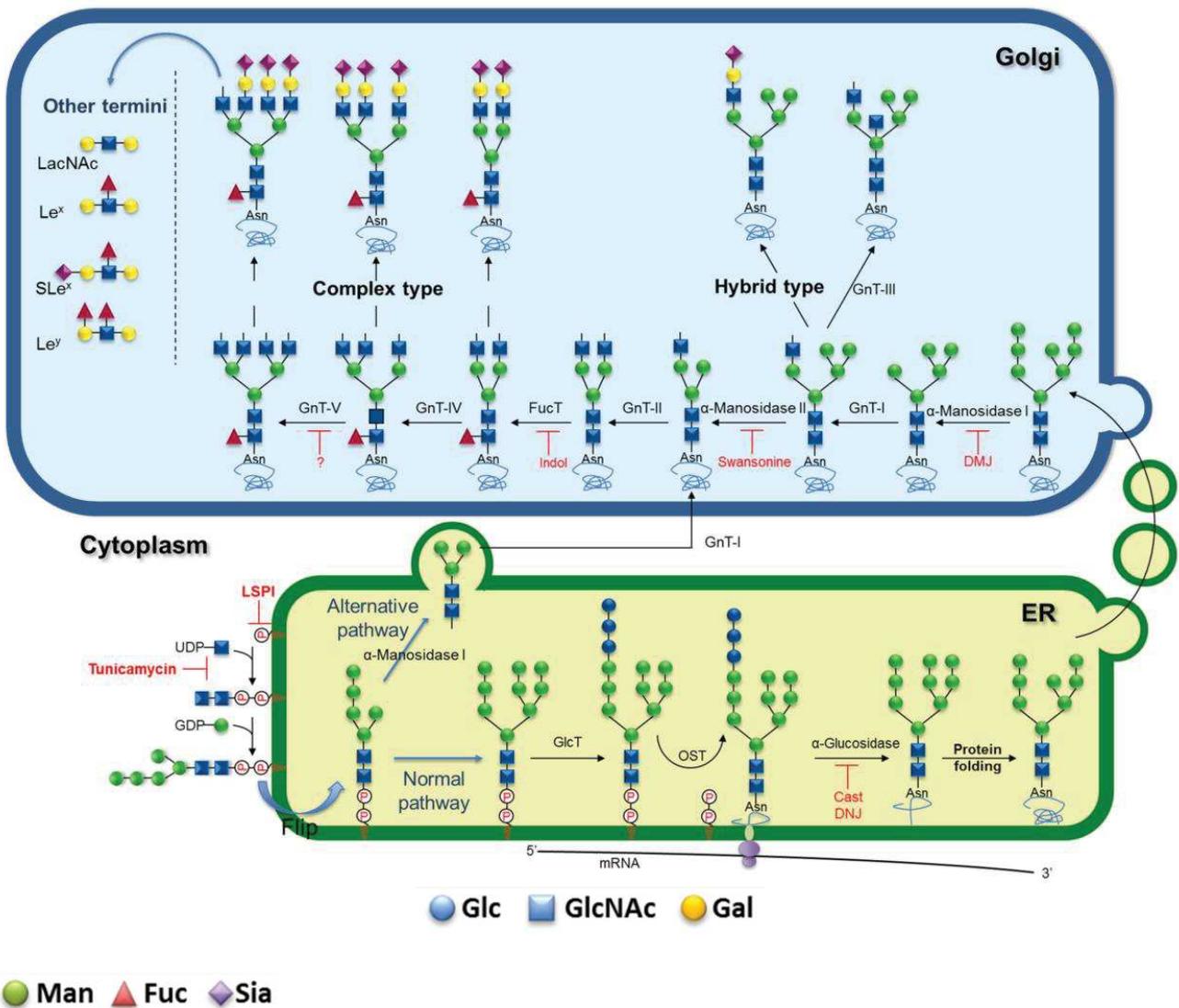


Figure 39 : Biosynthèse et développement des oligosaccharides N-liés débutant dans le RE et continuant dans l'appareil de Golgi, montrant les inhibiteurs et les cibles de l'inhibition des processus. Gal : Galactose, Fuc : Fucose, Sia : Acide Sialique, Man : Mannose, Glc, Glucose, GlcNAc : N-acétylglucosamine, GnT : N-acétylglucosaminyltransferase, GlcT : Glucose Transferase  
 LSPi : Inhibiteurs de la voie des lipides liés aux saccharides, tunicamycine, Cast : castanopermine , DNJ : 1-désoxynojirimycine, DMJ : 1-désoxymannojirimycine, swansonine, Indol : indolizidine (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015).

## 8.2 – Mgat5 :

L'enzyme Mgat5 (N-acetylglucosaminyltransférase 5 aussi connue sous le nom de GnT-V) catalyse l'ajout de  $\beta$ 1,6-GlcNAc qui se trouve sur le Mannose lié en  $\alpha$ -1,6. Elle permet ainsi la formation de structures ramifiées multibranchées avec une signature N-glycans spécifique. Les glycans  $\beta$ 1,6-GlcNAc sont régulés à la hausse dans de nombreux types de cancers (Taniguchi and Kizuka 2015a).

Composée d'une séquence unique de 740 acides aminés, l'enzyme comprend une courte région cytoplasmique, un domaine transmembranaire unique près de son extrémité N-terminale, une vaste «stem region" et un domaine catalytique en C-terminal (Taniguchi and Kizuka 2015a).

La Mgat5 est adressée aux N-glycans bi- et tri antennés ne présentant pas d'acide sialique et de galactose. La présence de galactose inhibe la capacité de la GnT-V à transférer un motif  $\beta$ 1,6-GlcNAc . De plus, le produit de la Mgat3, générant des glycans intercalaires ne sert pas de substrat pour la Mgat5 in vitro (Brockhausen, Narasimhan, and Schachter 1988) (Taniguchi and Kizuka 2015a). Le niveau d'expression de la Mgat5 est régulée par la voie Ras/Raf/Ets et une augmentation de trois à cinq fois plus importante a été observée lorsque cette voie est activée par oncogénèse (Taniguchi and Kizuka 2015a).

### 8.2.1- Mgat5 et cancer :

L'expression de Mgat5 est augmentée pendant la transformation oncogénique et dans l'EMT (Hassani et al. 2017) et son inhibition favoriserait la radiosensibilité (C. Huang et al. 2015). Par conséquent, les cellules cancéreuses présentent généralement une augmentation des branchements  $\beta$ 1,6-GlcNAc (Hassani et al. 2017). La Mgat3 quant à elle, s'est avérée jouer un rôle important dans la suppression des métastases (Pinho et al. 2011) via l'introduction de GlcNAc supplémentaire sur le coeur trimannosyle empêchant ainsi l'addition du  $\beta$ 1-6GlcNAc permettant la formation de ramifications permises par la GnT-V (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015).

L'expression de Mgat5 est corrélée à une augmentation de la migration cellulaire (Lau and Dennis 2008) et à une augmentation de la sensibilité aux facteurs de croissance (Partridge 2004). Ce dernier effet est très probablement dû à l'augmentation de la liaison des galectines aux extensions multilactosaminiques (LacNac) qui peuvent se faire sur les glycans multibranchés. En effet la répétition de la séquence galactose-N-acetylglucosamine favorise le binding des galectines. Ainsi le treillis galectine plus dense renforcera la rétention et ainsi l'effet signalétique des récepteurs de croissance à la surface cellulaire (Lau and Dennis 2008).

De plus, Pinho *et al.* ont démontré que lors du développement du phénotype malin, l'expression de la E-cadhérine s'accompagne d'une augmentation de ses structures N-glycans ramifiées  $\beta$ 1-6, mettant en évidence l'importance des structures des N-glycans de la E-cadhérine dans le développement des tumeurs gastriques. Ils ont observé que les modifications des chaînes N-glycans par la Mgat3 confèrent une stabilité à

la protéine au niveau de la membrane cellulaire, contribuant à la formation de jonctions adhérentes stables. Dans le cas de la Mgat5, les modifications qu'elle catalyse favorisent la déstabilisation des E-cadhérines, la formation de jonctions adhérentes instables et l'inhibition des interactions cellules-cellules, favorisant l'invasivité tumorale (Pinho et al. 2011) (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015).

La Mgat5 affecte également les récepteurs de surface tels que les récepteurs des cytokines, les récepteurs d'adhésion, des inhibiteurs de MMP ou encore des transporteurs (Taniguchi and Kizuka 2015a). La régulation du temps de résidence de ces protéines à la surface cellulaire, est fonction des ramifications du N-glycan pendant la période durant laquelle le récepteur est en surface. Le cycle des récepteurs implique une voie endocytaire via laquelle ceux présents à la surface sont ensuite internalisés dans un compartiment de type endosomal. De là, ils peuvent soit revenir à la surface de la cellule, soit être adressés à un compartiment lysosomal pour dégradation.

La Mgat5 régulerait par exemple les cycles des récepteurs à l'EGF et au TGF- $\beta$  grâce aux liaisons qu'elle rend possibles entre les galectines et la répétition des motifs LacNac. Dans un cadre plus large, l'affinité des galectines pour des glycoprotéines particulières dépend également du nombre de N-glycans exprimés sur cette glycoprotéine (Brockhausen, Narasimhan, and Schachter 1988) (Taniguchi and Kizuka 2015a).

Les souris KO Mgat5 semblent normales à la naissance, mais présentent plusieurs phénotypes adultes aberrants, dont une hypersensibilité des cellules T, une sensibilité auto-immune, une résistance au gain de poids dans un régime alimentaire riche en graisses, une respiration oxydative accrue, une fécondité réduite et des déficiences comportementales (P. Cheung and Dennis 2007). Des souris adultes sans Mgat5 ont également montré une suppression de la progression tumorale dans des modèles d'oncogenèse mammaire induite (Granovsky et al. 2000) et un modèle de tumeur Pten $^{+/-}$  (P. Cheung and Dennis 2007). Dans le modèle de cancer du sein MCF-10A, la surexpression de la Mgat5 a entraîné une augmentation de la population de cellules souches cancéreuses (Guo et al. 2010). En outre, les souris qui surexpriment Mgat5 montrent une expression élevée de celle-ci dans la peau, une augmentation de la migration des kératinocytes et une EMT associée à l'augmentation de la régulation des voies de signalisation de l'EGF (Terao et al. 2011) (Taniguchi and Kizuka 2015a).

### **8.2.2- Implication de la Mgat5 dans l'EMT :**

La sialylation joue un rôle fondamental dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Le caractère multibranché  $\beta$ 1,6 catalysé par la Mgat5 est essentiel à l'EMT et voit ses extensions polylectosaminiques contrôlées par la  $\beta$ -Galactoside  $\alpha$  2,6 sialyltransférase 1 (ST6GAL1) pour renforcer cette EMT.

La ST6GAL1 catalyse l'ajout terminal d'un acide sialique  $\alpha$ 2,6 sur les extensions LacNac. Son niveau d'expression contrôle donc l'étendu des extensions et ainsi l'avidité des galectines aux protéines glycosylées

$\beta$ 1,6. La ST6GAL1 est spécifiquement augmentée pendant l'EMT induite par le TGF- $\beta$ . L'inhibition de la ST6GAL1 inhibe clairement l'EMT accompagnée d'une augmentation de la E-cadhérine et sa surexpression promeut l'EMT (Takahashi et al. 2016a)(J. Lu et al. 2014).

Enfin, il a été démontré que les effets de la Mgat3 sur la migration cellulaire sont dépendants de l'état de sialylation des intégrines (Takahashi et al. 2016a)(J. Lu et al. 2016).

Durant l'EMT induit par le TGF $\beta$ , il est décrit que l'expression de Mgat5 est augmentée, tandis que celle de Mgat3 est largement diminuée (Q. Xu et al. 2012). La surexpression de Mgat3 supprime l'induction de l'EMT par le TGF- $\beta$  et inhibe les métastases de nombreux types de cancer. De ce fait, la Mgat3 est généralement considéré comme un suppresseur de métastases (Takahashi et al. 2016a).

Cependant, certains résultats rapportent une augmentation de l'expression de la Mgat3 dans les hépatomes humains et dans le cancer de l'ovaire (Anugraham et al. 2014) (Takahashi et al. 2016a). Une lignée de cellules cancéreuses ovariennes, a montré une abondance de motif de glycans ayant un GlcNAc au milieu du motif trimannosyle alors que cette lignée a été signalée comme présentant des propriétés hautement métastatiques (Sethi et al. 2014) (Takahashi et al. 2016a). Ces résultats soulèvent la question du rôle mécanistique de la Mgat3 dans la régulation des comportements métastatiques(Takahashi et al. 2016a).

Par conséquent il est également représenté qu'un processus de glycosylation dans le golgi où la Mgat3 et la Mgat5 n'agiraient pas nécessairement en compétition mais pourrait agir de manière séquentielle. L'EMT dans ce contexte-là, serait contrôlée par l'état de sialylation des motif glycosylés (Vasconcelos-dos-santos et al. 2015) (Dennis, Nabi, and Demetriou 2009).

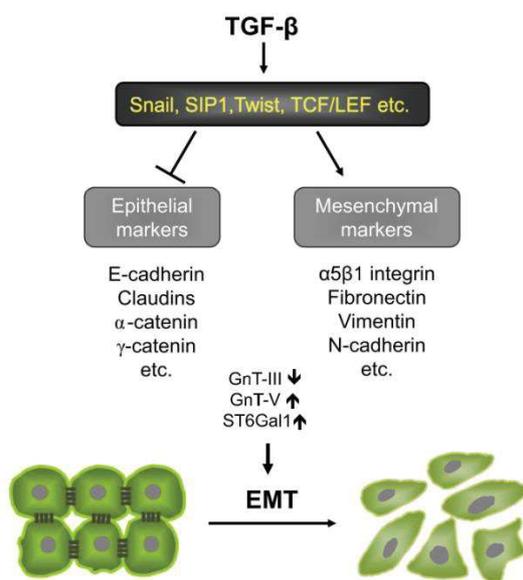


Figure 40 : Changement de N-glycosylation dans le cas d'EMT induite par le TGF- $\beta$ . La GnT-III est diminuée, tandis que GnT-V et ST6GAL 1 ont été régulés à la hausse, jouant donc un rôle important dans l'EMT (Takahashi et al. 2016a).

### 8.2.3 - Galectine 3 :

Les galectines constituent une famille de lectines définies par leur capacité à reconnaître les  $\beta$ -galactosides.

La galectine 3 est une protéine polyvalente de 29 à 35 kDa qui participe à plusieurs processus biologiques : l'adhésion cellulaire, la chimio-attraction, la prolifération et la différenciation cellulaire, le cycle cellulaire, l'apoptose et la progression tumorale. La galectine 3 intracellulaire est principalement une protéine soluble sous forme de monomère. Elle se localise principalement dans le cytosol, mais peut aussi atteindre le noyau et les mitochondries et aller dans l'espace extracellulaire. Une fois en extracellulaire, la galectine 3 peut interagir avec d'innombrables partenaires de liaisons principalement de la MEC ou à la surface cellulaire et joue un rôle clé dans la modulation extracellulaire de la progression tumorale. Le mécanisme de la sécrétion de galectine 3 n'est pas clair, mais il est suggéré qu'elle soit sécrétée par l'intermédiaire d'exosomes (Fortuna-Costa et al. 2014).

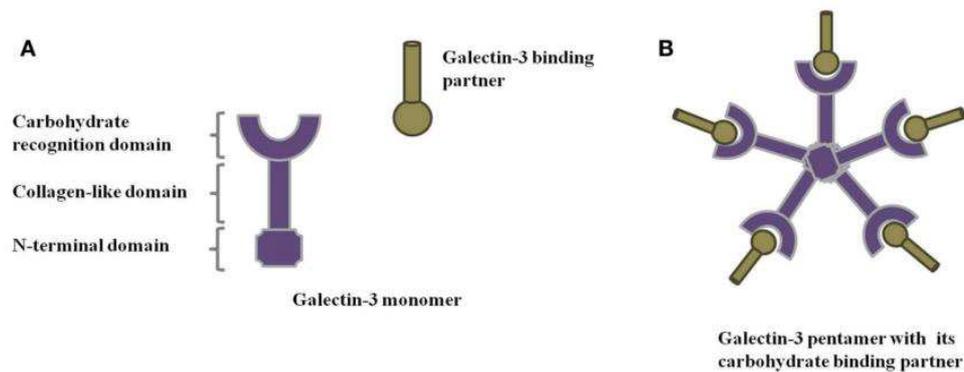


Figure 41 : Structure de la galectine 3. (A) Monomère de galectine-3 et (B) oligomérisation de galectine-3 à travers son domaine N-terminal en présence de ses partenaires de liaison (Fortuna-Costa et al. 2014).

Malgré son expression dans de nombreuses cellules saines et son implication dans plusieurs processus biologiques vitaux, la galectine 3 suscite un intérêt thérapeutique particulier en raison de son rôle important dans la régulation d'un large éventail d'activités des cellules cancéreuses (Dumic, Dabelic, and Flögel 2006). En effet, la galectine 3 est souvent exprimée de façon excessive dans diverses tumeurs malignes et dans de nombreux cas, cette expression modifiée est en corrélation avec le stade de progression de la tumeur, suggérant leur importance dans l'issue de la maladie (Fortuna-Costa et al. 2014). La liaison de la galectine 3 aux glycans branchés  $\beta$ -1,6- sert de médiateur de liaison à de nombreuses glycoprotéines et de nombreux glycolipides dans la membrane cellulaire, y compris les intégrines, CD-98, CD-45, CD-71 ou encore les récepteurs tyrosine kinase transmembranaires glycosylés de l'EGF, du TGF- $\beta$ , du VEGF et d'autres (liste dans le tableau ci-dessous) (Fortuna-Costa et al. 2014). Les changements liés à la Mgat5 dans la glycosylation des protéines et leur densité à la surface des cellules entraînent des altérations dans le regroupement de ces

protéines membranaires via la formation d'un treillis, entraînant des avantages fonctionnels pour les cellules tumorales (Fortuna-Costa et al. 2014).

#### **| Galectin-3 binding partners.**

---

##### **Molecule**

---

1. Carcinoembryonic antigen
  2. Mucin-1
  3. Lysosomal-membrane-associated glycoproteins-1 and -2
  4. Mac-1 and -3
  5. CD-98
  6. CD-45
  7. CD-71
  8. Fibronectin
  9. Collagen IV
  10. Elastin
  11. Laminin
  12. Hensin
  13. N-cadherin
  14. Desmoglein
  15.  $\alpha\beta3$  Integrin
  16. VEGFR-2
  17. NG2 (neuron-glia antigen 2) chondroitin sulfate proteoglycan
  18.  $\alpha3\beta1$ -Integrin
- 

Figure 42 : Tableau des différents partenaires auxquels se lie la galectine 3 grâce à la reconnaissance du motif  $\beta1,6$ -GlcNAc ajouté par la GnT-V (Fortuna-Costa et al. 2014).

Les treillis sont des complexes multivalents de galectines et de glycoprotéines à la surface des cellules et sont importants pour l'organisation des assemblages des glycoprotéines de surface. Les réseaux galectines-glycoprotéines affectent le contrôle des processus biologiques, y compris le renouvellement des récepteurs glycosylés et l'endocytose. Ainsi, la formation du réseaux galectine-glycans peut prolonger l'exposition des glycoprotéines à la surface cellulaire, affectant la réponse aux ligands des récepteurs concernés (Lajoie et al. 2009).

Lorsqu'un monomère de galectine 3 rentre en interaction avec des glycoprotéines ou des glycolipides, d'autres monomères de galectine 3 vont se lier au complexe par leur domaine N-terminal, établissant ainsi des structures pentamériques. Ce complexe d'interaction réticule les glycoprotéines ou glycolipides contenant des glucides, favorisant la formation treillis constitué d'amas organisés de galectine et de glycans et vont moduler les fonctions cellulaires (Garner and Baum 2010) (Fortuna-Costa et al. 2014). La

galectine 3 aide donc à organiser les microdomaines fonctionnels sur la surface cellulaire en assurant une bonne transmission des signaux extracellulaires dans la cellule (Lajoie et al. 2009) (Fortuna-Costa et al. 2014).

#### **8.2.4 - Implication de la *Mgat5* et de la galectine 3 dans la régulation des adhérences :**

De plus en plus de preuves montrent que la N-glycosylation des intégrines joue un rôle important dans leurs formations hétérodimériques et leurs fonctions biologiques. Les intégrines  $\alpha 5\beta 1$ , qui sont des intégrines mésenchymateuses, régulent une multitude de réponses cellulaires et sont l'un des principaux porteurs de N-glycans. Elles possèdent 26 sites de glycosylation N-liés, 14 sur la sous unité  $\alpha 5$  et 12 sur la sous-unité  $\beta 1$ . Ces sites vont jouer des rôles cruciaux dans les fonctions des intégrines, pouvant contribuer au phénotype tumoral. La N-glycosylation sur le domaine de l'hélice  $\beta$  de l'intégrine  $\alpha 5$  est essentielle pour l'hétérodimérisation de l'intégrine et donc son fonctionnement dans les adhérences focales (Isaji et al. 2006) (Takahashi et al. 2016a). De plus, une analyse structurale de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  révèle que la poche de liaison au RGD, un domaine central pour la liaison à la fibronectine, est entourée de plusieurs N-glycans, laissant une surface exposée qui peut promouvoir l'interaction de cette intégrine avec la fibronectine (Nagae et al. 2012), confirmant le fait que la N-glycosylation des intégrines est importante pour leurs interactions avec le microenvironnement. L'expression de l'intégrine  $\alpha 5$  également régulerait négativement la signalisation de l'EGFR et la prolifération cellulaire, ainsi que la localisation dans les radeaux lipidiques et l'internalisation (Hang et al. 2015)(Takahashi et al. 2016a).

La galectine 3 elle aussi contribue à la migration et donc au processus métastatique via la régulation des adhérences et donc de la jonction à la MEC. D'un point de vue mécanistique, elle semble impliquée dans les processus d'invasion et de métastase impliquant des changements au niveau de plusieurs types de protéines d'adhésion cellule-cellule et cellule-MEC, ainsi que dans les voies de signalisation qui contrôlent la dynamique du cytosquelette (Friedl and Alexander 2011) (Fortuna-Costa et al. 2014).

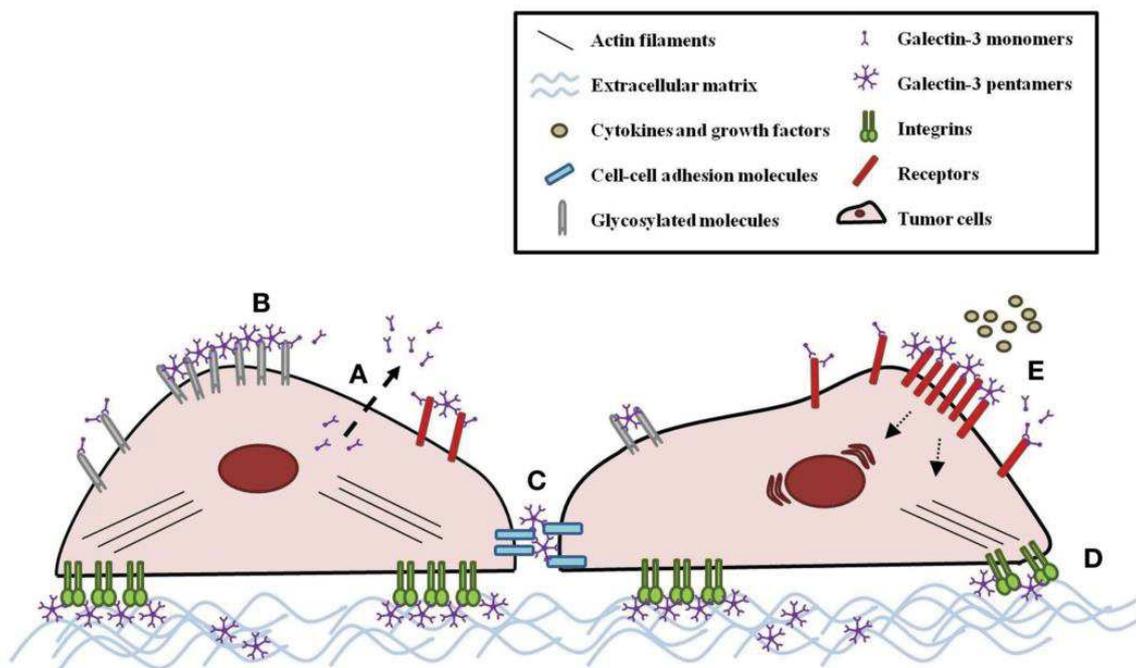


Figure 43 : La galectine 3 module les comportements cellulaires : (A) les monomères de galectines sont sécrétés. Une fois dans l'espace extracellulaire, ils interagissent avec les molécules glycosylées, comme les récepteurs, des protéines d'adhérence cellules-cellules, des intégrines et des molécules de la MEC. Les monomères de galectines 3 se lient les uns aux autres pour former des pentamères via leur domaine N-terminal. (B) Réticulation des glycanes contenant des glucides, favorisant la formation d'un treillis et modulant le comportement des cellules tumorales comme (C) les adhérences (D) pour les migrations. (E) Les treillis de glycanes et de galectine 3 augmente le temps d'exposition des récepteurs à la surface cellulaire et donc affecte la réponse des cellules aux facteurs de croissances et aux cytokines (Fortuna-Costa et al. 2014).

L'expression de la galectine 3 a été montrée comme augmentant la migration et/ou l'invasion dans de nombreux types de tumeurs, tels que le cancer du sein, le mélanome, le cancer du poumon, le sarcome, les cancers gastriques, la leucémie et les glioblastomes *in vitro*. Comme dit précédemment, il a été démontré qu'elle interagit avec les glycoprotéines de la MEC telles que la fibronectine, le collagène IV, l'élastine ou encore la laminine. Par conséquent, le regroupement d'intégrines dépendantes de la galectine 3 favorise leur activation ainsi que celle induite par un ligand (Lagana et al. 2006) (Fortuna-Costa et al. 2014). De plus, la phosphorylation de la caveoline-1 (Cav1) dépendante de la kinase Src augmente le renouvellement des adhérences focales, l'activation de RhoA et la migration des cellules tumorales d'une manière dépendante de la galectine 3. La galectine 3 et la Cav1 phosphorylée (pCav1) agissent en synergie dans ce contexte, car la surexpression d'un mutant Cav1 non phosphorylable ou la perturbation du réseau galectine 3 inhibent la motilité cellulaire (Goetz et al. 2008). Boscher et Nabi en 2013, ont montré que la galectine-3 et la signalisation des intégrines dépendante des pCav1 permettent la stimulation de l'EGF et la réorganisation de l'actine, la migration cellulaire et le remodelage de la fibronectine. Les auteurs ont proposé que le réseau de galectine 3 dépendant de Mgat5 permet la transduction du signal EGF qui déclencherait l'activation de

l'intégrine. Par la suite, les intégrines actives induiraient la phosphorylation Src-dépendante de Cav1 et la signalisation RhoA/ROCK (C. Boscher and Nabi 2013)(Fortuna-Costa et al. 2014).

De plus, l'inhibition de l'expression de la galectine 3 dans une lignée cellulaire de sarcome de souris a montré une augmentation des adhérences stabilisées dû à la diminution de FAK. Ceci a induit une diminution de la vitesse de migration en présence de laminine et ce malgré la présence de niveau similaire d'intégrines. L'expression *de novo* de la galectine 3 sur cette lignée a ensuite restauré le renouvellement ou le « turn-over » des adhérences et donc ré-augmenté la migration sur la laminine. De plus ils ont montré que cette activité migratoire était également dépendante de la voie PI3k et Akt (Melo et al. 2011).

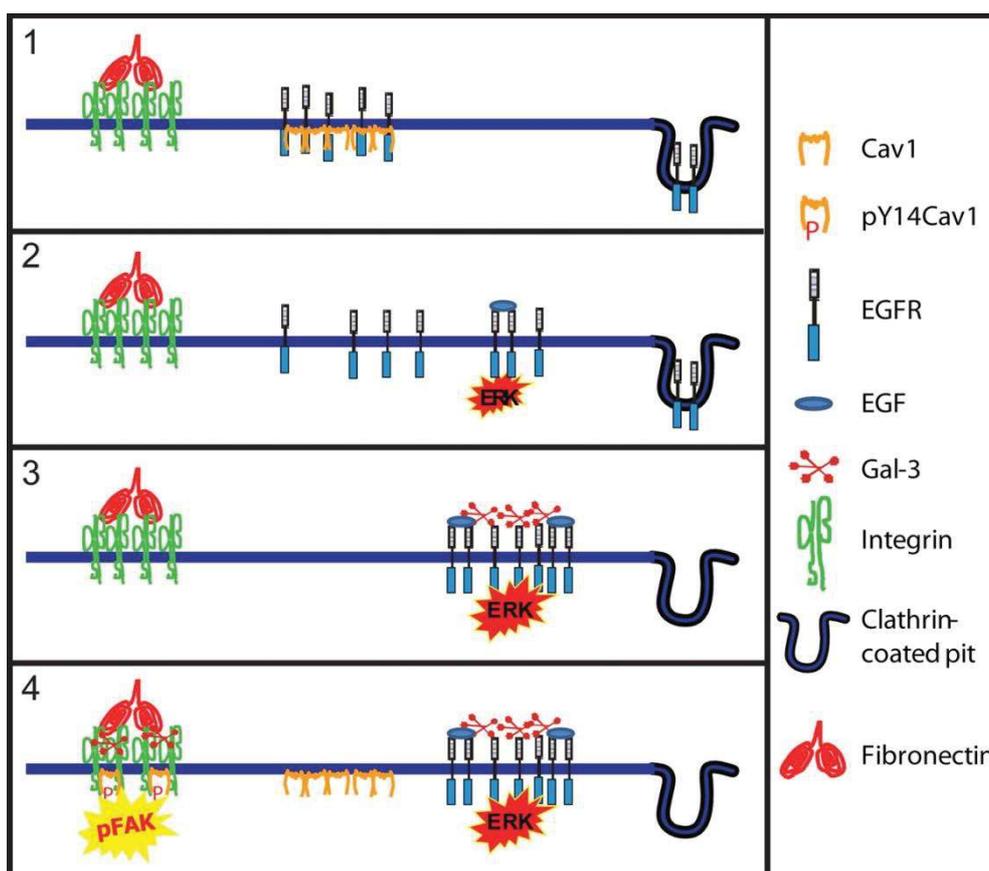


Figure 44 : Caveoline 1 et galectine 3 dans la progression tumorale : (1) Dans les cellules sans réseau de galectine, les échaffaudage de cav1 recrutent les récepteurs et en inhibe la signalisation. (2) la perte de Cav1 permet la signalisation des récepteurs, favorisant la prolifération tumorale. (3) L'expression des N-glycans ramifiés dépendant de la Mgat5, de la Galectine3 et le recrutement des récepteurs au treillis galectine limite la diminution des récepteurs à la membrane due à l'endocytose et donc promeut une signalisation potentielle. (4) La séquestration des récepteurs pas le treillis galectine l'emporte sur l'activité de la Cav1. La galectine 3 et pY14Cav1 travaille ensemble pour promouvoir le renouvellement des adhérences focales et favoriser l'activation de FAK et par conséquent la migration des cellules tumorales. La cavéoline 1 agit donc à la fois comme promoteur et suppresseur de tumeur (Lajoie et al. 2009).

Il est bien établi que la perte des adhérences intercellulaires est corrélée est lié à l'invasion tumorale et aux métastases, car elle permet aux cellules tumorales de s'échapper du site tumoral primaire. Et au cours de la migration, les jonctions intercellulaires sont activement remodelées. Il a été démontré que la galectine 3 extracellulaire peut se lier à la N-cadhérine dans des cellules cancéreuses mammaires murine et que cette association est médiée par les N-glycans générés par la Mgat5. Plus intéressant encore, la liaison de la galectine 3 à la N-cadhérine contribue à la déstabilisation des jonctions cellules-cellules en augmentant le renouvellement de la N-cadhérine et d'autres glyco-conjugués, ce qui pourrait favoriser le processus de migration cellulaire (Cécile Boscher et al. 2012) (Fortuna-Costa et al. 2014).

Par conséquent, les galectines 3 et donc la Mgat5 sont très impliquées dans l'EMT, les fonctions et la dynamique des adhérences focales.

## 9 - Matrice *in vitro* :

Les modèles de culture cellulaire sont principalement basés sur des modèles de culture 2D classique, tel que des boîtes de Petri, des lames de verre ou des plaques multi-puits coatés avec un seul type de protéines de la MEC tel que le collagène, la laminine ou encore la fibronectine dans le but de récapituler l'environnement de la MEC. Malheureusement, ces systèmes ont échoué à mimer les interactions cellules-cellules, cellules-ECM ou la signalisation *vivo*. La conformation ou la topologie des ligands n'est pas respecté, entraînant une altération des comportements cellulaires tels que les adhérences, la structure du cytosquelette, la prolifération, la transduction du signal, la différenciation, la migration, la polarisation et la morphogenèse (Holt, Chamberlain, and Grainger 2011) (Bhatia and Ingber 2014). Par conséquent bien que ces modèles aient permis de faire la démonstration de nombreux processus et qu'ils soient simples d'utilisation et économiques, ils ne permettent pas de récapituler *in vitro* certaines conditions clés retrouvées *in vivo* (Shologu et al. 2016). Pour répondre à ces problématiques de nouveaux systèmes de culture 3D se sont développés, notamment dans le but de mimer le micro-environnement tumoral. De nombreuses méthodes sont utilisées telle que des monocouches bidimensionnelles de lignées cellulaires cultivées jusqu'aux modèles complexes tridimensionnels, ou encore des systèmes de sphéroïdes ou d'organoïdes, des tissus décellularisés, des gels, des fibres ou encore des éponges (Shologu et al. 2016).

Comme décrit précédemment dans la section 6 sur la migration, les cellules établissent des interactions complexes avec le microenvironnement. Ces interactions sont caractérisées par des combinaisons uniques de propriétés biophysiques et biochimiques, capables d'influencer nombre de comportements cellulaires incluant la migration, le maintien à l'état de repos, les capacités d'auto-renouvellement, de différenciation, de dédifférenciation ou de transdifférenciation. Par conséquent de nombreux efforts sont concentrés sur la réalisation de matrice 3D pouvant récapituler au mieux *in vitro* les paramètres observables *in vivo*.

## 9.1- Dimensionnalité :

La géométrie des matériaux utilisés en culture pour les matrices 3D jouent un rôle déterminant dans les comportements cellulaires. Par conséquent ils ont été classés en fonction de leur dimensionnalité :

- **Matériaux dits à 0 Dimension (0D) :**

Un matériau est dit 0D lorsque toutes ses dimensions sont à l'échelle nanométrique. Le large ratio surface/masse des 0D conduit à des propriétés physiques et chimiques uniques. Divers 0D, tels que des nanoparticules d'argent, des quantum dots de semi-conducteurs, des nanoparticules d'hydroxyapatite et des nanoparticules de titane ont été fabriqués. Différentes techniques ont été développées pour les synthétiser avec des formes, tailles et structures bien contrôlées (C. Zhang et al. 2018).

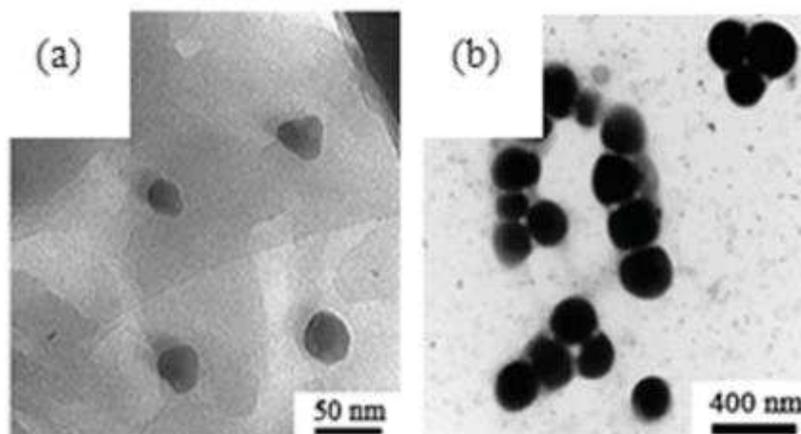


Figure 45 : Image en MEB et MET de matériaux 0D (a) Nanoparticules d'or, (b) Nanoparticules de Sélénium (C. Zhang et al. 2018).

- **Matériaux dits à 1 dimension (1D) :**

Les matériaux 1D sont définis présentant un grand ratio longueur/diamètre et peuvent être subdivisés en deux groupes en fonction de leur taille :

- 1) Les matériaux ayant deux dimensions à l'échelle nanométrique et la troisième dimension à l'échelle micrométrique.
- 2) Les matériaux ayant deux dimensions à l'échelle micrométrique et la troisième dimension à l'échelle millimétrique.

Le premier groupe comprend les nanofibres (NF) et les nanotubes tandis que le second groupe comprend habituellement les microfibrilles.

Les 1D présentent un degré élevé d'anisotropie qui leur confère des propriétés physiques spécifiques (mécaniques, optiques, etc...). Les matériaux 1D peuvent être élaborés par de nombreuses techniques chimiques ou physiques telles que l'électrospinning, l'électrodéposition, la nano lithographie et bien d'autres. Ces matériaux fibreux 1D ont été largement étudiés dans la recherche biomédicale en raison de leurs avantages pour imiter le microenvironnement cellulaire (C. Zhang et al. 2018).

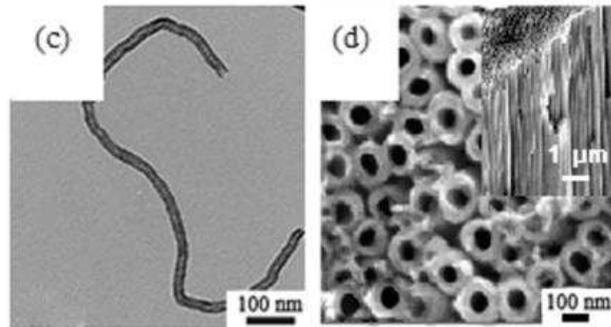


Figure 46 : Image en MEB et MET de matériaux 1D (c) Nanotube de carbone multi parois (multiwall carbon nanotube (MWCNT)), (d) Nanotubes d'oxyde de titane (C. Zhang et al. 2018).

- **Matériaux dits à 2 Dimension (2D) :**

Les matériaux 2D possèdent un ratio diamètre/épaisseur élevé. En général, il existe deux types de 2D :

- 1) Les matériaux nano-structurés 2D avec une dimension dans la gamme nanométrique, par exemple le graphène (GR) et l'oxyde de graphène (GO)
- 2) Les matériaux micro ou macro-structurés 2D avec trois dimensions en dehors de la gamme nanométrique, par exemple des revêtements en couches minces.

Les méthodes de fabrication des biomatériaux 2D nano-structurés, comprennent l'évaporation thermique, l'exfoliation micromécanique. Pour les films et revêtements micrométriques, il existe des méthodes de fabrication sous dépôt physique ou chimique en phase vapeur (la pulvérisation plasma) ou encore en phase solvant (spin-coating, dip-coating par exemple) (C. Zhang et al. 2018).

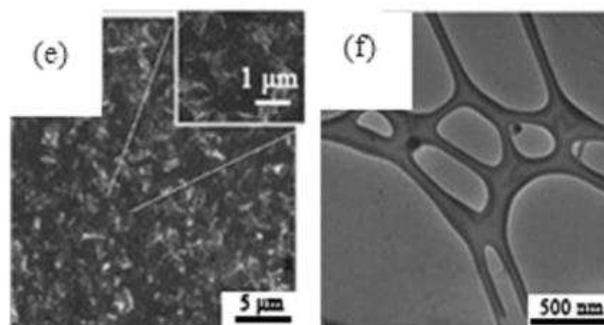


Figure 47 : Image en MEB et MET de matériaux 2D (e) Membrane de GO réticulée, (f) couche de GR (C. Zhang et al. 2018).

- **Matériaux dits à 3 Dimension (3D) :**

Les matériaux 3D sont définis comme un assemblage tridimensionnel de nanomatériaux 1D ou 2D. Cette nanostructuration leur confère des propriétés différentes d'un matériau dit massif. Suite au développement de la culture cellulaire 3D et sur la base de la compréhension du microenvironnement cellulaire, des matériaux biomimétiques reproduisant les caractéristiques de la MEC sont disponibles et ont été utilisés pour réguler efficacement les comportements cellulaires.

Les échafaudages (scaffolds) de polymères et les hydrogels sont des matériaux 3D et pourraient offrir des structures similaires à la MEC, avec des propriétés biochimiques et biophysiques s'en approchant (C. Zhang et al. 2018).

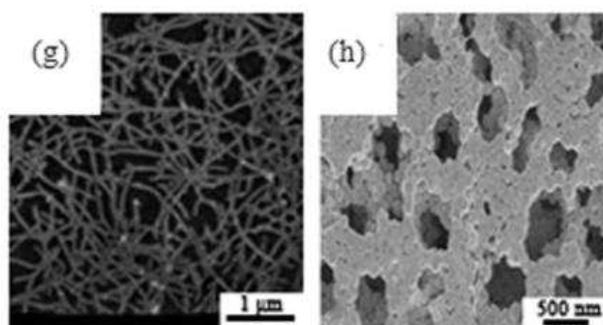


Figure 48 : Image en MEB de matériaux 3D (g) Échafaudage auto-assemblé de nanofibres de polyacrylamide, (h) mousse macroporeuse (C. Zhang et al. 2018).

## 9.2- Différent types de matrices :

Bien que les systèmes 2D classiques de culture (comme la lame de verre ou la boîte de pétri) soient simples, économiques et adaptés au criblage à haut débit, ils présentent de nombreuses limitations quant à la pertinence sur le plan biologique de l'efficacité ou non efficacité des drogues testées et présentent une inadéquation quant aux propriétés chimiques et physiques retrouvés *in vivo* telle que la composition de la MEC, la topographie ou encore la rigidité du substrat. Par conséquent de nombreux efforts sont concentrés autour de la mise au point de nouveaux systèmes 3D pour la culture cellulaire permettant de mimer la composition et l'architecture de la MEC et favorisant une distribution hétérogène des drogues. Mais dans la majorité des cas, les systèmes de cultures 3D présentent de grandes difficultés quant aux analyses complexes (extraction de protéines ou analyse de type -omique). Enfin, il est important que ces matrices possèdent des propriétés physico-chimiques bien contrôlées, qui soient adaptées aux types cellulaires étudiés (Shologu et al. 2016).

### 9.2.1- Tissus décellularisés

Les tissus décellularisés sont utilisés comme moyen de créer un microenvironnement tumoral en imitant le plus fidèlement possible l'organisation tissulaire et la composition de la MEC d'origine. Elles sont utilisées pour étudier la migration, la prolifération ou encore la réponse médicamenteuse (Shologu et al. 2016).

Par exemple, les tissus pulmonaires décellularisés en tant que modèle *in vitro* du cancer du poumon humain (testé avec des lignées de cancer du poumon humain H1299, H460 et A549) ont montré un développement de nodules incorporés et organisés autour du système alvéolaire, avec des configurations de croissance similaire à celles observées dans les cancers du poumon trouvés chez l'humain (Linte et al. 2015) et semblent sécréter plus de MMP que dans les cultures 2D (Mishra et al. 2012) (Shologu et al. 2016).

Malgré les avantages des tissus décellularisés, la difficulté d'obtenir des greffons de tissus intacts a déclenché des recherches sur d'autres modèles, comme les couches cellulaires décellularisées. Néanmoins, l'utilisation de ce type de matrice manque de standardisation et de reproductibilité due aux difficultés d'élimination des restes cellulaires après décellularisation, sans endommager ou perturber l'organisation de la MEC, des ligands de surface ou de l'architecture et de l'organisation des microstructures. De plus, ce type d'approche nécessite des temps de culture prolongés pour développer le système 3D, souvent associé à des dérives de cellules (Shologu et al. 2016).

### 9.2.2 - Hydrogels :

Les hydrogels sont des réseaux diffus à base d'eau constitués de chaînes de polymères hydrophiles. Les modèles d'hydrogels peuvent être fabriqués avec des matériaux naturels ou synthétiques. Leur flexibilitéet

leur densité peuvent être facilement contrôlées par réticulation pour imiter les propriétés bio-physiques (comme la rigidité) des MEC tumorales (Shologu et al. 2016).

Les hydrogels à base de matériaux naturels peuvent être réalisés à partir de protéines de la MEC comme le collagène ou de glycosaminoglycans comme l'AH. Ils sont actuellement très utilisés en laboratoire car facile à réaliser.

Comme décrit précédemment, la rigidité impacte fortement l'invasion tumorale (Shologu et al. 2016). Pour permettre ce type d'observation, il est possible de réaliser des variations de la concentration des protéines dans les polymères naturels ce qui modifie les propriétés mécaniques de l'hydrogel, mais ce qui va également modifier considérablement la densité des adhérences et par conséquent le comportement des cellules, indépendamment de la rigidité modifiée. Ceci ne permettra donc pas de différencier l'impact des propriétés physiques de celui des propriétés chimiques sur les comportements cellulaires (Shologu et al. 2016).

Des hydrogels complètement synthétiques quant à eux peuvent être produits de façon reproductible en grande quantité avec des propriétés plus modulables que les hydrogels naturels et peuvent être utilisés pour mettre au point des systèmes complexes *in vitro* permettant de moduler simultanément la rigidité et le confinement (Shologu et al. 2016).

Des hydrogels à base de PEG (poly éthylène glycol) de rigidité variable et enrobés de peptides bioactifs présentant des motifs RGD (Arg-Gly-Asp) ont été utilisés comme modèles pour différents types de cellules cancéreuses. Il a été vu que ces séquences peptidiques influencent positivement l'adhérence, la dégradation et le remodelage des matrices via les MMP, alors que leur rigidité influence la morphologie cellulaire, la prolifération et la survie. Néanmoins, la forte teneur en eau et le taux de dégradation rapide des hydrogels faiblement réticulés et ainsi que la faible teneur en eau, le faible taux de dégradation, la cytotoxicité élevée et la faible diffusion des hydrogels hautement réticulés ont orienté les recherches sur des modèles alternatifs basés sur des scaffolds (Shologu et al. 2016).

### **9.2.3 - Fibres :**

Les fibres électrospinnées ont été utilisées pour une large gamme d'applications dans les domaines de l'environnement, l'énergie et la biologie. L'interconnectivité des fibres permet d'obtenir un réseau poreux considéré comme idéal dans diverses études sur le cancer. En effet, elles imitent l'architecture et la morphologie du microenvironnement tumoral, présentent une topographie pouvant aider à la progression tumorale et peuvent permettre la réalisation de stimuli biochimiques pour mieux reproduire le microenvironnement tumoral (Shologu et al. 2016).

Des fibres de silicate ont été testées sur divers types de cellules cancéreuses comme les lignées DU145 du cancer de la prostate, ou encore celles du sein MCF-7 et MDA-MD-453, du poumon A549, des ovaires OVCAR-3, du colon HT-29 et DLD-1, du col de l'utérus HeLa, du foie HepG2 et Huh-7, et du pancréas SUIT-2 et MIA PaCa-2 (Shologu et al. 2016). La résistance à la mitomycine a été considérablement augmentée dans les cultures 3D de fibres de silicate pour les cellules HT-29, HepG2, SUIT-2 et les MDA-

MB-453. La résistance à la camptothécine a également été augmentée pour les cellules HT-29, HepG2 et MDA-MB-453 et la résistance au sorafénib pour les Huh-7 (Yamaguchi et al. 2013). La résistance à la doxorubicine était globalement augmentée en 3D (Shologu et al. 2016).

Des fibres à base de collagène électrospinnées ont été utilisées avec des cellules C4-2B (cancer de la prostate) pour récapituler la progression tumorale. Dans ces conditions de culture les C4-2B se sont révélées résistantes au docétaxel et à la camptothécine (Hartman et al. 2010).

Les fibres de soie électrospinnées chargées en cellules HN12 (carcinome épidermoïde métastatique) induisaient pour cette lignée une prolifération cellulaire, une infiltration et une chimiorésistance comparables à celles observées lors de xénogreffes sur de souris (Bulysheva et al. 2013).

Parmi les différents polymères disponibles, le poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) a été largement utilisée dans le développement de modèles tumoraux *in vitro*, étant donné son faible taux de dégradation et sa haute cytocompatibilité. Ces fibres de PCL ont été utilisées pour récapituler *ex vivo* le microenvironnement du cancer de l'os (sarcome d'Ewing). Dans ce modèle les cellules TC-71 ont montré plus de résistance à la doxorubicine que les cellules cultivées seules en monocouche traditionnelle (Fong et al. 2013).

Les études sur l'orientation et l'alignement des fibres ont démontré quant à elles que les cellules de tumeur mammaire de souris H605, NMuMG épithéliale mammaire et les cellules humaines de cancer du sein MCF-7 cultivées sur des fibres alignées présentaient une morphologie allongée, de type fuseau et une augmentation de l'expression des gènes CK14, Sma, Snail et TGF- $\beta$ 1 suggérant une configuration EMT des cellules (Saha et al. 2012).

Quand les lignées cellulaires sont déposées sur des fibres alignées versus enchevêtrées, les différences de motilité cellulaire sur des fibres de PCL apparaissent, indiquant le potentiel de ce modèle pour évaluer le comportement métastatique et le caractère invasif de la tumeur du fait des différences de comportement migratoire représentés (Nelson et al. 2014).

Néanmoins, bien que ce modèle ait permis de faire la démonstration de nombreux comportements cellulaires et mis en évidence des différences de résistance à de nombreux anti-cancéreux entre la 2D et la 3D, il présente des limitations. L'électrospinning offre un contrôle de la macroporosité et de la forme des pores, mais la microporosité physiologique demeure un défi technologique. De plus, les échafaudages de fibres électrospinnées offrent une mauvaise infiltration cellulaire, une croissance restreinte et ne semblent pas adaptés pour la migration. Elles montrent une distribution non uniforme des cellules, une probabilité augmentée d'être cytotoxiques, une résistance mécanique inadéquate et une production lente (Shologu et al. 2016). De plus, pour celles présentant une macroporosité, elles ne permettent pas de retrouver les propriétés de confinement observées *in vivo*.

### 9.2.4 - Eponges :

De la même manière que les différentes catégories de matrices présentées précédemment, les éponges sont des matrices 3D qui, lorsqu'elles ont été étudiées en culture avec des cellules cancéreuses, ont permis l'observation d'une augmentation des caractéristiques tumorales.

Par exemple, des éponges de chitosan ont été utilisées pour la culture des cellules de cancer du sein (MCF-7), qui ont alors sécrété des quantités plus élevées de lactate par rapport aux cellules cultivées en 2D (Dhiman, Ray, and Panda 2005) (Shologu et al. 2016). Les lignées de cellules pulmonaires A549, H460 et des cellules souches du cancer du poumon H1650 sur le système de culture AlgiMatrix1 présentaient une augmentation des résistances aux médicaments comme la camptothécine, le docetaxel, la doxorubicine, le 5-fluorouracile, la gemcitabine ou encore le cisplatine par rapport aux cultures en monocouches 2D conventionnelles (Godugu et al. 2013) (Shologu et al. 2016).

Lorsque des échafaudages chitosan-AH ont été utilisés comme système modèle pour augmenter le développement de sphéroïdes de cellules cancéreuses A549 et H1299 (cancer du poumon), des niveaux accrus de caractéristiques de cellules souches, des marqueurs de l'EMT, des interactions promouvant l'invasion et une résistance au cisplatine et au méthotrexate par rapport aux cellules en culture 2D (Y. J. Huang and Hsu 2014) (Shologu et al. 2016).

Des modèles d'éponges chitosan-alginate ou de collagène ont également été testés. (Florczyk et al. 2012) (L.-J. Liu et al. 2014). Les éponges de chitosan-alginate soutiendraient la croissance tumorale des cellules de cancer de la prostate, favoriseraient la formation de sphères et maintiendraient une croissance prolongée en culture (Florczyk et al. 2012).

Les éponges de collagène quant à elles, amélioreraient la prolifération des cellules cancéreuses du poumon (ACC-83), l'EMT, l'expression des MMP et des marqueurs de cellules souches cancéreuses comme SOX-2 et OCT-4 et présenteraient une plus grande résistance aux anticancéreux que lors de cultures de cellules en monocouche 2D classique (L.-J. Liu et al. 2014) (Shologu et al. 2016).

Cependant, ces matrices en éponges offrent peu de contrôle sur la rigidité, la porosité et le taux de dégradation (Shologu et al. 2016). De plus ces modèles ne semblent pas bien adaptés pour des études de migration.

### 9.3 - Modèles de migration :

Dans le but de réaliser des études migratoires sur des cultures primaires de cellules souches de glioblastome, nous avons réalisé de nouvelles matrices 3D de nanofibres de polyacrylonitrile (PAN) électrospinnées. Pour observer l'impact de la modulation des propriétés mécaniques sur la migration ainsi que l'effet de la présence de protéines de la MEC sur la modulation de leurs comportements migratoires, nous avons respectivement renforcé les nanofibres avec des nanotubes de carbone (MWCNT) et les avons fonctionnalisées avec de la laminine (LN).

Le choix s'est arrêté sur les fibres électrospinnées du fait de la possibilité qu'offre ce système d'étudier la migration. Le PAN quant à lui est un matériau qui jusqu'ici n'avait été que peu utilisé dans le cadre de la biologie cellulaire et des matrices 3D de copolymères dérivés du PAN fonctionnalisé (Morelli et al. 2012) ou des fibres de carbone préparées par carbonisation de fibres de PAN (Mirzaei et al. 2016), mais dès nos premières utilisations, il mit en évidence des capacités prometteuses en termes de microporosité, de biocompatibilité et d'analyse complexe, répondant ainsi aux limitations que présentaient les systèmes fibres précédents. De plus, sous la forme de copolymère acrylonitrile/vinyle acétate et avec un revêtement de poly-L-lysine, il est décrit comme permettant l'induction de réseaux neuronaux fonctionnels et complexes (Morelli et al. 2012).

### **9.3.1 - Electrospinning :**

L'électrospinning ou l'électrofilage est reconnu comme la technique la plus adaptée pour la fabrication en continu de nanofibres dont le diamètre peut varier de quelques micromètres à plusieurs dizaines de nanomètres (Bhardwaj and Kundu 2010). Les nanofibres issues de l'électrospinning sont décrites comme présentant une taille de maillage ajustable, une flexibilité quant à leurs fonctions de surface et une bonne perméabilité (Fakirov 2016). Comme décrit précédemment, les nanofibres issues de ce processus semblent être un candidat idéal pour des applications en biologie (l'ingénierie tissulaire, l'administration de médicaments, la mise au point de pansements ou encore pour le contrôle de libération de molécules) (Fakirov 2016).

#### **a) Principe :**

Dans un processus classique d'électrospinning, trois composantes sont essentielles : une seringue remplie d'une solution de polymère, un système à haute tension permettant de fournir la force électrique requise pour l'étirement du jet de polymère ainsi qu'un collecteur, plan ou rotatif, permettant de recevoir les tissus de fibres (Fakirov 2016).

Tout d'abord, la solution de polymère est introduite dans un tube capillaire via une seringue. Un potentiel électrique élevé (de 10 à 50 kV par exemple) est appliqué entre la gouttelette de solution de polymère à l'extrémité de l'aiguille et un collecteur. En augmentant l'intensité du champ électrique, la goutte de solution de polymère devient hautement polarisée, entraînant sa déformation jusqu'à une forme conique limite, appelée "cône de Taylor". Au-delà de cette limite, un jet de solution est spontanément éjecté de la goutte dans une direction correspondant aux lignes de champ électrique, en direction du collecteur métallique (Fakirov 2016).

Avant d'atteindre le collecteur, le jet subit une série d'instabilités et de flexions reliée à l'évaporation complète du solvant. Le polymère est finalement recueilli sur le collecteur sous forme de structures fibreuses étirées (Hu et al. 2014) (Fakirov 2016). Le procédé typique d'électrospinning permet de créer des fibres

longues et continues. La modulation des conditions opératoires permet d'obtenir d'autres types de fibres avec des structures spécifiques comme des structures core/shell, poreuse, creuse etc .(Fakirov 2016).

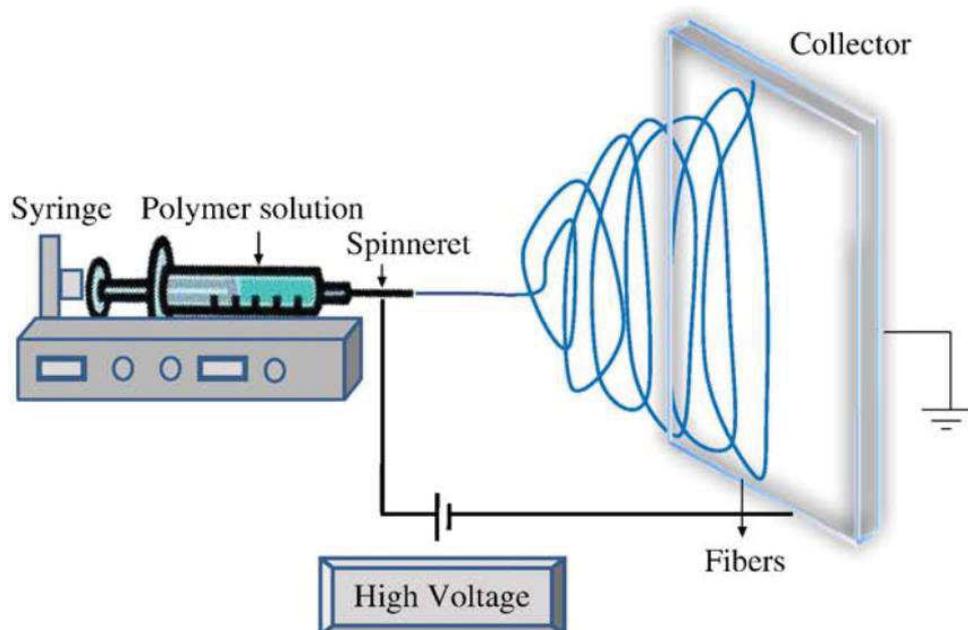


Figure 49 : Configuration de base pour l'électrospinning (Bhardwaj and Kundu 2010)

### b) Alignement des fibres :

Les fibres électrospinnées sont généralement collectées sur un collecteur plan immobile sous forme de tissus dans lequel les fibres ont une orientation relative aléatoire dans le plan de collecte. Cependant, il est possible de réaliser des structures alignées et ordonnées en utilisant un collecteur mobile. Ces tissus de fibres alignées sont utilisés pour des applications en biologie, qui comme décrit précédemment favorisent la croissance cellulaire le long d'une direction préférentielle. Le collecteur mobile le plus couramment utilisée est un tambour (Fakirov 2016).

Le degré d'alignement et le diamètre des fibres peuvent être adaptés et ajustés en fonction de la vitesse de rotation du tambour (Sundaray et al. 2004). Selon les systèmes utilisés, la vitesse seuil pour l'alignement peut varier. En augmentant la vitesse du collecteur, la rupture des fibres peut se produire en raison des forces de traction exercées. Alors qu'à une vitesse plus lente, un mauvais alignement peut avoir lieu (Fakirov 2016).

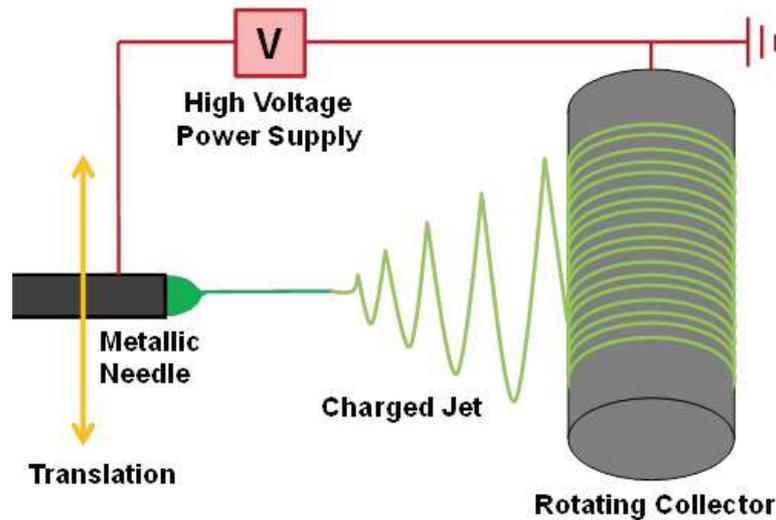


Figure 50 : Configuration pour l'électrospinning avec un collecteur rotatif pour fournir des fibres alignées.

### c) Effets des différents paramètres sur l'électrospinning :

Le processus d'électrospinning est régi par de nombreux paramètres, classés globalement en paramètres de solution, de procédés ou en paramètres ambiants. Les paramètres de la solution comprennent la viscosité, la conductivité, le poids moléculaire et la tension superficielle de la solution. Les paramètres du procédé comprennent le champ électrique appliqué, la distance entre la pointe et le collecteur, et le débit. Les paramètres ambiants englobent l'humidité et la température. Chacun de ces paramètres affecte significativement la morphologie des fibres obtenues par électrospinning et via la manipulation adéquate de chacun d'entre eux, il est possible d'obtenir des nanofibres de morphologie et de diamètre désiré (Bhardwaj and Kundu 2010).

- **Paramètres de solution :**

**La concentration :** Pour la formation des fibres, une concentration optimale de solution est requise. A faible concentration un mélange de perles et de fibres est obtenu, alors qu'à haute concentration il est possible d'obtenir plus de fibres avec des diamètres plus grands dus à une plus grande viscosité (Bhardwaj and Kundu 2010).

**Poids moléculaire :** Le poids moléculaire a un effet significatif sur les propriétés rhéologiques et électriques telles que la viscosité, la tension de surface, la conductivité ou encore la constante diélectrique (Bhardwaj and Kundu 2010). L'électrospinning avec des solutions de haut poids moléculaires a tendance à former des fibres de large diamètre plutôt que des perles alors que les faibles poids moléculaires ont tendance à former des perles.

**La viscosité :** La viscosité de la solution joue un rôle important dans la détermination de la taille des fibres et de leur morphologie. Il a été constaté qu'avec une très faible viscosité, il n'y a pas de formation

continue de fibres et qu'avec une viscosité très élevée, il est difficile d'éjecter les jets de la solution de polymère, nécessitant donc une viscosité optimale pour l'électrospinning (Bhardwaj and Kundu 2010).

- **Paramètres de procédés :**

**Tension appliquée :** L'application d'un voltage sur la solution à électrospinner est cruciale pendant le processus. Comme dit précédemment, ce n'est qu'après le dépassement de la tension de déformation limite (cône de Taylor) seuil que la formation des fibres a lieu. Une tension plus élevée provoque un plus grand étirement de la solution entraînant une réduction du diamètre des fibres et une évaporation rapide du solvant. A tension très élevée, il y a une plus grande probabilité de voir la formation de perles (Bhardwaj and Kundu 2010).

**Débit :** Un débit plus faible d'alimentation en polymère est souhaitable, car le solvant aura suffisamment de temps pour s'évaporer. Des débits élevés entraînent des fibres perlées en raison du faible temps de séchage avant d'atteindre le collecteur (Bhardwaj and Kundu 2010).

**Collecteur :** Lors de la mise en œuvre du procédé, le collecteur sert de substrat conducteur où les nanofibres sont collectées. Différentes géométries de collecteurs peuvent être employées en fonction de l'application envisagée. (Bhardwaj and Kundu 2010).

**La distance au collecteur :** une distance minimale est nécessaire pour donner aux fibres suffisamment de temps pour sécher avant d'atteindre le collecteur, sinon à distance trop proche ou trop lointaine, il peut y avoir formation de perles (Bhardwaj and Kundu 2010).

- **Paramètres ambiants :**

Il y a un impact de la température sur l'électrospinning, notamment dû au lien étroit entre la viscosité et la température. A des températures plus élevées, les fibres seraient plus fines car la viscosité diminue. De plus l'humidité tout comme la température aurait un impact sur l'évaporation des solvants durant l'électrospinning (Bhardwaj and Kundu 2010).

### **9.3.2- Polyacrylonitrile (PAN) :**

Le PAN est un polymère thermoplastique de formule  $(C_3H_3N)_n$ . Il est soluble dans des solvants polaires comme le DMSO, le DMF (diméthylformamide), le DMAc (diméthylacétamide), le diméthylsulfone, le tétraméthylsulfide et les solutions aqueuses de certains sels minéraux (Nataraj, Yang, and Aminabhavi 2012).

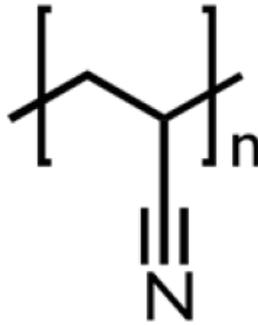


Figure 51 : Unité répétée de PAN.

Historiquement, le PAN a été longuement étudié en chimie des matériaux pour sa capacité à être stabilisée puis carbonisée afin de fabriquer des objets en carbone de forme complexe. Des fibres de carbone dites ex-PAN ont ainsi dès les années 50s contribué au succès des missions spatiales (X. Huang 2009)(Vakili, Yue, and Fei 2008). LA transformation du polyacrylonitrile en carbone comprend plusieurs étapes.

Le polymère est tout d'abord stabilisé par un traitement thermique et chimique sous air entre 200 et 300 C°. Durant cette stabilisation, la structure des fibres va changer et devenir infusible, réticulée. Les réactions majeures qui vont alors se dérouler pendant cette étape sont la cyclisation, la déshydrogénation, l'aromatisation et l'oxydation du polymère (Houtz 1950).

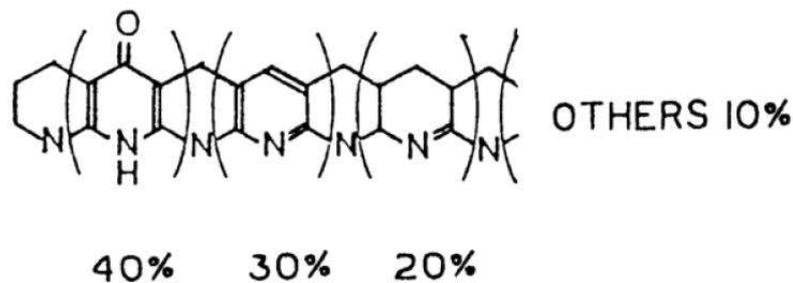


Figure 52 : Structure du PAN après stabilisation (Houtz 1950).

Ensuite l'étape de carbonisation se déroule dans la gamme de température entre 1000°C et 1500°C sous atmosphère inerte. Durant cette étape, le matériau va subir des réactions de déshydrogénation, puis de dénitrogénéation entre 600 et 1300°C. Au-delà de 1300°C, le squelette carboné va se réorganiser et cristalliser. Ce processus va permettre d'obtenir un matériau à base de carbone possédant au final 50 à 57% de la masse de PAN original (Nataraj, Yang, and Aminabhavi 2012). Il faut noter également que les propriétés

mécaniques du matériau augmentent progressivement lors de la stabilisation puis de la carbonisation (Nataraj, Yang, and Aminabhavi 2012) (Arshad, Naraghi, and Chasiotis 2011).

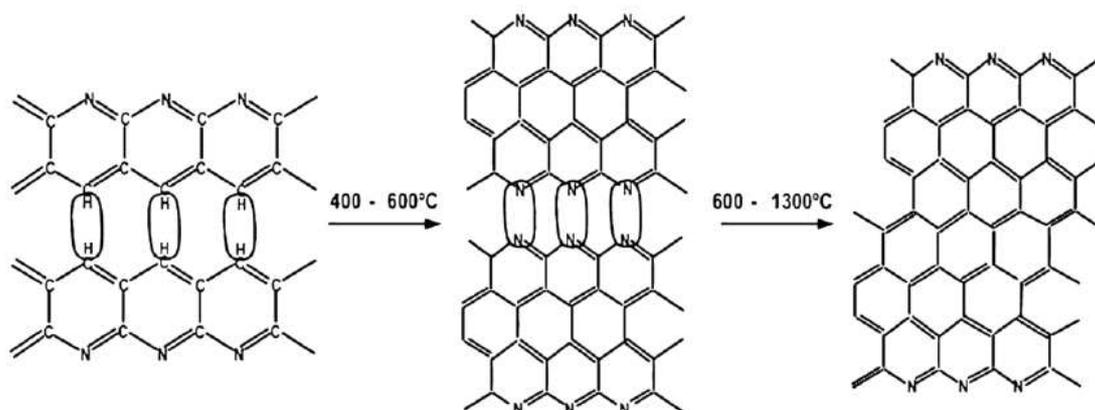


Figure 53 : Transformation subi par le PAN stabilisé lors de carbonisation. De 400 à 600 °C l'étape de déshydrogénation va avoir lieu et de 600 à 1300°C c'est l'étape de dénitrogénéation (Zhu et al. 2002).

Dans le cas de notre étude, il est important que le matériau soit stabilisé afin de supporter les étapes de stérilisation par autoclavage sans se déformer et qu'il présente des fonctions de surface susceptible de favoriser des interactions avec des composants de la MEC et les cellules. Nous avons donc arrêté le processus de stabilisation à une température modérée et avant carbonisation.





# Objectifs

---

La migration est un obstacle majeur aux thérapies classiques contre le glioblastome qui visent la prolifération et, conduisent inéluctablement vers une issue fatale. Malgré des traitements qui combinent chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie, l'espérance de vie est seulement de quinze à dix-huit mois. Durant leur migration, les cellules de glioblastome rencontrent de nombreux signaux provenant du microenvironnement, promouvant ou inhibant la migration et leurs mécanismes d'action restent encore assez peu connus.

Au vu de la complexité de ces processus migratoires, il est donc essentiel de disposer de modèles 3D *in vitro* étant capables de récapituler les propriétés physico-chimiques de l'environnement observées *in vivo* en contrôlant finement et individuellement les paramètres. Ceci va permettre une meilleure compréhension des processus fondamentaux de la migration et de ses différentes configurations issues d'un environnement contrôlé mimant les propriétés physico-chimiques de la MEC et des structures biologiques. Une matrice 3D adéquate peut également permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, ainsi que d'évaluer des molécules anti-migratoires dans un environnement 3D pertinent.

Par conséquent, le premier objectif de ces travaux a donc été la mise au point d'une nouvelle matrice 3D biocompatible ayant pour but de mimer *in vitro* certaines propriétés physiques ou chimiques observables *in vivo* et sur laquelle il soit possible de réaliser des analyses complexes. La modification indépendante de chacun de leurs paramètres a permis l'étude des différents comportements migratoires provoqués par ces modifications et l'identification des mécanismes impliqués.

Dans cette optique, avant mon arrivée en thèse, l'équipe du Pr Norbert Bakalara et l'équipe du Pr David Cornu, avaient initié la mise au point de nouvelles matrices 3D fibrillaires mimant la configuration des voies de migrations préférentielles des cellules de glioblastome (comme le corps calleux) (Cuddapah et al. 2014b) ainsi que la configuration fibrillaire de la MEC. Ces matrices étaient fabriquées via un processus d'électrospinning de polyacrylonitrile (PAN) qui subit ensuite une stabilisation thermique non classique aboutissant à une chimie de surface inédite et à de la biocompatibilité.

Comme décrit dans l'introduction, les systèmes 3D de fibres sont décrits dans la littérature comme présentant plusieurs problèmes tels qu'une faible infiltration cellulaire, autorisant peu de migration en 3D, une distribution non-uniforme des cellules, une cytotoxicité due au post traitement chimique et aussi une résistance mécanique trop élevée (Shologu et al. 2016). L'un des challenges était donc l'optimisation de ce type de système 3D permettant de dépasser ces limitations.

Comme les cellules souches de glioblastome (GSC ou GIC pour Glioma Stem cells ou Glioma Initiating Cells) sont responsables de la récurrence à distance, ce sont elles qui ont été sélectionnées pour réaliser nos différentes études migratoires. Par conséquent, tous les travaux ont été réalisés à partir de cultures primaires de cellules souches de glioblastome issues de patients et cultivées en neurosphères. Elles ont été isolées à l'Hôpital Gui de Chauliac au CHU de Montpellier par le Pr Hugues Duffau et le Dr Luc Bauchet et au CHU Rangueil de Toulouse par le Pr Emmanuelle Uro-Coste. Dans les différentes études, nous avons tiré avantage de pouvoir cultiver ces GSC sous forme de « neurosphères » dans un milieu sans sérum. Ces neurosphères ont

ensuite été déposées sur les tissus de nanofibres avant de les laisser migrer durant 5 jours, de sorte à pouvoir en observer les comportements migratoires à partir d'un point défini et dans un processus directionnel.

La première étude a consisté en la caractérisation de la migration sur ce système en présence et en absence de laminine sur des fibres alignées et enchevêtrées de façon à observer l'impact des propriétés chimiques du microenvironnement et de la guidance de contact (ou haptokinesie) sur la migration des GSC (Haeger et al. 2015). Ceci a eu pour but de caractériser les interactions cellules-MEC durant la migration, leurs expressions protéiques et de réaliser ensuite un comparatif avec les comportements observés *in vivo*.

Lors du dépôt des neurosphères sur les fibres, le réseau tridimensionnel s'est présenté comme un système poreux idéal pour la migration, présentant une excellente infiltration cellulaire. Les GSC vivent, adhèrent et migrent sur ce support démontré comme très prometteur pour la culture cellulaire.

Enfin, il a été possible de réaliser une étude transcriptomique comparative entre les conditions NS, 2D et 3D, en présence et en absence de laminine, permettant d'analyser les différences d'expression de gènes issus de ces modèles de culture.

La deuxième étude quant à elle, a consisté en la modulation des propriétés mécaniques des fibres, via l'ajout de nanotubes de carbone dans le polymère avant électrospinning, permettant d'étudier l'impact de la rigidité sur la migration sur l'EMT et sur les adhérences focales. Suite à l'induction d'une véritable invasivité des GSC à une rigidité que l'on a nommée « optimale » (Bangasser et al. 2017b), nous avons muté, via la technique CRISPR Cas9, le gène de la MGAT5 (GnT-V) impliqué dans l'EMT et les adhérences focales, de façon à mettre en évidence l'implication de la glycosylation dans la mécano-transduction, ce qui n'a jusque-là, jamais été observé.

Pour finir, la mise au point de ce système 3D biocompatible de nanofibres, permettant la fonctionnalisation et la modulation de la rigidité des fibres a conduit à un dépôt de brevet.



# Résultats

---



# Partie I :

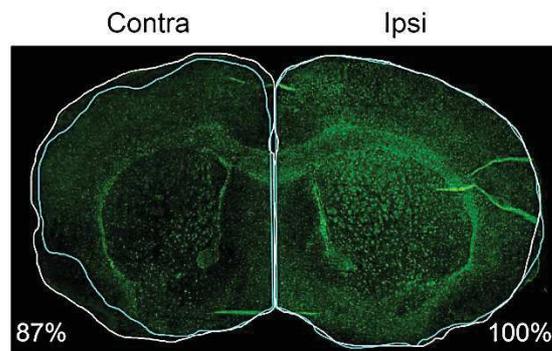
*Développement d'une matrice tridimensionnelle de nanofibres et études du rôle de la laminine et de la topoinduction sur la migration des cellules souches de glioblastome.*

# Introduction

Dès mon arrivée en thèse, je me suis intégrée dans les travaux de validation de ce modèle 3D de nanofibres de PAN, afin de permettre la caractérisation des différences migratoires des GSC entre un modèle de culture 2D et un modèle de culture 3D de nanofibres (NF) de PAN en présence et en absence de laminine (LN). Ainsi, nous avons cherché à évaluer les capacités biomimétiques de nos matrices 3D synthétiques de nanofibres. Pour ce faire, nous avons observé dans ces différentes conditions, deux différentes cultures primaires de GSC ne présentant pas les mêmes comportements lorsqu'elles avaient été xénogreffées sur des souris « nude ».

Les GSC utilisées sont dénommées Gli4 et GliT. Les Gli4 sont des cellules extrêmement infiltrantes, envahissant tout le cerveau, alors que les GliT possèdent une croissance en masse, présentant peu d'infiltration et exerçant de grandes forces de compression sur le tissu cérébral sain.

A



B

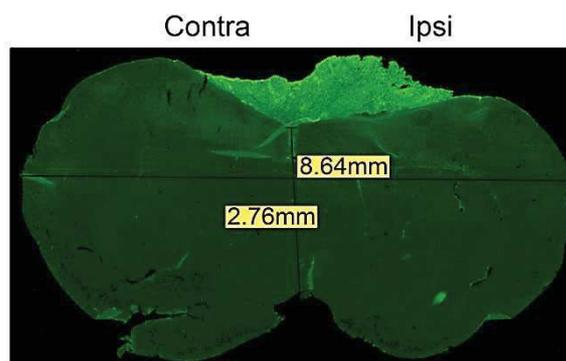


Figure 54 : Cerveaux de souris xénogreffées avec les différentes cultures primaires. Vert : Immunomarquage HuNu (Human Nuclei) A) Gli4 xénogreffées dans un cerveau de souris nude après 10 semaines. Les pourcentages représentent la surface d'invasion de chacun des hémisphères. B) GliT xénogreffées dans un cerveau de souris nude après 10 semaines. Elles sont peu infiltrantes et poussent en masse, écrasant le cerveau, ici sur l'axe dorso-ventral (Hassani et al. 2017).

Lors du dépôt de neurosphères (NS) de Gli4 sur les fibres, l'une des premières observations a été la capacité de ces cellules à réaliser de la migration collective dans le réseau de fibres en absence de protéines de la MEC. Puis, lorsque nous avons fonctionnalisé le réseau avec de la laminine, qui est une protéine de la MEC présente sur la membrane basale des vaisseaux sanguins (Bonnans, Chou, and Werb 2014) représentant une des voies de migration préférentielle des GSC (Cuddapah et al. 2014a) , nous avons pu observer alors une migration de type individuel.

A l'inverse, lors du dépôt de NS de GliT que nous avons laissé migrer 5 jours, le passage en migration individuelle en présence de LN fut bien moins important, avec une migration collective toujours marquée dans ces conditions.

Au-delà des différences de comportement invasif, ces deux lignées présentes également des profils transcriptomiques bien distincts.

Par conséquent, par ces travaux nous avons pu montrer dans un premier temps que, pour deux cultures primaires de GSC bien différentes dans un environnement tridimensionnel approprié, il était possible d'observer des réponses au microenvironnement bien distinctes, plus proche de ce qu'il est possible d'observer in vivo. Ces différentes observations ont ensuite été caractérisées via l'observation de l'expression de protéines des adhérences focales et une étude transcriptomique dans toutes les différentes conditions migratoires. Nous avons donc pu voir que le passage en migration individuelle et l'augmentation de l'invasivité due à la laminine étaient reliés à l'expression des intégrines  $\beta 1$  et de la galectine 3.

Enfin nous avons pu mettre en évidence que ces matrices 3D sont fonctionnelles pour la culture cellulaire, présentent une bonne permissivité permettant l'infiltration des cellules et sont adaptées à la réalisation d'analyses complexes.

## **A novel 3D nanofibre scaffold conserves the in vivo plasticity of glioblastoma stem cell invasion by regulating galectin-3 and integrin $\beta$ 1 expression.**

Ali Saleh<sup>1,§</sup>, Emilie Marhuenda<sup>1,§</sup>, Christine Fabre<sup>1</sup>, Zahra Hassani<sup>1</sup>, Jan de Weille<sup>1</sup>, Hassan Boukhaddaoui<sup>1</sup>, Sophie Guelfi<sup>1</sup>, Igor Lima Maldonado<sup>2</sup>, Jean-Philippe Hugnot<sup>1</sup>, Hugues Duffau<sup>1</sup>, Luc Bauchet<sup>1</sup>, David Cornu<sup>3,\*</sup> and Norbert Bakalara<sup>1,\*,†</sup>

<sup>1</sup>Institut des Neurosciences de Montpellier, INM, U-1051, Université de Montpellier, CHU de Montpellier, ENSCM, INSERM, 34095 Montpellier, France.

<sup>2</sup>Departamento de Biomorfologia. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil.

<sup>3</sup>Institut Européen des Membranes, IEM, UMR-5635, Université de Montpellier, ENSCM, CNRS, 34095 Montpellier cedex 5, France.

\$ Co-first author

\*Co-last authors

**Running title:** Glioma haptaxis and haptokinesis in a 3D nanofiber scaffold

**Keywords:** Glioblastoma stem cells, migration, extracellular matrix, electrospun nanofibres, 3D-transcriptomic analysis

**Financial Support:** This work was supported by INCA/INSERM project PC201216 Gliomatrack

**†Corresponding author:** Norbert Bakalara, INSERMU-1051, Institut des Neurosciences de Montpellier 80, rue Augustin Fliche - BP 74103, 34091 Montpellier cedex 5. France. Phone : +33 6 07 10 68 44. FAX : +33 4 99 63 60 20. Email : [norbert.bakalara@enscm.fr](mailto:norbert.bakalara@enscm.fr). ORCID: 0000 0001 7412 5891

**Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

Total number of figures: 7

## Abstract

The extracellular matrix of the environment regulates Glioblastoma Initiating Cell (GIC) migration, but the underlying mechanisms remain largely unknown. In order to recapitulate the composition and the topographic properties of the cerebral extracellular matrix we have set up a new aligned polyacrylonitrile-derived nanofibre scaffold and functionalized it with laminin. GICs invade the nanofibre network in depth and migrate predominantly directionally along aligned nanofibres. The addition of laminin increases the spatial anisotropy of migration and also modulates the migration behaviour from single cell to collective mode. Equally similar to what has been observed for single cell mesenchymal migration of GBM *in vivo* is the upregulation of galectin-3 and integrin  $\beta$ 1 in GIC migrating on laminin-coated nanofibres indicating a stronger attachment to the support. The concomitant downregulation of calpain-2 that we observed both *in vivo* (Corpus callosum) and *in vitro* (our NF scaffold) also contributes to the invasive character of GICs.

## Introduction

In the last few years accumulating evidence pointed to the involvement of the Extra Cellular Matrix (ECM) in identifying hallmarks of cancer. The biophysical and biochemical cues stemming from the ECM affect tumour growth, proliferation, apoptosis, angiogenesis, invasion and metastasis <sup>1</sup>. Recent data unequivocally demonstrated that malignant cellular modifications are intricately linked to the surrounding microenvironment, making traditional bidimensional cell culture models deficient. For instance, 2D models do not reproduce the *in vivo* conditions of surface nanotopography, stiffness, or polarity <sup>2,3</sup>. This could explain the discrepancies observed between *in vitro* studies and pre-clinical trials during drug development. Moreover, stress fibres and focal adhesions are significantly reduced in 3D, whereas cellular deformation, a limiting process in 3D migration, is not essential in 2D <sup>4</sup>. Therefore, different tridimensional culture models have been established to overcome these limitations such as hydrogels, sponges, decellularized tissues or cell layers and fibres. For example, Beliveau and co-workers demonstrated that polycaprolactone-aligned nanofibres increase the migratory potential of glioblastoma multiforme tumour cells compared to randomly organized nanofibres by upregulating key migratory genes and downregulating key proliferative genes <sup>5</sup>. In another elegant study, the migration mode, distance, velocity and morphology of glioblastoma stem cells (GSCs) were modulated as a function of the biochemical composition of the microenvironment including hyaluronan, collagen and matrigel™ as well as its mechanical properties and topography <sup>6-8</sup>. In these studies, the authors showed that GSCs migrate by expansive growth on matrigel™ matrices and as multicellular extensions on rigid surfaces. Collagen matrices favour mesenchymal single-cell migration and hyaluronan-coated microfibrils favoured collective migration <sup>6</sup>. Nevertheless, some experimental obstacles remain in these systems as for instance the unspecified composition of the matrix (matrigel™), poor mechanical properties, requirement to include cells before gelation, difficulty of creating a controllable macroporosity to obtain cell confinement and the impossibility of creating a spatially anisotropic microenvironment with a constant chemical composition

(hydrogels), a poor cellular infiltration or restricted ingrowth and cytotoxicity (fibres) <sup>3</sup>. Besides that, the possibility to carry out omics analysis and large scale extraction of protein and ARN would be highly desirable.

Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly invasive primary brain tumour. Glioblastoma Initiating Cells (GICs) that penetrate the subarachnoid space or intravasate into the cerebral microvasculature are chemo- and radio-resistant and hinder complete surgical resection <sup>9</sup>. A critical process for GIC invasion is the ECM remodelling. Glioma cells build their own ECM by secreting components of the ECM such as glycoproteins. Consequently, some fibrillary proteins such as laminin, fibronectin and collagen are much more abundant around the glioma tumour <sup>10</sup>. To interact with this rebuilt ECM they express ECM-binding proteins such as CD44, RHAMM, integrins and axon guidance molecules. Next, GICs take advantage of the combination of multiple molecular and physical mechanisms along pre-existing tracks of least resistance such as the white matter which guides and facilitates their invasive behaviour <sup>11</sup>. GICs use a mesenchymal single cell migration mode to migrate away from the main tumour bulk <sup>12</sup>, which is characteristic of disseminating glioma <sup>13</sup>. In addition, they may form *in vivo* multicellular networks or clusters implicated in their invasive capacity and radioresistance <sup>14-16</sup>.

To recapitulate these different migration modes and to mimic the topography of the white matter tracts the biochemical composition of the brain ECM, we developed new nanofibre (NF) scaffolds of aligned (aNf) and non-aligned (naNF) of stabilized polyacrylonitrile (PAN) and partially modified with laminin (aNf+LN, naNF+LN,) <sup>17,18</sup>. PAN has been extensively studied for the manufacture of carbon materials, especially fibres for aerospace applications or electrospun nanofibers for energy applications <sup>19</sup>. Taking advantage of the diversity of its functional groups after stabilization/oxidation and of its tunable mechanical properties, we propose a new application of PAN, which can challenge biopolymers in the biomedical fields. This system is suitable for the analysis of cytosolic calcium transients and immunofluorescence, the extraction and purification of protein and nucleic acids as well as omics analysis. We explored how the topography and biochemical components of the NF influence glioma haptotaxis and haptokinesis. We point out the implication of galectin-3 and integrin  $\beta 1$  to determine the migration mode (single cell vs collective) adopted by GICs in the presence or absence of laminin and the role of NF orientation in the determination of the direction of migration. We investigated the interaction with the ECM proteins and compared the remodelling of focal adhesions of migrating GICs depending on the dimensionality and the coating of the system. We finally correlated our results with *in vivo* xenografts of human GIC into the brain of nude mice.

## Results

### 1. Nanofibre network production and physical characterization

The corpus callosum (CC) is the favourite route to the contralateral hemisphere of glioblastoma cells <sup>20</sup>. Fig. 1A and B highlight the three-dimensional anatomic organization of the heterotypic fibres in the trunk of the CC. To better understand, characterize and target migrating glioblastoma cells on the CC, we designed a 3D

migration system constituted of synthetic biocompatible nanofibres. The nanofibre network could be made aligned or randomly organized (Fig. 1C and D). The aligned nanofibre network corresponds more to a preferential orientation than to strictly parallel fibres (Fig. 1C).

PAN nanofibers were produced by electrospinning from DMF solution. The thermal treatment was conducted in air at atmospheric pressure in a chamber furnace. During this step, stabilization and oxidation occurred yielding an infusible mat which turned from white to brown. Fourier transformed Infrared spectroscopy (Fig 1E) was used to discriminate the functional groups of the stabilized PAN among the possible structures proposed in the literature <sup>21,22</sup>. Commercial PAN contains traces of (free) water (3622 and 1626  $\text{cm}^{-1}$ ) and bands at 2940  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ , CH stretching), 2242  $\text{cm}^{-1}$  (nitrile groups), 1453  $\text{cm}^{-1}$  ( $\square\text{CH}_2$ ), 1356  $\text{cm}^{-1}$  (CH bending), 1249  $\text{cm}^{-1}$  ( $\square\text{CH}_2$ ) and 1072  $\text{cm}^{-1}$  (C-C stretching), in agreement with literature. It should be noted that no bands attributable to the solvent were detected therefore eliminating any possibility of solvent-induced side reactions. After stabilization and oxidation, the spectrum shows a strong reduction of the nitrile band at 2242  $\text{cm}^{-1}$ , broad weak bands from 3100 to 3600  $\text{cm}^{-1}$  attributed to OH and NH stretching, a very strong band at 1589  $\text{cm}^{-1}$  (C=C stretching and NH bending), a strong band at 1372  $\text{cm}^{-1}$  (NH and CH bending) and a weak band at 807  $\text{cm}^{-1}$  (C=C-H rocking in the aromatic plane).

When subjected to UV light, NFs appear fluorescent. They emit in red, green and at a much lower extent in blue and infrared (data not shown). The NFs were decorated with laminin (LN). Spots of laminin deposit can be seen discontinuously distributed along the NF+LN (Fig. 1F, white arrows). The diameter of the nanofibres of  $0.65 \pm 0.082 \mu\text{m}$  (Fig. 1G) is similar to the diameter of the axons in the CC ( $0.64 \pm 0.42 \mu\text{m}$ ) <sup>23</sup>. The porosity of the 3D nanofiber scaffold predominantly ranges between  $0.5\mu\text{m}^2$  and  $7\mu\text{m}^2$  (Fig. 1H). This creates a confinement situation which is required to trigger linear glioma migration <sup>24</sup>.

## 2. The NFs constitute a suitable tridimensional environment for GIC adhesion and migration.

Gli4 cells express several typical markers of neural precursors (CD133, CD15, Nestin, Olig2, and Sox2) and are multipotent <sup>25</sup>. They generate tumours *in vivo*, thus defining them as GICs <sup>26</sup>. When seeded on 2D in differentiation medium, NS adhere to the support and cells migrate away from the NS <sup>25</sup> (Fig. 2A). Analysis of the cell repartition of the GIC, Gli4, within the fibre scaffold shows that cells migrate deeply into it (Fig. 2B). In this environment, Gli4 cells form cellular extensions in various directions to attach to several fibres in a tridimensional manner (Fig. 2C and D, yellow arrows). Focal adhesion sites, visualized by anti-vinculin antibody staining, localize at the leading edges of the lamellipodia in 2D (Fig. 2E), whereas filopodia appear to encircle the fibres in 3D (Fig. 2D and F). These data show that NFs constitute a tridimensional microenvironment permissive of glioblastoma cell adhesion and migration.

### *3. Gli4 GIC migrate individually or collectively in the presence or absence of laminin on PAN nanofibers*

GIC migration was evaluated depending on laminin functionalization of the nanofibres. Using fluorescence microscopy, 3D image reconstitution and electron microscopy, we demonstrate that in the absence of laminin, Gli4 cells migrate collectively by forming aggregates composed of tens of tightly associated cells (Fig. 3A, C and E). On the contrary, Gli4 do not aggregate on NF+LN and migrate as single cells (Fig. 3B, D and E). Cells are rounded at the centre of the cell mass (Fig. 3A, yellow star), while at the border they are bipolar and have a filopodial protrusion (Fig. 3A, yellow arrowheads). Because cadherin expression and actin cytoskeleton remodelling were reported to control collective migration<sup>27</sup>, we analysed the organization of the actin cytoskeleton and the N-cadherin-mediated adherent junctions. On NFs, actin cytoskeleton-specific phalloidin staining shows that most of the cells are rounded. The actin cytoskeleton seems to form a continuum within aggregates (Fig. 3C). Collectively migrating GICs express N-Cadherin at the plasma membrane (Fig. 3E). Thus N-Cadherin-mediated adherent junctions are maintained during collective Gli4 migration. On the contrary, Gli4 GICs behave as single cells on NF+LN, they are bipolar and asymmetric, they express N-cadherin and each cell carries a filopodium at the front edge (Fig. 3D and F, red arrowheads).

### *4. Gli4 GICs haptokinesis and hapkinesis result from the orientation and coating of the NF scaffold.*

To investigate the impact of the ECM topography on GIC migration, we compared the direction of migration of Gli4 cells on aNF and naNF functionalized or not with laminin. First of all, our results show that on aNF, Gli4 cells migrate predominantly according to the orientation of the nanofibres (Fig. 4A). For distances between 0 and 200  $\mu\text{m}$  from the border of the NS, laminin coating does not increase the number of migrating cells at all (Fig. 4B). We suppose that the increase in cell number adjacent to the NS should be attributed to expansive growth rather than to migration as previously reported<sup>14</sup>. For this reason we quantified the total number of migrating cells starting from a distance of 200  $\mu\text{m}$  from the border of the NS (Fig. 4C). We observed a significant higher number of migrating cells in the direction parallel to the NF than in the perpendicular direction, particularly when laminin is present (Fig. 4C).

### *5. Cellular adhesion to the ECM and focal adhesion dynamics of Gli4 cells differ between conventional 2D planar surfaces and 3D aligned nanofibres*

A proliferation test indicated the lower proliferation rate of Gli4 cultured on 3D aligned nanofibers with respect to 2D (Fig 5A). Transcriptome analysis revealed that 98 genes involved in cell cycle progression as well as members of the kinesin family were expressed by at least a factor of 1.5X less in cells grown on 3D than on 2D, suggesting a shift to the invading, less proliferative mesenchymal phenotype of GIC cells in a 3D

context (Fig. 5B). Accordingly, the expression of mesenchymal and premetastatic stem cell markers such as ATXN1, ALCAM, CD9, CHI3L1; ITGA7 and CD44 were upregulated or remained elevated. We may conclude from this analysis that GICs cultured in the 3D microenvironment retain their mesenchymal phenotype and manifest a higher propensity for migration. Important proteins implicated in migration are the multifunctional modulators of cell focal adhesion (FA) such as galectins and integrins<sup>28</sup>. FAs play a central role in migration by controlling the dynamic cycles of attachment and detachment to the ECM<sup>29</sup>. FAs are considered as prototypical integrin-mediated cell-ECM contact sites that link cellular actin cytoskeleton to the ECM scaffold<sup>30</sup>. Therefore, our next aim was to compare the expression of integrin  $\beta 1$ ,  $\alpha 6$  and galectin-3 in the different culture conditions. On aNF, the protein levels of galectin-3 and integrin  $\beta 1$  were respectively 6 and 2.6 fold higher in cells grown on laminin-coated fibres than on non-coated fibres (Fig. 6A and Fig. S3). On 2D, only galectin-3 expression is somewhat reduced by laminin coating (Fig. 6A and Fig. S1). In contrast, the protein level of integrin  $\alpha 6$  was 2.5 times lower on laminin-coated fibres whereas its level in 2D increases with LN (Fig. 6A and Fig. S1). Fig. 6B shows that integrin  $\beta 1$  is localized at the plasma membrane of Gli4 migrating on aNF+LN (white arrowheads), while it is distributed in the cytoplasm and around the nucleus in Gli4 growing on 2D+LN. Note that on NF+LN, integrin  $\beta 1$  membrane staining is localized in the attachment points with the nanofibres (Fig. 6B, white arrowheads).

FA dynamics differ between 2D and 3D environments<sup>31</sup>. It has been previously demonstrated that FA dynamics involving vinculin are regulated by the Calpain-mediated proteolysis of Talin and FAK<sup>32</sup>. Because GIC migrate in a tridimensional microenvironment on the aNF (Fig. 2B) and express higher levels of adherent molecules on this matrix, we decided to determine the expression of calpain-2, vinculin, FAK and phosphorylation of FAK and Talin and cleaved Talin in Gli4 cells on the aNF+/- LN and 2D +/- LN supports (Fig. 6A and Fig. S1). Calpain-2 expression is 2 fold higher in Gli4 cells plated on 2D+LN than in the other conditions. Immunofluorescence confirmed that calpain-2 is upregulated in 2D+LN compared to aNF+LN (Fig. 6B). The expression levels of vinculin are equal in aNF+/- LN and 2D+/- LN (Fig. 6A). Compared to 2D+LN, FAK expression increases on aNF+LN, whereas its phosphorylation ratio decreases. Talin expression and cleavage are increased in 2D+LN compared to all other conditions. We therefore conclude that focal adhesion dynamics are affected by the dimensionality and functionalization of the microenvironment

*6. GliT migrate collectively irrespective of laminin coating and exhibit a different pattern of expression of cell adhesion and signalling proteins compared to Gli4 cells.*

We examined a second primary glioblastoma cell line with a different signature, GliT. Transcriptome analysis comparing Gli4 and GliT in NS culture yielded 784 genes differentially expressed by at least a factor 2. P53, EGF, PDGF, and NGF signalling pathways were upregulated in Gli4 with respect to GliT, while the axon guidance and TGF- $\beta$  pathways as well as focal adhesion and cell adhesion genes were downregulated (Table S2). Thus we expected a different migration behaviour. Indeed, GliT cells aggregate on NF+LN and

still use collective migration (Fig. 6C). Quantification of the number of collective migration events per neurosphere on NF+/-LN for Gli4 and GliT indicates that the shift from collective to single cell migration by the addition of LN is not as strong in GliT as in Gli4 (Fig. 6D). Apparently this collective behaviour is important for GliT cells as we found that their survival was compromised if they were seeded on NF as dissociated cells at low density (data not shown).

GliT also differs from Gli4 in the expression of proteins involved in the interaction with the ECM (Fig. 6E and Table S3). For instance, galectin-3 protein levels decreased by 1.7 fold in GliT when plated on aNF+LN in comparison to 2D+LN (Fig. 6F and Fig. S1), whereas we found a 6-fold increase in the same conditions with Gli4. Integrin  $\alpha 6$  expression in GliT increases on aNF+/-LN relative to 2D +/- LN (Fig. 6E and Fig. S1), whereas we observed a downregulation for Gli4 on NF+LN. Integrin  $\beta 1$  protein levels were not different between aNF+/- LN and 2D+/- LN for GliT cells (Fig. 6E and Fig. S1), whereas for Gli4 a higher integrin  $\beta 1$  protein expression was found on laminin-coated NF than on uncoated NF. Immunofluorescence analysis of calpain-2 expression (Fig. 6F) shows equal expression of this enzyme in both 2D and in 3D in GliT, contrary to Gli4. Also, GliT underexpress CAMK2D and overexpress CAMK2N1 with respect to Gli4 (Table S3). CAMK2N1 is an inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dependent protein kinase (CaMKII), which controls a range of cellular processes including cell adhesion and migration<sup>33</sup>. Altogether, our results show that Gli4 and GliT cells exhibit a different response of integrins  $\beta 1$   $\alpha 6$  and galectin-3 to ECM modifications.

*7. Integrin  $\beta 1$  and galectin-3 are upregulated in Gli4 cells in the corpus callosum whereas calpain-2 is downregulated in invasive Gli4 cells in vivo*

Human nestin- and human nuclei (HuNu)-specific immunostaining were used to identify the human glioblastoma cells in the mouse brain (Fig. 7A, B and C). When transplanted in the brains of nude mice, Gli4 GICs are highly invasive<sup>25,26</sup> (Fig. 7A). They invade the cortex, proceed through the fibrous white matter tracts of the CC and reach the contra-lateral hemisphere (Fig. 7A). Note that Gli4 cells migrate in isolation both through the CC and the cortex. GliT cells in contrast, are almost not invasive and form a bulky tumour<sup>26</sup> (Fig. 7A, area delineated by the dashed line). The expression of integrin  $\beta 1$  (Fig. 7B) and galectin-3 (Fig. 7C) in invasive Gli4 cells is higher when they migrate along the aligned myelinated fibres of the CC (Fig. 7C, yellow arrow) than in the cerebral cortex (white arrow) or the striatum. Calpain-2 is not expressed by invasive Gli4 cells in the CC nor in the cortex (Fig. 7D). Interestingly, GliT inside the tumour bulk express calpain-2 (Fig. 7D), while GliT migrating away from the tumour mass do not express calpain-2 (Fig. 7D). These data indicate that integrin  $\beta 1$  and galectin-3 expression depends on the cerebral microenvironment and determines invasiveness. Calpain-2 expression seems to be inversely correlated to the invasive potential of GIC *in vivo*.

## Discussion

During the stabilization step, PAN is known to undergo different reactions: cyclization of pendant nitrile groups, rearrangement (tautomerization) yielding enamine groups which were subsequently oxidized to form pyridone groups. Depending on the experimental conditions, the ratio between unreacted nitrile groups, enamine and pyridone may vary, which have led to different stabilized PAN structures proposed in the literature<sup>21,34-36</sup>. In our conditions, FTIR analysis allows us to determine that the proportion of pyridone is very low in our compound given the absence of the carbonyl absorption band. The predominant functional groups are therefore –OH, –NH, and –CH, with few residual –CN. The intense band at 1589 cm<sup>-1</sup> (C=C stretching) and the presence of a sharp one at 807 cm<sup>-1</sup> (C=C-H rocking in aromatic plane) show that dehydrogenation and aromatization reactions occurred, in agreement with the color and the fluorescence of the nanofibers. The functional groups of the stabilized PAN nanofibers has to be correlated with its ability to promote hydrogen bond formation with the cell surface, thus creating a biocompatible environment favoring cell attachment.

We have reproduced in a single 3D nanofibres model *in vivo* key parameters governing cell motility such as dimensionality, directionality, stiffness and functionalizations. We have overcome a limiting problem encountered in the use of electrospun nanofibres consisting of the poor cellular infiltration or in-growth<sup>3</sup>. This is due to the small dimensions of the microenvironment which hamper the cells to insinuate their nucleus and cell body in the spaces separating adjacent nanofibres. Several techniques have been developed previously to tackle this problem such as the production of nanoyarn nanofibre scaffolds. Proliferation, morphology and infiltration of mouse fibroblast were improved on aligned nanoyarn fibres in comparison to randomly oriented fibres<sup>34</sup>. In the case of our PAN NF, alignment is not a requirement to create interstitial spaces permissive to cellular infiltration. This is likely due to the chemical nature, filament spacing and diameter of the material. Diameters range between 0.4 µm and 1 µm with an average diameter of 0.65 µm, quite similar to axon diameters in the human CC<sup>23</sup>. These features allow the GICs to fully embed in a tridimensional microenvironment thereby abolishing the apico-basal polarity imposed in 2D. Other physical and spatial aspects of the ECM such as stiffness, directionality, and epitope arrangement<sup>2</sup> are important parameters for *in vivo* motility that might be modulated in the 3D NF. To study the ECM topography in GIC migration, we produced aligned and non-aligned NF. Our results show that that the orientation of the NF governs the direction of migration of Gli4 cells. Once again, our results are in accordance with *in vivo* observations where glioblastoma cells are guided by axon alignment in the CC. The addition of laminin on aNF or naNF improves migration of Gli4 cells (Fig. 4B) as was reported previously for the induction of migration by laminin of glioblastoma cells *in vitro*<sup>37</sup> or in the perivascular space *in vivo*<sup>38</sup>.

Gli4 GICs migrate as single cells in the presence of laminin but collectively in its absence (Fig. 3). The continuous actin cytoskeleton and N-Cadherin-mediated cell-cell adherent junctions are responsible for the coordination between the cells during collective Gli4 migration on uncoated NF (Fig. 3D). These cell-cell junctions at the leading edge as well as in lateral regions and inside the moving cell group are characteristic of

collective migration<sup>27</sup>. These leading edge cells guide the invasion and intravasation of multicellular strands<sup>14</sup> (Fig. 3A). Collective migration is a hallmark of epithelial cancer<sup>39</sup> in contrast to the individual, mesenchymal type of migration<sup>40,41</sup>. It has also been demonstrated that when ErbB2-Positive Breast Cancer Cells detach from the ECM and adopt collective migration, their survival is promoted<sup>42</sup>. The same is true for the survival of circulating lung tumour cells after their separation from the initial tumour<sup>43</sup>. We propose on the basis of our observations in the absence of laminin (Fig. 3) that collective migration illustrates a process used by invading glioblastoma stem cells to overcome anoikis.

Glioblastoma cells adapt outstandingly to various environments during their migration inside the brain. In our 3D system, integrin  $\beta 1$  and galectin-3 overexpression coincides with a shift from collective to single cell migration, provided NF are coated with laminin (Fig. 3 and Fig. 6). Unexpectedly, no difference in galectin 3 and integrin  $\beta 1$  mRNA content was discerned between 2D and 3D NF conditions even though a clear difference in protein levels was observed, indicating that the regulation of expression of these proteins occurs after transcription. This notion is substantiated by the report that expression of galectin-3 is post-transcriptionally regulated by miR-128<sup>44</sup>, integrin  $\beta 1$  by miR-124<sup>45</sup>. Galectin 3 and integrin  $\beta 1$  overexpression in glioblastoma cells migrating along the white matter is typical of mesenchymal single cell migration<sup>7,41</sup>. Galectin-3 acts as a multifunctional modulator of cell-cell and cell-ECM adhesion<sup>28</sup>, promoting adhesion to laminin<sup>46</sup>. The interaction of laminin with Mgat5-modified N-glycans at the cell surface of mammary carcinoma cells stimulate  $\alpha 5\beta 1$ -integrin activation and translocation to fibrillar adhesions<sup>47</sup>. Similarly, galectin-3 and integrin  $\beta 1$  overexpression by cells cultured on NF and by cells migrating *in vivo* along the CC (Fig. 6 and 3) might indicate resistance to anoikis and a more metastatic phenotype<sup>48</sup>. In addition the reduced proliferation rate of Gli4 in NF (Fig. 4E) is in accordance with a more invasive phenotype. We also propose that galectin-3 and integrin  $\beta 1$  data reveal more clustering of integrin  $\beta 1$  and N-cadherin at the cell surface, shown to be linked to cell migration<sup>47</sup>, radioresistance<sup>49</sup> and immunoresistance<sup>50</sup>. While integrin  $\beta 1$ , FAK and galectin 3 are overexpressed in 3D+LN in comparison to 2D+LN, neither an increase in calpain2 expression nor an increase in pFAK/FAK and talin/total talin ratios are observed. These data indicate a stronger adhesion of Gli4 cells to the nanofibres in 3D+LN independent of an increase of focal adhesion turn-over. In contrast, 2D +LN promotes focal adhesion turn-over without an increase of integrin  $\beta 1$ , FAK and galectin 3 expression. In conclusion, the different responses (adhesion, turn-over and signalling) of Gli4 GIC FA to laminin are dependent on the physical properties of the support.

Galectin-3, integrin  $\beta 1$  and integrin  $\alpha 6$  expressions differ between GliT and Gli4 depending on the dimensionality and laminin coating (Fig. 6). This results for Gli4 in a switch from collective to single cell migration on laminin-coated NF, while GliT maintains collective migration even on laminin-coated NF. These data corroborate the observation that GliT migrate collectively in the CC while Gli4 adopt a single cell mode (Fig. 7). We also found that calpain-2 is expressed by GliT cells staying inside the bulky tumour, while Gli4 cells migrating in the CC do not express calpain-2 (Fig. 7). With our 3D model the expression of calpain-2 decreased for Gli4 grown on NF+LN in comparison to 2D+LN but not for GliT grown in the same conditions.

Consistent with their maintenance of collective migration, GliT do not vary galectin 3 and integrin  $\beta$ 1 expression in 2D and 3D conditions. Moreover, Talin cleavage is not different in GliT grown in 2D or 3DNF +/-LN (Fig. S1). Calcium influxes are a unique characteristic increasing the invasiveness of glioblastoma cells. Calpain 2 is a key downstream effector of calcium ions, facilitating glioblastoma cell invasion<sup>51</sup>. As preliminary data, we observed the occurrence of local calcium transients in filopodia of GliT cells collectively migrating on laminin-coated aNF (Video 1). These transients are known to stabilise filopodia but do not lead to a highly invasive phenotype. Also, according to our transcriptomic data, Gli4 and GliT in NS culture express various amounts of the ECM-related genes coding for laminin (*LAMA2*, *LAMA1*), collagen (*COL1A1*, *COL11A1*, *COL4A6*, *COL20A1*, *COL22A1*), ECM receptor integrins (*ITGA10*, *ITGA6*, *ITGB5*) and cell adhesion molecules (*L1CAM*, *CAMK2N1*, *MCAM*, *NRCAM*, *CAMK2D*) (Table S1) with only the *LAMA2*, *COL11A1*, *ITGA10* and *CAMK2D* genes being upregulated in Gli4 with respect to GliT (Table S3).

We propose that ECM attachment and sensing as well as the signal transduction pathways on which these depend could be integrated in a different fashion in Gli4 than in GliT, resulting in different migration modes, possibly due to different affinities to ECM proteins. GliT cells migrate collectively even in presence of laminin (Fig. 6D). Remarkably, all these different signal interactions sum up to complete different migrating behaviours of glioma cells *in vivo* i.e. (Fig. 7).

In conclusion, we have developed a new electrospun NF scaffold suitable for glioblastoma adhesion and migration in a 3D microenvironment akin mesenchymal migration, allowing discrimination between the migration potential of different glioblastoma stem cells. The PAN NF matrix represents a valuable tool to study the role of the ECM in GIC migration and can serve as a relevant platform for (anti-migratory) drug screening *in vitro*.

## Materials and Methods

### Cell culture

GBM cell culture was realized according to the NS protocol elaborated by Guichet *et al*<sup>25</sup> and Dromard *et al*.<sup>52</sup> Gli4 and GliT are primary patient-derived glioblastoma cell cultures. They were cultured in two different conditions<sup>25</sup>. In DMEM/F12 medium supplemented with glucose, glutamine, insulin, N2, Epidermal Growth Factor and Fibroblast Growth Factor, (proliferation medium) GBM cells form neurospheres (NS). In DMEM/F12 medium supplemented with the same components as for the proliferation medium except from growth factors and heparin replaced by foetal bovine serum (0.5%) (differentiation medium) GBM cells migrate. For this latter condition, GBM cells were cultured in adherence on 2D planar surfaces (2D) or 3D nanofibres (NF). Prior to cell seeding, 2D or NF were either functionalized or not with poly-D-lysine<sup>25</sup>. MTT test was used to evaluate cell viability as described<sup>53</sup>. To obtain NS of the same size, we used Corning® 96 well round bottom ultra-low attachment microplates coated with a covalently bond

hydrogel (Corning 7007) (Fig. S4). Dissociated GBM NSs cultured in proliferation condition were seeded at 5 000 cells per well. The cells sediment and NS were harvested 24 hours later.

### **Nanofibre production and characterization**

Aligned and non-aligned nanofibres were produced by electrospinning using a solution of 10wt% polyacrylonitrile (PAN, Aldrich, average Mw 150,000) dissolved in N,N-Dimethylformamide (DMF, Aldrich >99%, molecular biology grade). For the fabrication of the NF scaffold, a needle was used to project the polymer, which was collected on an electrode located 15 cm from the needle. A voltage of 20 kV was applied. To produce aNF, the collecting electrode was a rotating drum (2000 rpm), whereas a non-mobile metal disk was used to produce naNF. After electrospinning, the NF scaffold was thermally stabilized in a chamber furnace (250°C, 2h dwell, 2°C.min<sup>-1</sup> heating rate). ATR-FTIR spectra were recorded on a Perkin-Elmer Spectrum 100.

Nanofibre cryo-sectioning : For cryosectioning, the nanofibres were included in OCT before freezing. Section thickness was 14 µm.

### **GBM orthotopical xenotransplantation**

Gli4 and GliT GBM cells were dissociated enzymatically using 0.25% trypsin and then resuspended in PBS at 5 x 10<sup>4</sup> cells per µL. Three µL (1.5 x 10<sup>5</sup> cells) were injected into the striatum (1 mm rostral, 2 mm lateral and 2.5 mm depth from bregma) of 6 weeks old female NMRI-nude mice (Janvier labs) under isoflurane anaesthesia. At the end of the surgery, the remaining cells were checked for cell viability. After 3 months, the animals were sacrificed using pentobarbital terminal anaesthesia and fixed by intracardiac PFA perfusion. Brains were removed and post-fixed in 4% PFA and then immersed successively in 7%, 15% and 30% sucrose. Afterwards, the brains were included in an optimal cutting temperature (OCT) compound, snap-frozen and cryosectioned in 14 µm thick slices.

### **Immunofluorescence and 3D image reconstitution**

Gli4 and GliT cultures were fixed by 4% PFA. Cells and brain sections were blocked and permeabilized using PBS - triton 0.5% - horse serum 5%. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. The antibodies used in immunofluorescence were: N-Cadherin (abcam ab12221), Calpain-2 (abcam ab155666), Vinculin (Sigma Aldrich V9264), actin cytoskeleton was stained with Alexa Fluor 488 phalloidin (Molecular Probes A12379), cell nuclei with Hoechst 33342 (H3570 Life technologies) and Human Nuclei (Millipore MAB1281). Fluorochrome-coupled secondary antibodies were incubated 2 hours at room temperature (dilution 1/500). Image acquisition was realized using Zeiss Axioimager Z1/ Zen (with an apotome). Z-stack acquisition was realized using confocal microscopy (LSM 700). Imaris 8.1.2 software was used for image 3D reconstitution. The Quantifications were done using ZEN 2012 software.

## Calcium imaging

After 6 days of migration, GliT were incubated before acquisition with 2 mM Fluo-4 AM (Invitrogen) and Pluronic (F-127) (Life technologies) in differentiation conditions. Time lapse calcium imaging in Z-Stack was performed using multiphoton microscopy during 45min at 37°C, 1 acquisition every 2sec at 1% laser intensity. Imaris x64 8.1.2 software has been used for image 3D reconstitution.

## Scanning Electron Microscopy

Gli4 cells cultured on NF were fixed with 2.5% glutaraldehyde in PHEM buffer during 1 hour at room temperature then overnight at 4°C. Cells were then dehydrated with successively 70%, 96% and 100% of alcohol and incubated in HMDS for drying.

## Western blot

Twenty µg of protein lysate were separated by SDS-PAGE. PVDF membranes were blocked by 0.1% TBS-Tween - 5% milk. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. The antibodies used in western blot were: Galectin-3 (abcam ab2785), Integrin β1 (Millipore AB1952), Integrin α6 (abcam ab75737), FAK (abcam ab40794), phospho-FAK Y397 (abcam ab81298) Talin1/2 (abcam ab11188), Calpain-2 (abcam ab155666), Piezo 1 (Proteintech 15939-1-AP) and GAPDH (Millipore MAB374) as a loading control. Horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (Cell Signalling) were incubated 2 hours at room temperature. The Chemidoc XRS+ imager was used for chemi-luminescence detection. Pixel quantifications were done with Image Lab software. Normalization by sum using total protein staining was used.

## Statistical analysis

The presented experiments were carried out at least in biological triplicates (except for the *in vivo* and the quantification of the number of migrating cells on aNF and naAF which were done twice). All the values are expressed as mean +/- SEM. Statistical tests were performed using the graphpad prism software.

## Transcriptome analysis

mRNA from glioblastoma lines was hybridised on Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0 expression arrays by the Montpellier Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy (<https://www.mgx.cnrs.fr/>) and Table S5. Each of the experimental conditions was carried out in duplicate and hybridized on two separate GeneChips. By creating a frequency histogram of all expression levels obtained with the Gli4 and GliT lines, two populations of probes were found: those who bound and those who did not bind mRNA from these cell lines. A particular gene was supposed to be expressed if the expression value exceeded 56. The ratio of gene expression of pairs of experimental conditions was calculated by first averaging the expression levels on the two chips per condition followed by taking the ratio of the two averages. Ratios between 0.5 and 2 were considered to be insignificant. Heatmaps were analysed with Serf

software <http://www.bram.org/serf/Clusters.php>. Overrepresentation analysis was carried out on-line with the Max Planck Institute's functional annotation page: <http://cpdb.molgen.mpg.de/>.

### **Acknowledgments**

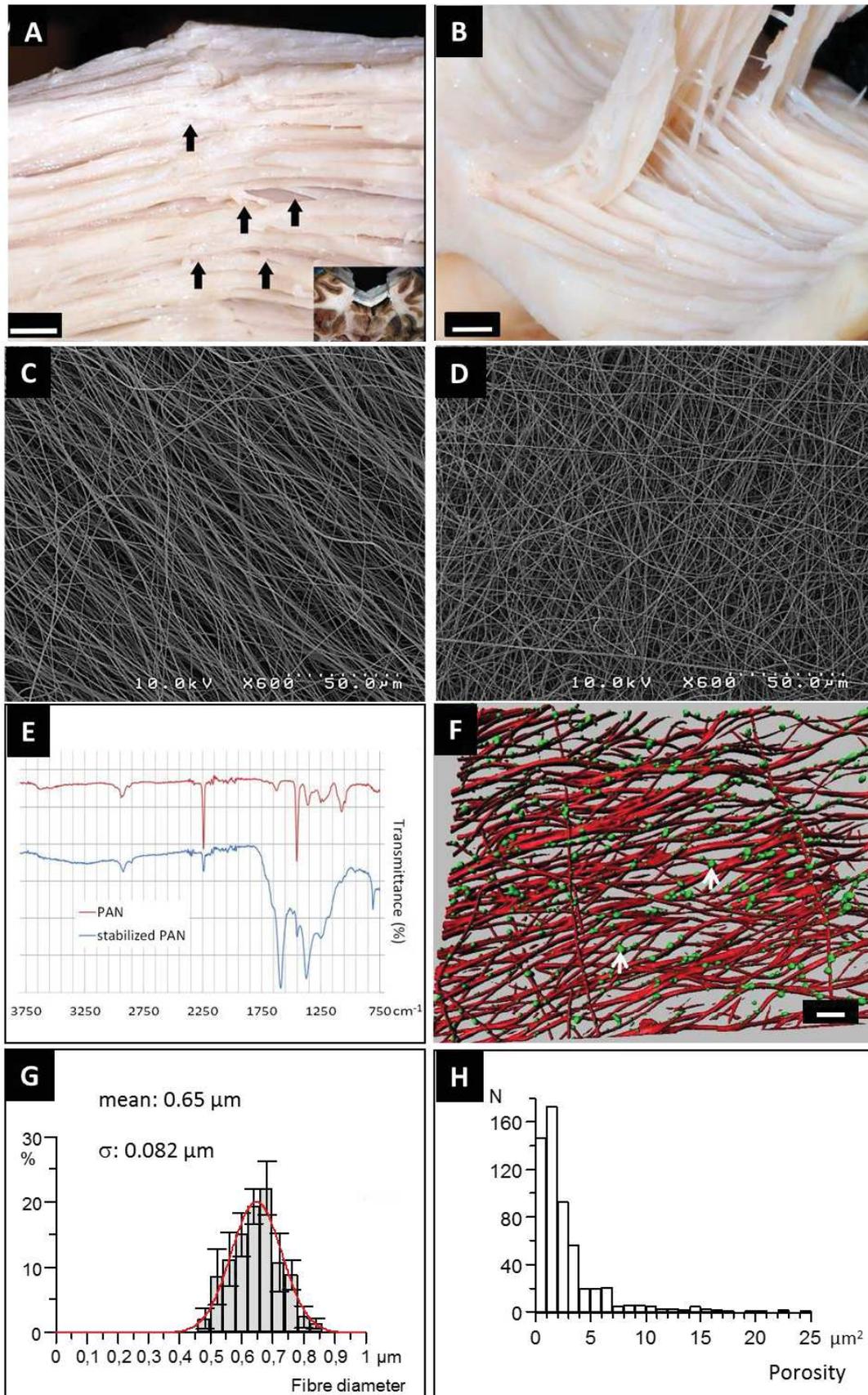
DC and NB thank INSERM for the financial support (INSERM/INCA project PC201216 Gliomatrack).

### **Authors contribution**

A.S., E.M., and S.G. carried out the experiments; Z.H. and D.C. carried out the initial work on the nanofiber scaffold production and characterization; C.F. supervised the western blot analysis; J.de W. performed the transcriptomic analysis; H.B. supervised the image analysis, J.P.H. and L.B. produced the glioblastoma stem cells; I.M. and H.D. characterized the anatomic organization of the heterotypic fibres in the trunk of the corpus callosum. N.B. wrote the manuscript with support from all authors, N.B. and D.C. supervised the project and the findings of this work.

Figures :

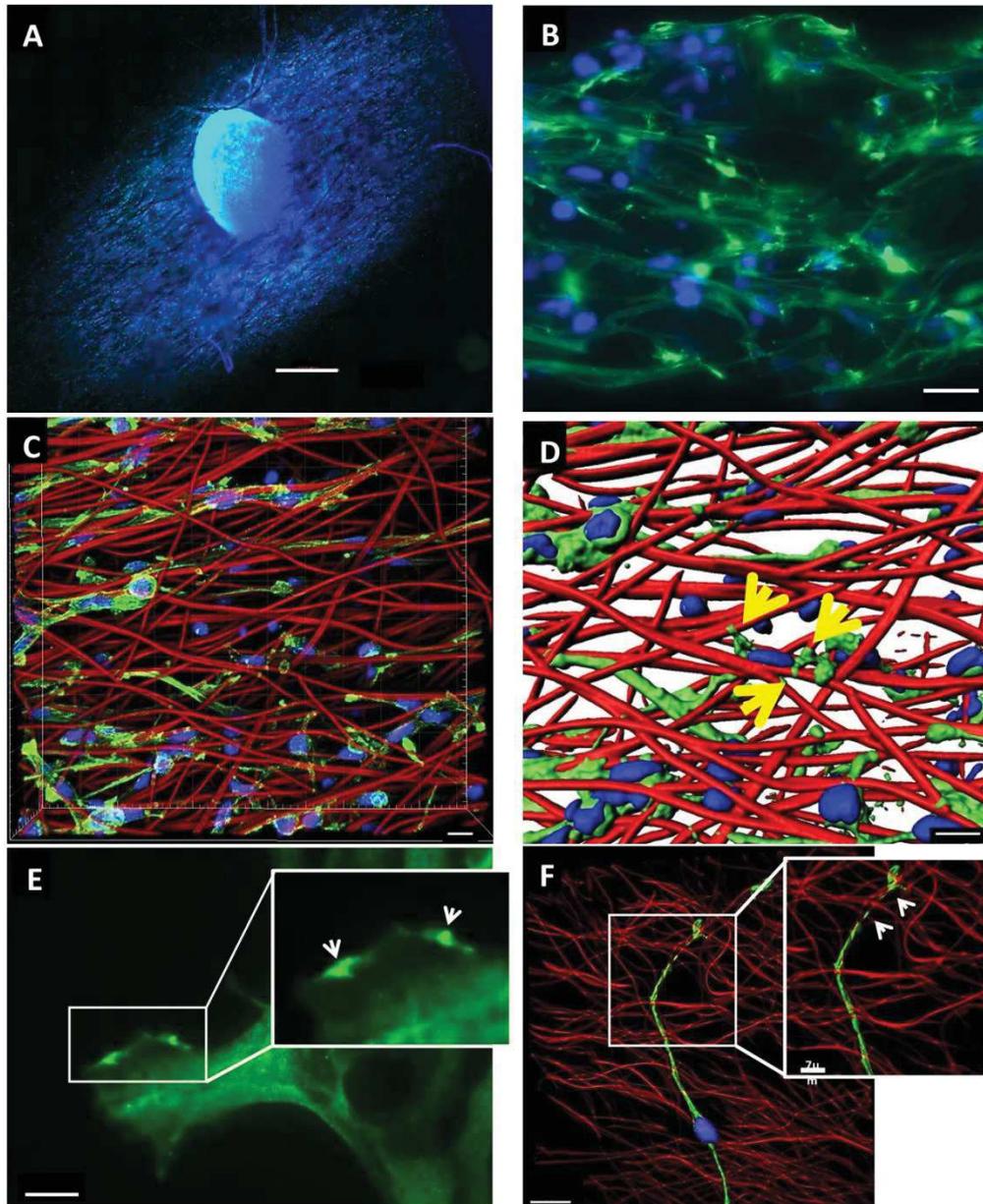
Figure 1:



**Figure 1. The physical characterization of nanofibres and their functionalization with laminin.**

Polyacrylonitrile nanofibres were produced by electrospinning. The NF tissue mimics the organization and the alignment of the myelinated fibres of the CC. (A) Upper posterior view of the dorsal aspect of the trunk of the *corpus callosum* prepared with a variant of the Klinger's Technique for macroscopic fiber dissection (specimen in the box). (B) Antero-superior view. Appearance of the *corpus callosum* in the course of delamination in the lateral-lateral direction (same specimen as in Figure A). (C-D) Scanning Electron Microscopy images showing the alignment of the aligned nanofibers (C) and non-aligned nanofibres (D). (E) FTIR spectra of PAN and stabilized PAN emphasizing the chemical structure modification during the thermal treatment (Wavenumber in  $\text{cm}^{-1}$ ) (F) Image reconstitution corresponding to z-stack images of laminin immunostaining on aNF. Laminin deposits (green) are discontinuously distributed on the nanofibres (white arrows). The NFs are autofluorescent and appear in red (false colour red) (scale bar =  $20\mu\text{m}$ ). (G) Distribution of the nanofibre diameters. The histogram was fitted with a single Gaussian function shown in red. (H) Distribution of the scaffold porosity.

**Figure 2:**



**Figure 2. The NF create a tridimensional microenvironment convenient for GIC proliferation, adhesion and migration.** At the time of the seeding, the NS contained 10,000 cells. Images were captured six days after NS seeding on aNF+LN. (A) Image showing the adherence and the penetration of a NS in the aNF network (scale bar = 500 $\mu$ m). (B) A lateral view of the repartition of migrating Gli4 cells (away from the NS) deep inside the aNF network (scale bar = 20 $\mu$ m). (C) Image acquisition (scale bar = 10 $\mu$ m) and (D) the corresponding z-stack 3D reconstitution showing the adhesion of Gli4 cells on aNF (scale bar = 20 $\mu$ m). The actin cytoskeleton was stained with phalloidin (green) and the nucleus with Hoechst 33342 (blue). Gli4 protrusions encircling the fibres are indicated by yellow arrows. (E) Vinculin staining of Gli4 focal adhesions

in 2D+LN (scale bar= 10  $\mu$ m). (F) Z-stack 3D reconstitution showing Vinculin (green) in Gli4 adhesion on aNF+LN. Nucleus was stained with Hoechst (blue) (scale bar= 15  $\mu$ m).

**Figure 3:**

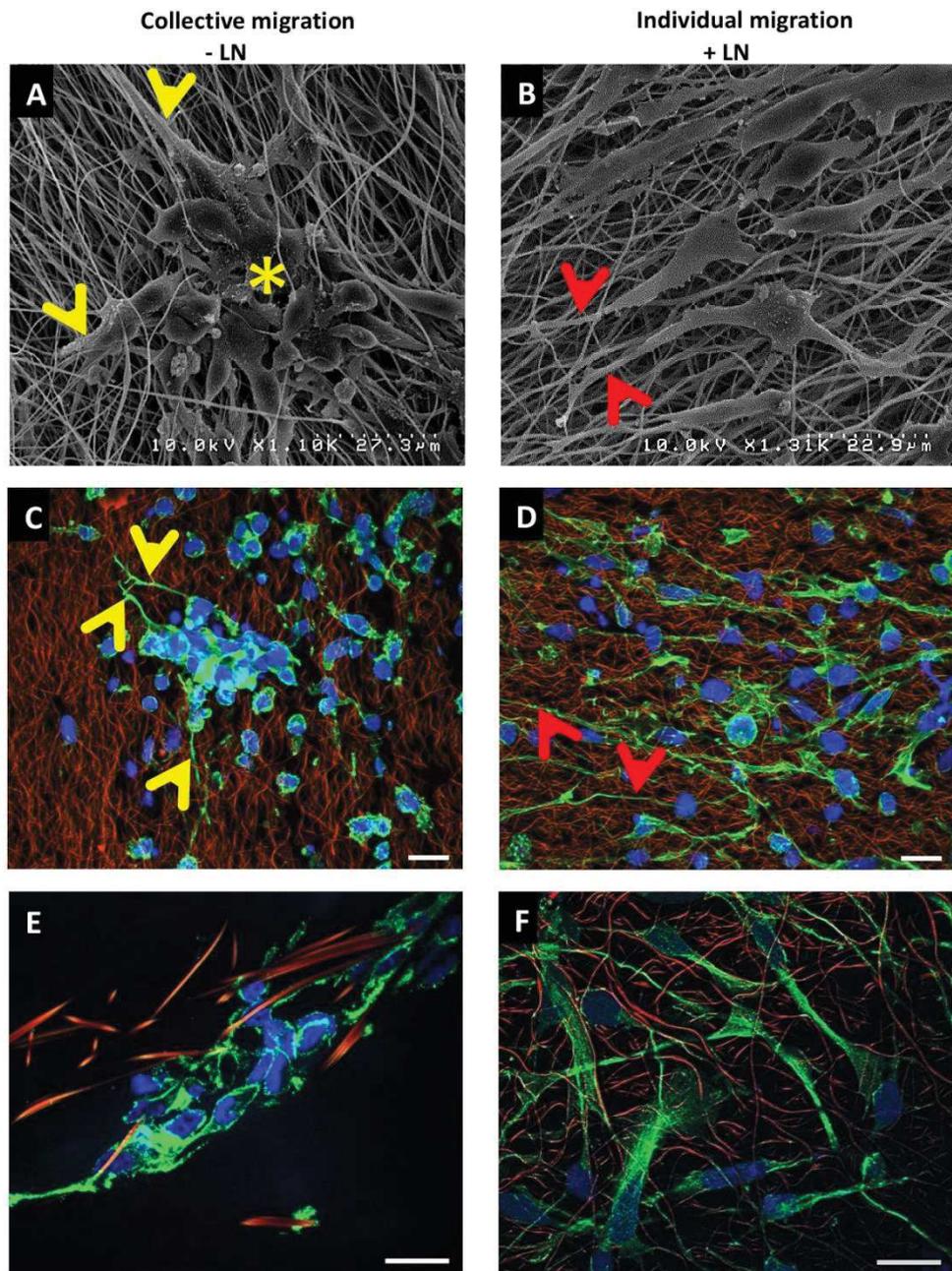


Figure 3. **Gli4 cells migrate individually or collectively in the presence or absence of laminin respectively.** The migration mode of Gli4 cells was analysed in the presence (B-D-E) or absence (A-C-E) of laminin on aNF. At the time of seeding, the NS contained 5000 cells. The images were captured six days after NS seeding. The aNFs are autofluorescent and appear in red (C-D-E-F) the nucleus in blue (hoechst 33342 blue). (A-B) The migrating Gli4 cells were visualized using scanning electron microscopy. (C-D) The actin cytoskeleton was stained with green phalloidin (scale bar = 20 $\mu$ m). (E and F) Cell-cell junctions were stained

using anti N-cadherin specific antibody (green) (scale bar = 20µm). The yellow arrowheads indicate the filopodia extensions of the peripheral cells, whereas the yellow star indicates the rounded cells at the centre of a collectively migrating group of cells in the absence of laminin on the NF, the red arrowheads show the individually migrating cells in the presence of laminin.

Figure 4 :

Figure 4

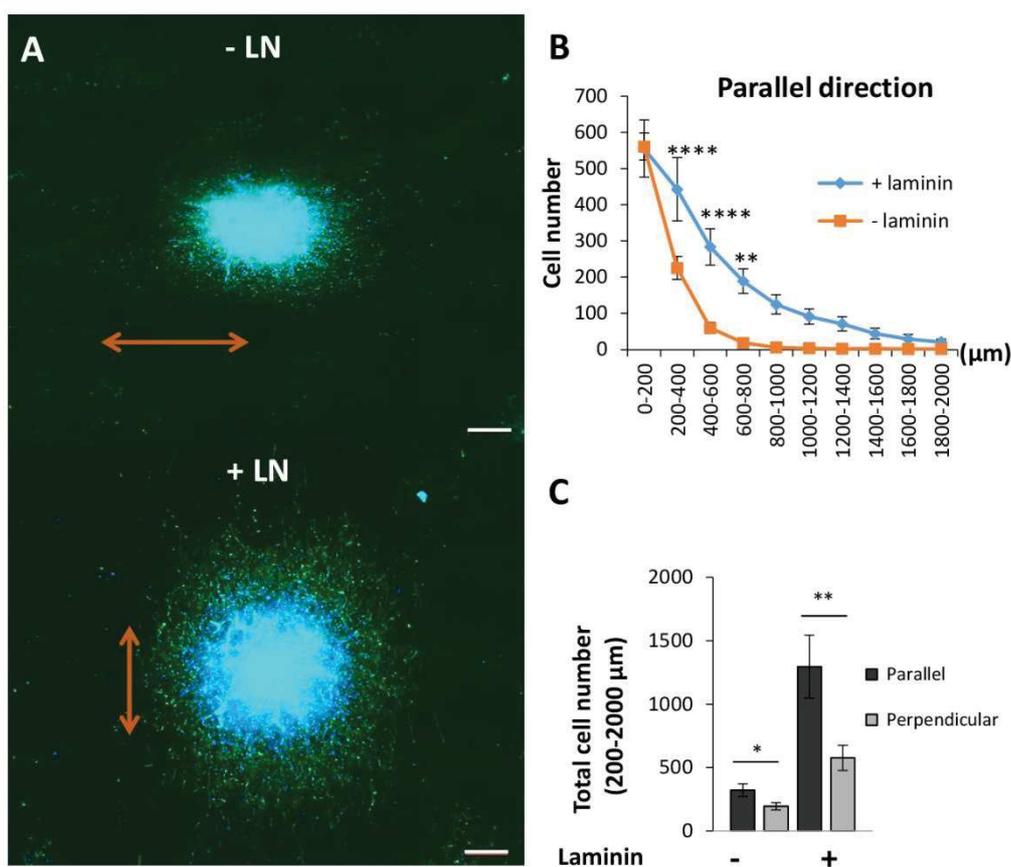


Figure 4. aNF 3D microenvironment reduces the growth ratio and fibre orientation determines the direction of migration of GIC. The NS contained 5000 cells at the beginning of each experiment at day zero. The images were taken after six days of culture in differentiation conditions. (A) Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue) (scale bar = 200µm). The direction of the nanofibres is indicated by the red arrows. (B) Quantification of the number of Gli4 cells migrating in the direction of the aNF in presence or absence of laminin. (C) Quantification of the total number of migrating Gli4 cells in the parallel or perpendicular direction of aNF and in the presence or absence of laminin. The number of cells was counted in the area between 200 µm and 2000 µm from the border of the NS. This area was chosen in order to exclude the increase in cell number related to expansive growth near the NS. \*\*p<0.01 (Student test). All Data are representative of two independent experiments. The length of the migration area was demarcated between the

NS border and a distance of 2 mm in the direction of migration. (D)(E) Cells plated on uncoated nanofiber are stained with Hoechst (blue) and nestin (green). Nanofibers appeared in red.

**Figure 5:**

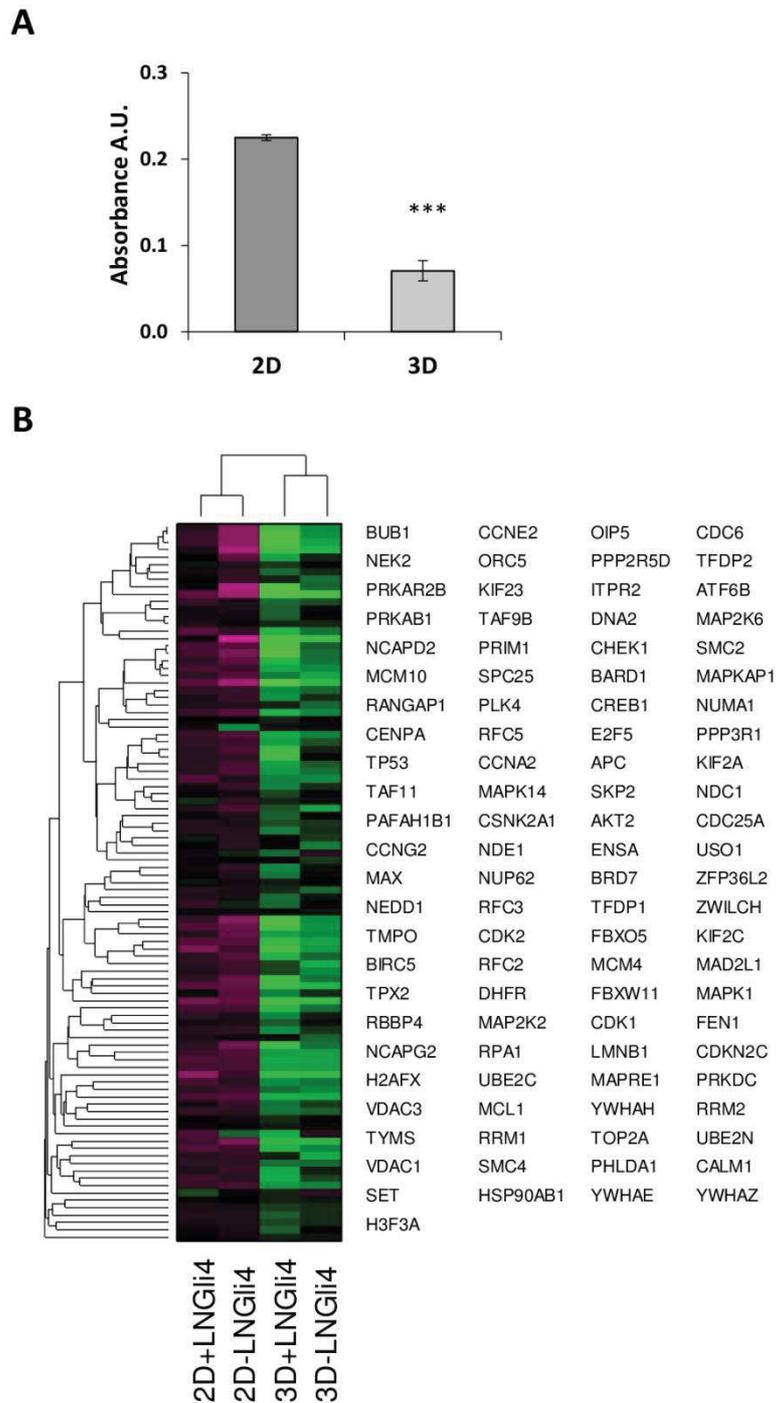


Figure 5. **Transcriptomic analysis of Gli4 cells cultured in 2D or 3D.** (A) Proliferation rate was estimated using an MTT test 4 days after seeding of 5000 dissociated Gli4 cells. Test T Student Unpaired.

(B) Heat map of the 98 genes associated with cell cycle and differentially expressed between Gli4 cells cultivated in either 2D or 3D +/-LN.

**Figure 6:**

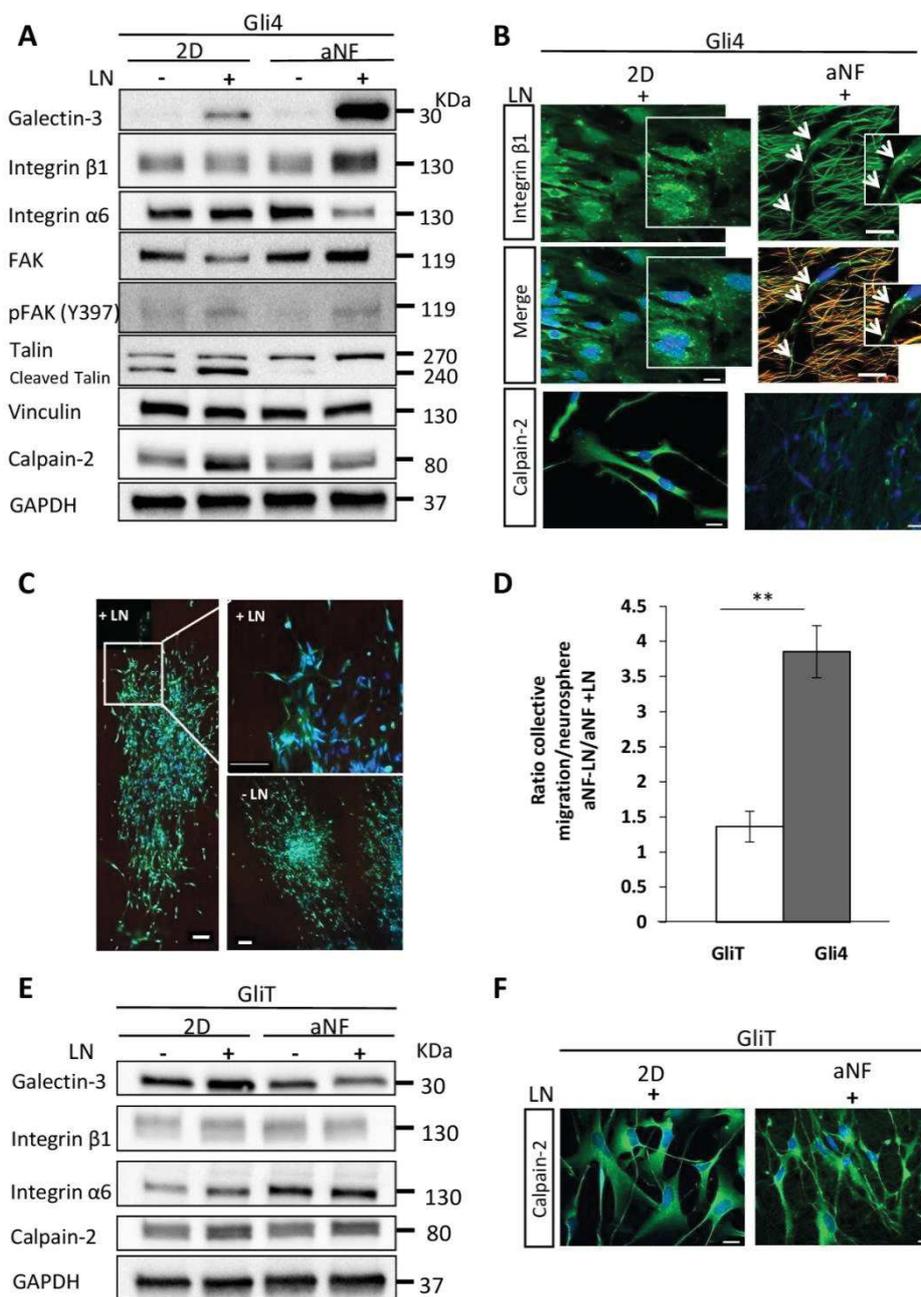


Figure 6. **Gli4 and GliT behave differently on aNF +/- LN.** aNF and 2D were either functionalized or not with laminin. After Gli4 and GliT NS seeding (5000 cells), cells were maintained in culture for six days in differentiation conditions. (A) Gli4 expression of galectin-3, integrin  $\beta$ 1, integrin  $\alpha$ 6, FAK, p-FAK (Y397), vinculin, calpain-2. (B) Gli4 immunostaining for integrin  $\beta$ 1 (green) and calpain-2 (green) (scale bar = 20 $\mu$ m).

White arrow heads indicate the Integrin  $\beta$ 1 co-localization with the fibres at the sites of attachment. (C) Although plated in presence of laminin, GliT cells migrate collectively (Piezo 1 staining in green is used as a membrane marker; scale bar = 100  $\mu$ m). (D) Quantification of collective migration between Gli4 and GliT on aNF +/-LN. (E) Ratio of the number of collective migration events in the absence or presence of laminin on aNF for Gli4 and GliT. (F) GliT expression of galectin-3, integrin  $\beta$ 1, integrin  $\alpha$  6, calpain-2. GAPDH was used as a loading control for protein normalization. Data are representative of three independent experiments, \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.01$  (Student-test). (G) Immunostaining for calpain-2 (green) of GliT cells (scale bar = 20 $\mu$ m). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). The aNF are faintly autofluorescent in red and green.

Figure 7:

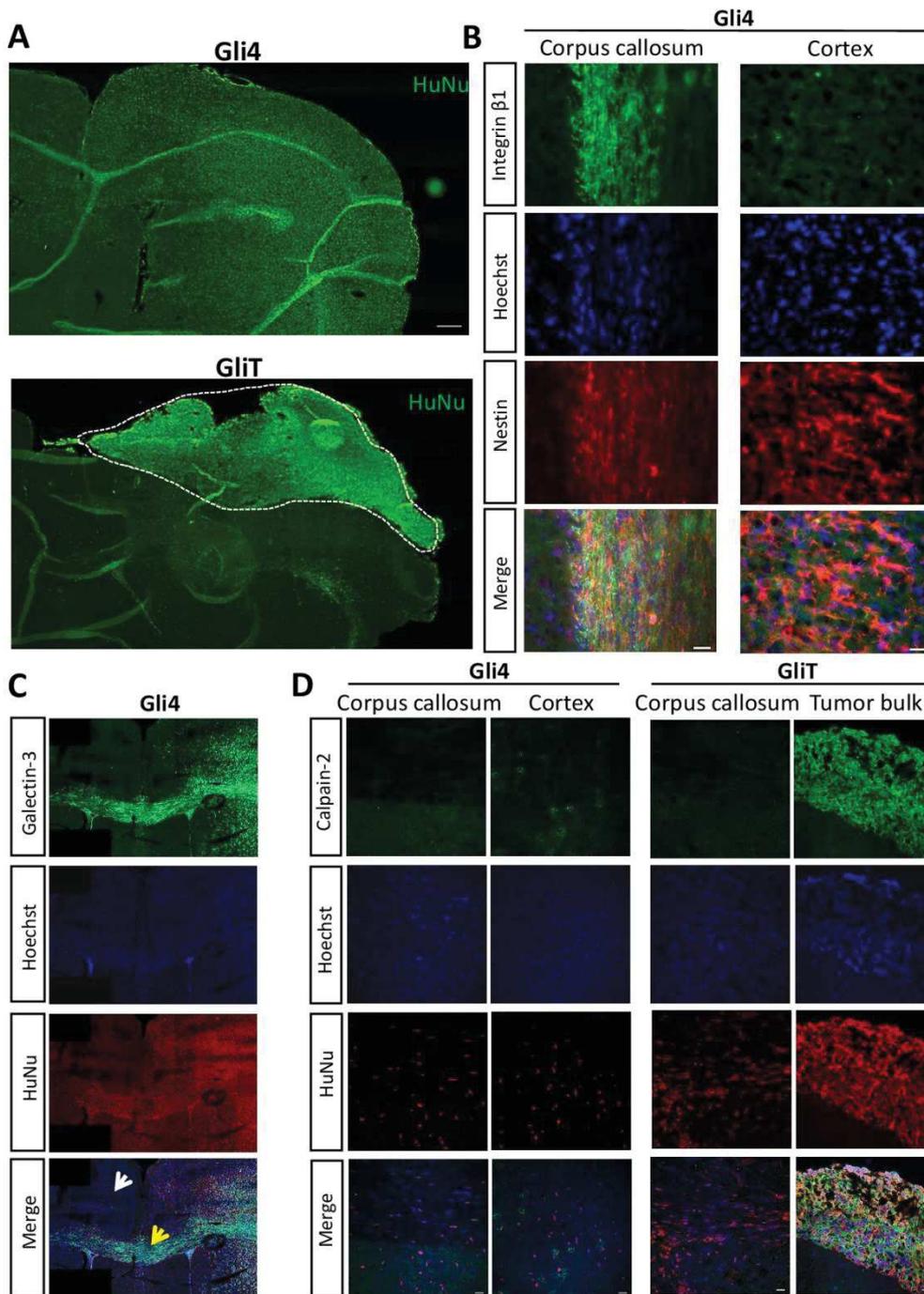
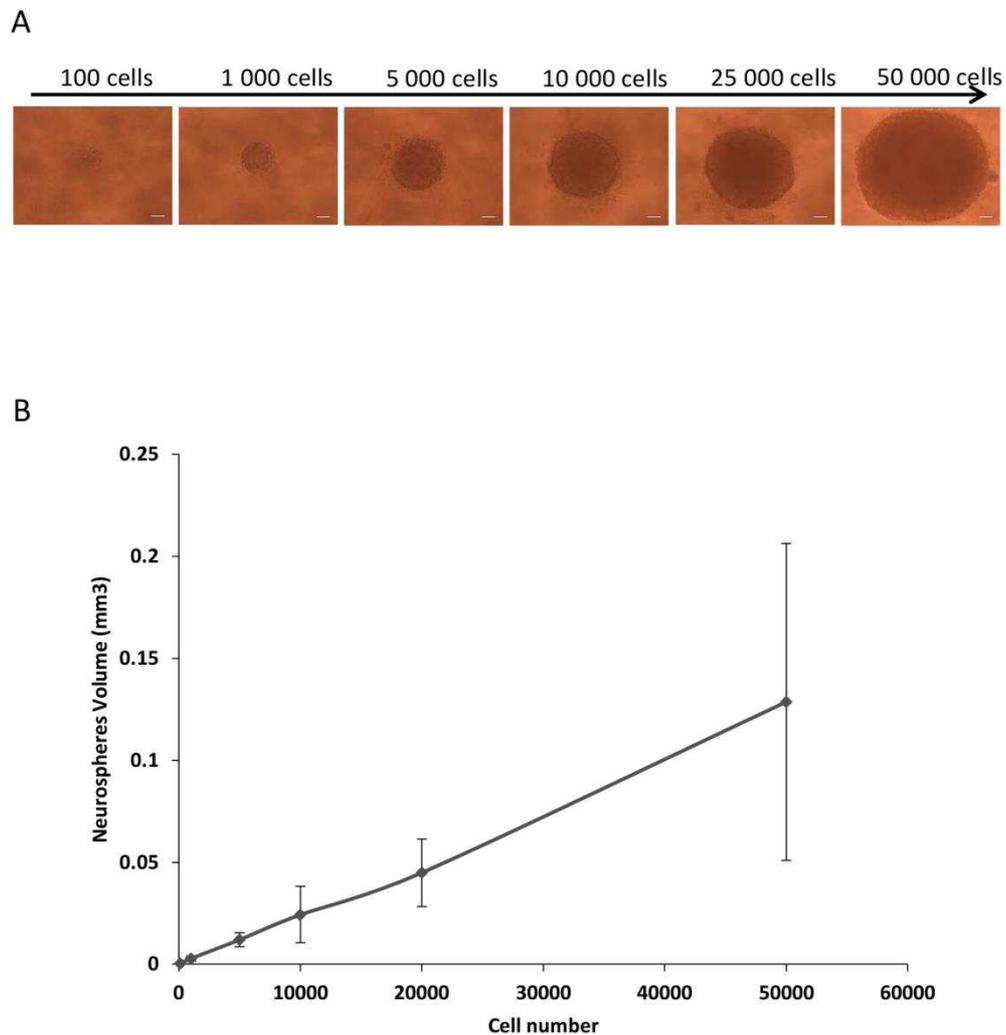


Figure 7. **Integrin  $\beta$ 1 and galectin-3 are upregulated in Gli4 cells migrating in the corpus callosum while calpain-2 is downregulated in invasive Gli4 and GliT cells.** (A) Immunostaining for human nuclei (green) show the distribution of Gli4 and GliT cells in the mouse brain (scale bar = 300  $\mu$ m). Gli4 cells are invasive, whereas GliT cells form a bulky tumour *in vivo* (white dotted area). (B) Immunostaining for integrin  $\beta$ 1) and nestin of Gli4 cells. The images represent different areas of the brain (CC, cortex) (scale bar = 20 $\mu$ m). (C) Immunostaining for galectin-3 (green) and human nuclei (red) of Gli4 cells migrating in the

cortex (white arrow) and in the CC (yellow arrow). (D) Immunostaining for calpain-2 (green) and human nuclei (red) of Gli4 and GliT cells. Scale bar = 20 $\mu$ m. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue).

**Supplementary figure S1:**



Supplementary Figure S1. **The control of the cell number and the volume of Gli4 neurospheres.** Gli4 NS containing the same number of cells and volume were obtained using Corning® ultra-low attachment microplates coated with a covalently bonded hydrogel. (A) Images of the NS formed by 100-50 000 cells, captured 24 hours after seeding. Each well contains only one NS. (B) NS volume (mm<sup>3</sup>) as a function of cell number after 24 hours of seeding (n=12 NS).

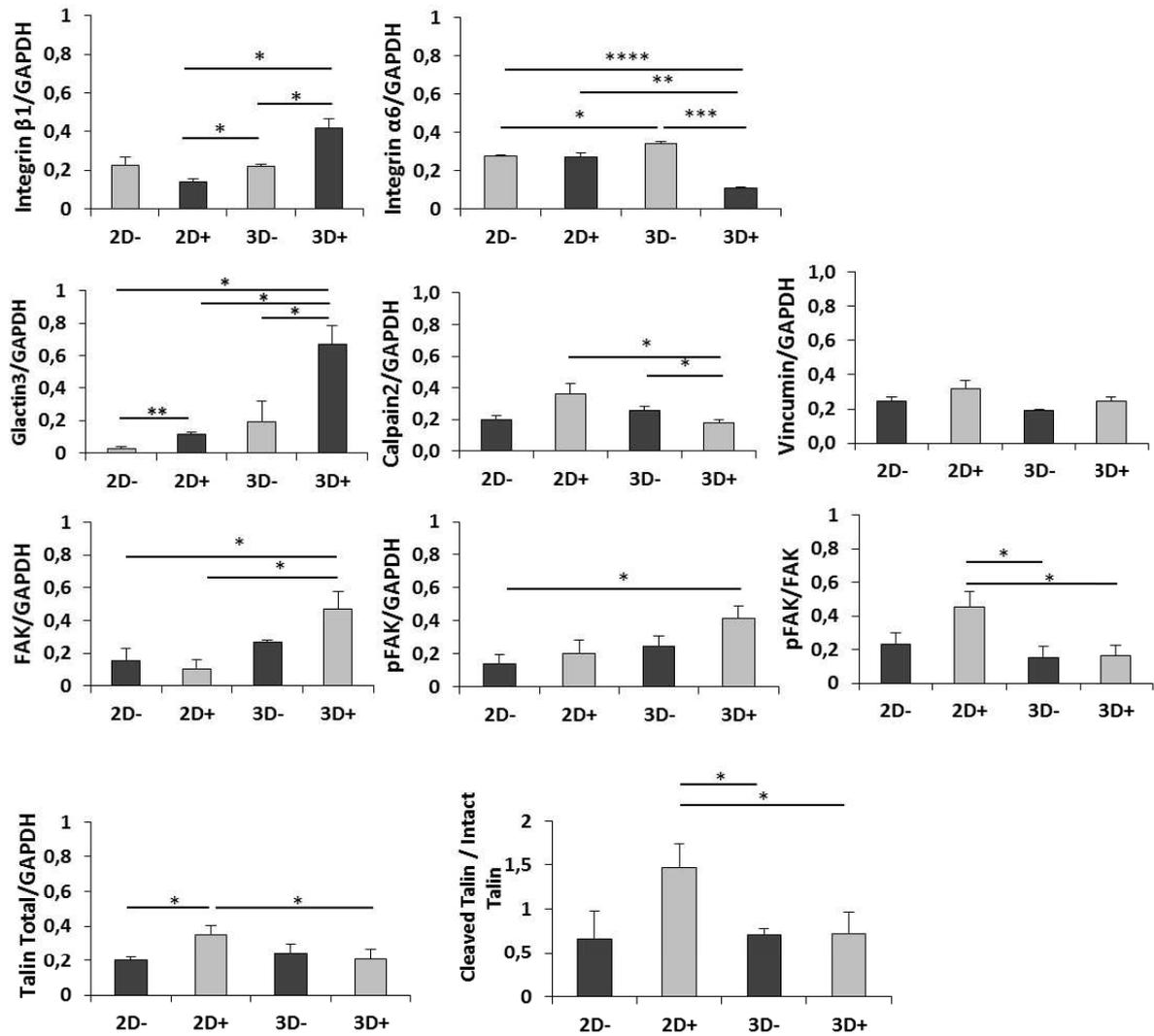
## Supplementary Table S2

<b>label protocol</b>	Biotinylated cRNA were prepared according to the Affymetrix GeneAtlas IVT PLUS protocol from 100 ng total RNA (GeneAtlas 3'IVT PLUS Technical Manual, 2013-2015, P/N703210 Rev2 Affymetrix).
<b>hyb protocol</b>	Following fragmentation, 10 ug of cRNA were hybridized for 16 hr at 45°C on the Affymetrix® U133+PM Array.
<b>wash protocol</b>	StripChips were washed and stained on the fluidic station of the Affymetrix GeneAtlas system using Hybridization Wash & Stain kit.
<b>scan protocol</b>	Microarrays were scanned using the Affymetrix GeneAtlas scanner.
<b>data processing</b>	Data were generated with Affymetrix Expression Console v 1.4.1 and GCRMA algorithm. Heatmaps were analysed with Serf software <a href="http://www.bram.org/serf/Clusters.php">http://www.bram.org/serf/Clusters.php</a> . Overrepresentation analysis was carried out on-line using the Max Planck Institute's functional annotation page: <a href="http://cpdb.molgen.mpg.de/">http://cpdb.molgen.mpg.de/</a>

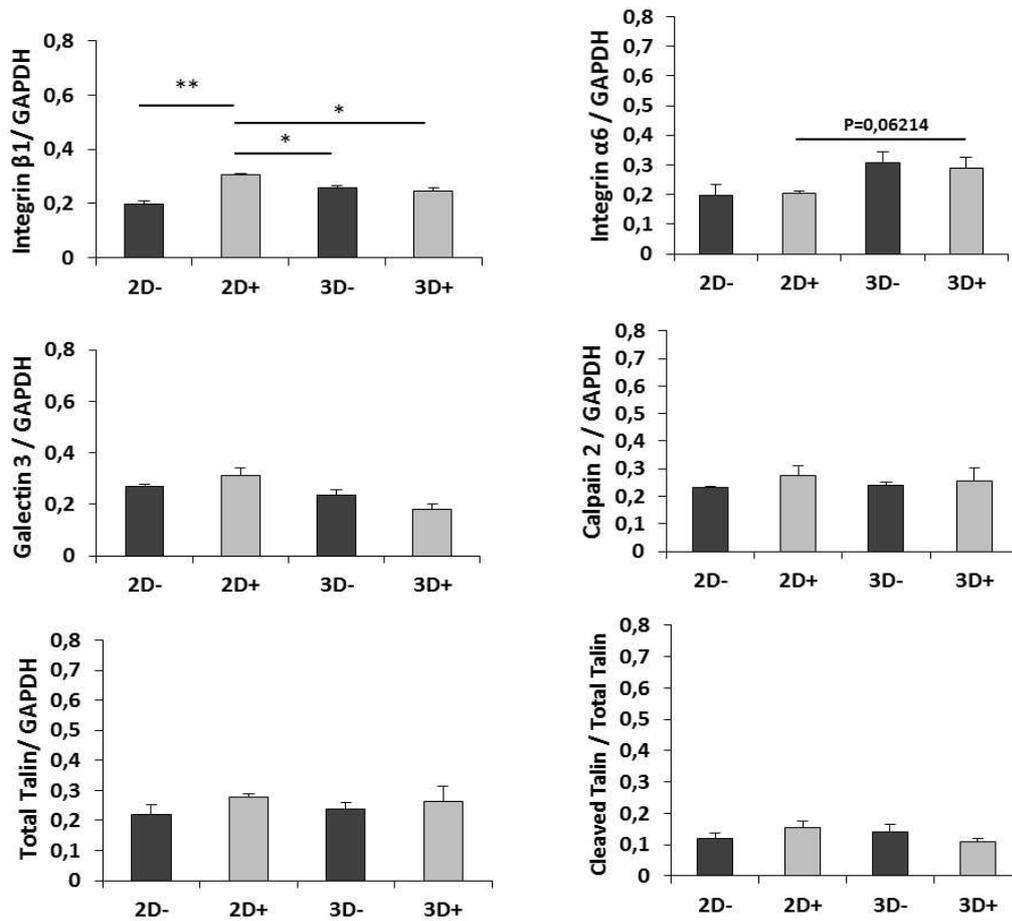
## Supplementary figure S2. Transcriptomic analysis protocol

Supplementary figure S3 :

(a) Gli4



(b) GliT



Supplementary figure S3. **Western Blot quantification** (a) Gli4, (b) GliT. Each western blot experiment was performed three times and normalised with respect to GAPDH expression. Bands were quantified using the Bio-rad chemidoc and the image lab software. Data are presented as mean +/- SEM.

Supplementary Table S4

Pathways downregulated in Gli4		Pathways upregulated in Gli4	
Name	p-value	Name	p-value
Axon guidance	1.53x10 <sup>-6</sup>	P53 signaling	3.81x10 <sup>-7</sup>
L1CAM interactions	1.38x10 <sup>-5</sup>	EGFR signaling	4.55x10 <sup>-6</sup>
TGF-beta signaling	1.16x10 <sup>-4</sup>	EGFR signaling	7.76 x10 <sup>-6</sup>
Cell adhesion	2.26x10 <sup>-4</sup>	NGF signaling	3.02x10 <sup>-5</sup>
Focal adhesion	2.31 x10 <sup>-4</sup>	SCF/KIT signaling	7.16x10 <sup>-5</sup>

Supplementary Table S4. **Transcriptomic analysis of Gli4 and GliT cells.** List of selected pathways differentially expressed in Gli4 and GliT cultured as NS in proliferation medium

**Supplementary Table S5**

Gene Name	Expression Ratio Gli4/GliT	P value
LAMA2	4.93	0.05
LAMA1	0.146	0.046
COL11A1	5.125-6.348-7.07	0.016-0.011-0.013
COL4A6	0.269	0.002
COL20A1	0.332	0.023
COL22A1	0.41	0.008
ITGA10	2.671	0.04
ITGA6	0.48	0.00044
ITGB5	0.384	0.007
L1CAM	0.032	0.00023
CAMK2N1	0.087-0.187	0.00048-0.008
MCAM	0.351	0.00050
NRCAM	0.411	0.031
CAMK2D	4.568	0.031

Supplementary Table S5. **Transcriptomic analysis of Gli4 and GliT cells.** List of ECM and cell adhesion genes differentially expressed in Gli4 and GliT cultured as NS in proliferation medium.

Supplementary Video S7. **Calcium Imaging.** After 6days of migration, GliT were incubated before acquisition with Fluo-4 AM (2mM/mL) (Invitrogen) and Pluronic (F-127) (Life technologies) in differentiation condition. Time lapse calcium imaging in Z-Stack was performed in differentiation condition using multiphoton microscopy during 45min at 37°C, 1 acquisition every 2sec at 1% laser intensity. Imaris x64 8.1.2 software has been used for image 3D reconstitution.

## References

- 1 Pickup, M. W., Mouw, J. K. & Weaver, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* **15**, 1243-1253, doi:10.15252/embr.201439246 (2014).
- 2 Akhmanova, M., Osidak, E., Domogatsky, S., Rodin, S. & Domogatskaya, A. Physical, Spatial, and Molecular Aspects of Extracellular Matrix of In Vivo Niches and Artificial Scaffolds Relevant to Stem Cells Research. *Stem Cells Int* **2015**, 167025, doi:10.1155/2015/167025 (2015).
- 3 Shologu, N. *et al.* Recreating complex pathophysiologies in vitro with extracellular matrix surrogates for anticancer therapeutics screening. *Drug Discov Today* **21**, 1521-1531, doi:10.1016/j.drudis.2016.06.001 (2016).
- 4 Fraley, S. I., Feng, Y., Giri, A., Longmore, G. D. & Wirtz, D. Dimensional and temporal controls of three-dimensional cell migration by zyxin and binding partners. *Nat Commun* **3**, 719, doi:10.1038/ncomms1711 (2012).
- 5 Beliveau, A., Thomas, G., Gong, J., Wen, Q. & Jain, A. Aligned Nanotopography Promotes a Migratory State in Glioblastoma Multiforme Tumor Cells. *Sci Rep* **6**, 26143, doi:10.1038/srep26143 (2016).
- 6 Herrera-Perez, M., Voytik-Harbin, S. L. & Rickus, J. L. Extracellular Matrix Properties Regulate the Migratory Response of Glioblastoma Stem Cells in Three-Dimensional Culture. *Tissue Eng Part A* **21**, 2572-2582, doi:10.1089/ten.TEA.2014.0504 (2015).
- 7 Cha, J., Kang, S. G. & Kim, P. Strategies of Mesenchymal Invasion of Patient-derived Brain Tumors: Microenvironmental Adaptation. *Sci Rep* **6**, 24912, doi:10.1038/srep24912 (2016).
- 8 Doyle, A. D., Carvajal, N., Jin, A., Matsumoto, K. & Yamada, K. M. Local 3D matrix microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions. *Nat Commun* **6**, 8720, doi:10.1038/ncomms9720 (2015).
- 9 Cuddapah, V. A., Robel, S., Watkins, S. & Sontheimer, H. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci* **15**, 455-465, doi:10.1038/nrn3765 (2014).
- 10 Maeda, N. Proteoglycans and neuronal migration in the cerebral cortex during development and disease. *Front Neurosci* **9**, 98, doi:10.3389/fnins.2015.00098 (2015).
- 11 Gritsenko, P., Leenders, W. & Friedl, P. Recapitulating in vivo-like plasticity of glioma cell invasion along blood vessels and in astrocyte-rich stroma. *Histochem Cell Biol* **148**, 395-406, doi:10.1007/s00418-017-1604-2 (2017).
- 12 Claes, A., Idema, A. J. & Wesseling, P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol* **114**, 443-458, doi:10.1007/s00401-007-0293-7 (2007).
- 13 Janik, M. E., Litynska, A. & Vereecken, P. Cell migration-the role of integrin glycosylation. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 545-555, doi:10.1016/j.bbagen.2010.03.013 (2010).
- 14 Friedl, P., Locker, J., Sahai, E. & Segall, J. E. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* **14**, 777-783, doi:10.1038/ncb2548 (2012).
- 15 Serres, E. *et al.* Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane in vitro and orthotopic tumor growth in mice. *Oncogene* **33**, 3451-3462, doi:10.1038/onc.2013.305 (2014).
- 16 Osswald, M. *et al.* Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature* **528**, 93-98, doi:10.1038/nature16071 (2015).
- 17 Donnet, J. B., Wang, T. K., Rebouillat, S. & Peng, J. C. M. *Carbon Fibers, 3rd Ed.* . (Marcel Dekker Inc : New York, NY, USA, 1998).

- 18 Huang, X. Fabrication and Properties of Carbon Fibers. *Materials* **2**, 2369-2403, doi:doi:10.3390/ma2042369 (2009).
- 19 Both Engel, A. *et al.* Electrospun Carbon Fibres: Promising Electrode Material for Abiotic and Enzymatic Catalysis. *J. Phys. Chem. C* **119**, 16724-16733 (2015).
- 20 Kallenberg, K. *et al.* Glioma infiltration of the corpus callosum: early signs detected by DTI. *J Neurooncol* **112**, 217-222, doi:10.1007/s11060-013-1049-y (2013).
- 21 Coleman, M. M. & Petcavich, R. J. Fourier Transform Infrared Studies on the Thermal Degradation of Polyacrylonitrile *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition* **16**, 821-832 (1978).
- 22 Wu, M., Wang, Q., Li, K., Wu, Y. & Liu, H. Optimization of stabilization conditions for electrospun polyacrylonitrile nanofibers. *Polymer Degradation and Stability* **97**, 1511-1519 (2012).
- 23 Liewald, D., Miller, R., Logothetis, N., Wagner, H. J. & Schuz, A. Distribution of axon diameters in cortical white matter: an electron-microscopic study on three human brains and a macaque. *Biol Cybern* **108**, 541-557, doi:10.1007/s00422-014-0626-2 (2014).
- 24 Monzo, P. *et al.* Mechanical confinement triggers glioma linear migration dependent on formin FHOD3. *Mol Biol Cell* **27**, 1246-1261, doi:10.1091/mbc.E15-08-0565 (2016).
- 25 Guichet, P. O. *et al.* Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. *Glia* **61**, 225-239, doi:10.1002/glia.22429 (2013).
- 26 Hassani, Z. *et al.* Phostine PST3.1a Targets MGAT5 and Inhibits Glioblastoma-Initiating Cell Invasiveness and Proliferation. *Mol Cancer Res* **15**, 1376-1387, doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0120 (2017).
- 27 De Pascalis, C. & Etienne-Manneville, S. Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Mol Biol Cell* **28**, 1833-1846, doi:10.1091/mbc.E17-03-0134 (2017).
- 28 Hughes, R. C. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* **83**, 667-676 (2001).
- 29 Parsons, J. T., Horwitz, A. R. & Schwartz, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 633-643, doi:10.1038/nrm2957 (2010).
- 30 Manninen, A. & Varjosalo, M. A proteomics view on integrin-mediated adhesions. *Proteomics* **17**, doi:10.1002/pmic.201600022 (2017).
- 31 Fraley, S. I. *et al.* A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility. *Nat Cell Biol* **12**, 598-604, doi:10.1038/ncb2062 (2010).
- 32 Franco, S. J. *et al.* Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol* **6**, 977-983, doi:10.1038/ncb1175 (2004).
- 33 Chi, M. *et al.* Phosphorylation of calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II at T286 enhances invasion and migration of human breast cancer cells. *Sci Rep* **6**, 33132, doi:10.1038/srep33132 (2016).
- 34 Wu, J. *et al.* Electrospun nanoyarn scaffold and its application in tissue engineering. *Materials Letters* **89**, 146-149 (2012).
- 35 Morita, K. *et al.* CHARACTERIZATION OF COMMERCIALY AVAILABLE PAN (POLYACRYLONITRILE)-BASED CARBON FIBERS. *Pure & Appl. Chem.* **58**, 455-468 (1986).
- 36 Rahaman, M. S. A., Ismail, A. F. & Mustafa, A. A review of heat treatment on polyacrylonitrile fiber. *Polymer Degradation and Stability* **92**, 1421-1432 (2007).
- 37 Tysnes, B. B. *et al.* Stimulation of glioma-cell migration by laminin and inhibition by anti-alpha3 and anti-beta1 integrin antibodies. *Int J Cancer* **67**, 777-784, doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960917)67:6<777::AID-IJC5>3.0.CO;2-O (1996).

- 38 Lathia, J. D. *et al.* Laminin alpha 2 enables glioblastoma stem cell growth. *Ann Neurol* **72**, 766-778, doi:10.1002/ana.23674 (2012).
- 39 Elisha, Y., Kalchenko, V., Kuznetsov, Y. & Geiger, B. Dual role of E-cadherin in the regulation of invasive collective migration of mammary carcinoma cells. *Sci Rep* **8**, 4986, doi:10.1038/s41598-018-22940-3 (2018).
- 40 Beadle, C. *et al.* The role of myosin II in glioma invasion of the brain. *Mol Biol Cell* **19**, 3357-3368, doi:10.1091/mbc.E08-03-0319 (2008).
- 41 Zhong, J., Paul, A., Kellie, S. J. & O'Neill, G. M. Mesenchymal migration as a therapeutic target in glioblastoma. *J Oncol* **2010**, 430142, doi:10.1155/2010/430142 (2010).
- 42 Rayavarapu, R. R. *et al.* The role of multicellular aggregation in the survival of ErbB2-positive breast cancer cells during extracellular matrix detachment. *J Biol Chem* **290**, 8722-8733, doi:10.1074/jbc.M114.612754 (2015).
- 43 Hou, J. M. *et al.* Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am J Pathol* **178**, 989-996, doi:10.1016/j.ajpath.2010.12.003 (2011).
- 44 Lu, W. *et al.* Posttranscriptional regulation of Galectin-3 by miR-128 contributes to colorectal cancer progression. *Oncotarget* **8**, 15242-15251, doi:10.18632/oncotarget.14839 (2017).
- 45 Qin, Q., Wei, F., Zhang, J. & Li, B. miR-134 suppresses the migration and invasion of nonsmall cell lung cancer by targeting ITGB1. *Oncol Rep* **37**, 823-830, doi:10.3892/or.2017.5350 (2017).
- 46 Barboni, E. A., Bawumia, S. & Hughes, R. C. Kinetic measurements of binding of galectin 3 to a laminin substratum. *Glycoconj J* **16**, 365-373 (1999).
- 47 Lagana, A. *et al.* Galectin binding to Mgat5-modified N-glycans regulates fibronectin matrix remodeling in tumor cells. *Mol Cell Biol* **26**, 3181-3193, doi:10.1128/MCB.26.8.3181-3193.2006 (2006).
- 48 Xin, M., Dong, X. W. & Guo, X. L. Role of the interaction between galectin-3 and cell adhesion molecules in cancer metastasis. *Biomed Pharmacother* **69**, 179-185, doi:10.1016/j.biopha.2014.11.024 (2015).
- 49 Babel, L., Grunewald, M., Lehn, R., Langhans, M. & Meckel, T. Direct evidence for cell adhesion-mediated radioresistance (CAM-RR) on the level of individual integrin beta1 clusters. *Sci Rep* **7**, 3393, doi:10.1038/s41598-017-03414-4 (2017).
- 50 Rodrigues, J. G. *et al.* Glycosylation in cancer: Selected roles in tumour progression, immune modulation and metastasis. *Cell Immunol*, doi:10.1016/j.cellimm.2018.03.007 (2018).
- 51 Jang, H. S., Lal, S. & Greenwood, J. A. Calpain 2 is required for glioblastoma cell invasion: regulation of matrix metalloproteinase 2. *Neurochem Res* **35**, 1796-1804, doi:10.1007/s11064-010-0246-8 (2010).
- 52 Dromard, C. *et al.* Adult human spinal cord harbors neural precursor cells that generate neurons and glial cells in vitro. *J Neurosci Res* **86**, 1916-1926, doi:10.1002/jnr.21646 (2008).
- 53 Clarion, L. *et al.* Oxaphosphinanes: new therapeutic perspectives for glioblastoma. *J Med Chem* **55**, 2196-2211, doi:10.1021/jm201428a (2012).





## Partie II :

*Modulation de la rigidité d'une matrice tridimensionnelle de nanofibres impactant les comportements migratoires des GSC et étude de l'implication de la GnT-V dans la mécanotransduction et l'EMT.*

# Introduction

Lors de leur migration au travers des tissus cérébraux sains, les GSC rencontrent de nombreuses propriétés modifiées de leur micro-environnement telles que des modifications biochimiques ou topographiques de leur substrat comme nous l'avons traité précédemment. De plus elles se voient influencées par d'autres propriétés mécaniques rencontrées, telles que la rigidité du microenvironnement. Il est bien documenté que la rigidité impacte fortement la migration, l'agressivité et l'invasivité dans divers types de cancers et ce phénomène est également observable dans le cas des cellules souches de glioblastomes (Umesh et al. 2014b) (Ulrich, De Juan Pardo, and Kumar 2009a). En effet, il est classiquement décrit que plus la surface est rigide, plus les cellules sont invasives et il est couramment observé *in vivo* une augmentation de la rigidité en intra et péri-tumoral (Gkretsi and Stylianopoulos 2018).

Dans ce contexte, nous avons développé de nouvelles matrices de nanofibres de PAN dont nous avons pu moduler seulement les propriétés mécaniques via l'ajout de nanotubes de carbones multi-parois (MWCNT). Cet ajout a permis l'obtention d'une gamme de rigidité comprenant les valeurs moyennes de 3,2kPa 166kPa, 542 kPa et 1260 kPa. Nous avons ensuite observé les comportements migratoires sur ces différentes matrices et les expressions protéiques en résultant. Nous avons pu par ce moyen observer l'influence de ces rigidités sur l'EMT et les adhérences focales.

Les adhérences focales sont connues pour être largement impliquées dans la mécano-transduction via leur capacité, une fois clustérisées, d'envoyer l'information mécanique venant de l'extérieur au cytosquelette. L'augmentation de la rigidité quant à elle, est connue pour augmenter le nombre, la taille et la dynamique des adhérences focales et avoir une influence forte sur l'augmentation de l'EMT.

La MGAT5 de son côté est une protéine largement impliquée dans l'EMT et les adhérences focales et sa surexpression ont été corrélées à la malignité, la migration et l'invasivité. Le motif  $\beta$ 1,6 GlcNAc a été vu comme très impliqué dans l'hétéro-dimérisation des intégrines (au niveau du couple  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 notamment, impliqué dans l'augmentation de l'agressivité) et la galectine 3 reconnaissant ce motif, a été vue comme permettant la formation d'un treillis induisant la clustérisation des intégrines, favorisant leur activation et ainsi la formation des adhérences focales.

Néanmoins le lien MGAT5 / mécano-transduction, permettant de mettre en lumière un potentiel lien entre la glycosylation et la perception de l'environnement mécanique n'a jusque-là jamais été rapporté.

Enfin, les études précédentes de l'équipe avaient mis en évidence qu'avec l'ajout d'un inhibiteur sélectif de la MGAT5, appelé phostine, il y avait un effet anti-migratoire dès l'utilisation au nM (avec apparition en plus d'effet anti-prolifératif dès l'utilisation au  $\mu$ M) (Hassani et al. 2017). L'utilisation de cet inhibiteur avait également permis la mise en évidence de la diminution de la galectine 3 en même temps que l'inhibition de la MGAT5 par la phostine et l'apparition d'un phénomène d'inhibition de contact que nous retrouverons également dans mes travaux.



## **MGAT5 promotes highly invasive phenotype of GSCs induced by optimal stiffness.**

Emilie Marhuenda, Martà Martin-Fernandez, Alexandra Ott, Hervé de Laborde de Montpezat, Christine Fabre, Jan De Weille, Jacques Vignon, Jean-Philippe Hugnot, Hugues Duffau, Luc Bauchet, David Cornu, Norbert Bakalara

### **Abstract :**

Glioblastoma stem cells (GSCs) are sensitive to the stiffness of their environment. They use mechanical properties of the microenvironment to optimize invasion and thus penetrate far into the brain parenchyma whereby they escape resection and localized radiation therapy. Since the invasive properties of GSCs are to a large extent determined by the rigidity of the 3-dimensional topography of their microenvironment, we developed an artificial *in-vitro* 3D fibrillary tissue mimicking the *in-vivo* conditions. We designed 3D electrospun fibers with different stiffnesses to study the influence of mechanical properties of the support on GSC migration. We determined that migration of GSCs was highest at an intermediate stiffness characterized by a Young's modulus of 166 kPa as compared to tissue with moduli of 3.2 kPa, 542kPa and 1260 kPa. Migration rate was correlated with cell shape (spindle vs spread-out), expression of proteins implied in the Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) as well as regulation of focal adhesion proteins.

Mannoside acetyl glucosaminyltransferase 5 (MGAT5) overexpression is a feature of malignant tumors. The enzyme is implied in the clustering of membrane proteins forming focal adhesions and in cell migration and EMT. We demonstrate that knock-out of the MGAT5 gene causes a drastic reduction of migration on tissue with the intermediate stiffness of 166 kPa associated with a decrease in focal adhesion maturation and EMT, but not on other tissues. We'll argue that MGAT5-mediated glycosylation is at the heart of mechanotransduction by glioblastoma cells.

### **Introduction**

Current standard of care against glioblastoma (GBM) including surgery, chemotherapy and radiotherapy have limited efficacy on the overall patient survival expectancy. Invasive tumor cells, called glioblastoma stem cells (GSC), disseminate within the normal brain parenchyma (1), escaping surgical resection, resisting localized radiation and chemo-therapies, and are responsible for the fatal outcome. Initially observed by Scherer (1938) (2), clinical observations demonstrate that glioma cells preferentially migrate in fibrous areas (1)(3).

Increased tissue stiffness is a distinctive feature of many diseases, including cancer. During its growth, glioma increases brain compression and glioma tissue becomes stiffer than healthy brain (4). Stiffness increase can be induced by growth itself or by surrounding tissue (5). Therefore, during cell migration, glioma cells have to

distort their nucleus (6) and to importantly change their shape and volume (7)(8) to migrate through healthy brain parenchyma or parenchyma under compression.

GSCs have been reported to be sensitive to the mechanical properties of the surrounding tissue/microenvironment (pressure, confinement, fiber diameter and tissue rigidity) and to use the microenvironment stiffness to enhance invasion (9)(10). They can thus perceive their physical microenvironment and translate it by mechanical membrane deformation into mechanotransduction pathways implicated in tumor progression (11). Therefore, mechanical properties of the extracellular matrix (ECM) are important during tumor progression (12) and ECM rigidity is known to increase migration velocity in GSCs (13).

Desmoplasia is caused by the increase of ECM proteins secreted by cancer cells during tumor progression. This fibrotic process *in vivo* promotes the orientation of ECM fibers proteins and increases stiffness of microenvironment. It is associated with an increase of growth factor production (14). Organized ECM orientation characterizes the tumor environment and poor prognostic (15)(16). In addition, it has been observed in *in vitro* studies that fibroblasts obtained from tumors generate a linear and parallel alignment of ECM fibers (17). The natural ECM fibrillar architecture is critical for 3D mechanosignaling events such as focal adhesion (FA) formation (18) and fiber alignment has therefore been reported to greatly influence migration (17)(19)(16).

The epithelial to mesenchymal transition (EMT) allows cancer cells to undergo multiple changes to assume a mesenchymal cell phenotype, including an increase of migratory abilities, resistance to apoptosis, radioresistance and production of ECM components. This process is mediated by the activation of transcription factors like Zinc-finger E-box binding 1 (Zeb1), the expression of specific cell-surface proteins, including N-cadherin (20), and the production of ECM-degrading enzymes. In addition, reorganization and expression of cytoskeletal proteins and reduced cellular adhesion contribute to EMT (21)(22).

Generally speaking, cells perceive mechanical properties of the extracellular microenvironment through focal adhesions proteins like integrins and cadherins (22). Consequently, matrix elasticity of tissue microenvironment sustains great changes during tumor progression, such as in focal adhesion dynamics (23) and thus contributes to EMT (24). The latter is possibly due to a stiffness-induced shift of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF  $\beta$ 1) from an apoptosis inducer to an EMT promoter (25). Calpain 2, intracellular calcium-dependent cysteine protease, is greatly involved in these focal adhesion dynamics. It targets specific adhesion proteins to inhibit or modulate their function by promoting the proteolytic activity of talin after a local increase of cytosolic calcium (26)(27). Moreover, it has been shown that Calpain increases activation of TGF  $\beta$ 1 (28).

Mannoside acetyl glucosaminyltransferase 5 (MGAT5) is an enzyme that catalyzes the addition of  $\beta$ 1,6 GlcNAc- branched N-glycans on proteins (29). Glycosylated patterns on membrane proteins are then recognized by galectin 3 and form a lattice between focal adhesion proteins allowing their coherence and

maturation (30). This process is associated with actin microfilament remodeling and cell-substrate adhesion (31). MGAT5 overexpression is associated with malignant tumors and early gliomagenesis (32). It is involved in the clustering of membrane proteins through lattice formation, in focal adhesions (30), cell migration, invasion, epithelial–mesenchymal transition (EMT) resulting in advantages for tumor cells (33).

In this context, we developed an artificial 3D fibrillary tissue which causes *in vitro* migration behavior that recapitulates the migration observed *in vivo* (*ref papier Ali*). We designed a 3D electrospun poly acrylonitrile (PAN) nanofibers (NF) scaffold with aligned fibers to study the influence of the morphological and mechanical properties of the substrate on GSC migration. By adding multiwall carbon nanotube (MWCNT) in the polymer, we modulated the rigidity, ranging from 3.2 to 1260kPa. In contrast to our previous approach, we decided not to functionalize the 3D network with laminin to observe the impact of the mechanical properties alone, separated from the support's chemical properties. The objective is to prevent influencing the migratory behavior which depends on the ECM protein (34).

Glioblastoma stem cell neurospheres (NSs) were plated on the artificial 3D tissue. This support allowed us to determine the correlation between physical parameters, migration behavior, EMT and expression of focal adhesion proteins.

In view of the common impacts of MGAT5 and stiffness on EMT and the regulation of cell-ECM adhesion proteins, we generated MGAT5 KO CRISPR Cas9 GSCs. We then cultured them on our 3D artificial fibrillary tissue of various stiffnesses to observe the expression profiles of EMT and focal adhesion proteins compared to wild type (WT) GSCs and we observed MGAT5's implication on mechanotransduction.

### **Materials and Methods:**

**Nanofibers 3D matrix:** PAN nanofibers were produced by electrospinning using a solution of 10% PAN dissolved in DMF. For the fabrication of the NF scaffold, a needle was used to project the polymer which was collected on a rotating mandrel located at a distance of 15 cm from the source. A voltage of 20 kV was applied. To produce aligned NF, the polymer was collected on a circular collector rotating at 2000 rpm. To achieve changes in mechanical properties, multiwall carbon nanotubes (Nanocyl, 95% purity) were added in a 10% PAN solution and solubilized by adding Triton x100 at a ratio of 2,5%wt for 0,05%wt MWCNTs. Then, NF were stabilized and mineralized by heat treatment and finally sterilized before use.

**Atomic Force Microscopy (AFM):** The AFM experimental system used for force-spectroscopy measurements was an Asylum MFP-3D head coupled to a Molecular Force Probe 3D controller (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA). Triangular silicon nitride cantilevers (MLCT, Veeco) with a nominal spring constant of 10 pN/nm and half-opening angle of 35° were used. The probe has a nominal length of 310 μm, width of 20 nm, and resonance frequency of 7 kHz. Prior to each experiment, the cantilever spring constant was determined in liquid using the thermal noise method available within the MFP-3D software. Samples were glued to a Petri dish by means of carbon conductive double-faced adhesive tape, in order to

minimize electrostatic interactions between the AFM tip and the sample, and covered with 2ml of deionized water. After testing a range of loading forces on the sample surface, the measurements were performed in liquid and at room temperature with a maximum loading force of  $\sim 300$  pN corresponding to a maximal indentation depth of 120 nm. Higher loading force values (up to 1 nN) led to a stiffness overestimation due to a possible influence of the substrate.

The elastic deformation was obtained from the force curves as a function of the loading force applied by the tip. Young's modulus (E) was calculated for each force from the approaching part of the force curves as the recorded force curves exhibited hysteresis that shows the viscoelastic behavior of the sample (35), following a modified Hertz model (36), based on the work of Sneddon (37) and further developed for different AFM tip shapes (38)(39), as described elsewhere (40). A constant approach velocity of  $6 \mu\text{m/s}$  was chosen, meaning a piezo-extension rate of 3 Hz to minimize hydrodynamic and viscoelastic artifacts (41). The Poisson's ratio of the cells was assumed to be 0.5, as suggested for incompressible materials (42).

**Cell culture and transfection:** GBM cells isolation and primary cell culture were realized using the classical non-adherent NS protocol established by Guichet *et al* (43) based on the work of Dromard *et al* (44). GBM cells were cultured in two different conditions in DMEM/F12 medium supplemented with glucose, glutamine, insulin, N2 and ciprofloxacin. In the "proliferation" non-adherent condition, the culture flasks were pre-coated with poly-2-hydroxyethyl methacrylate (poly-HEME, Sigma) and the medium was also supplemented with EGF (Epidermal Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), gentamycin, heparin, fungizone, fungin and B27. In this condition, GBM cells form neurospheres (NS) reminiscent of NSC (Neural Stem Cells) *in vitro*, express neural progenitors and stem cells markers (nestin, olig2, sox2 etc.), self-renew and propagate tumors to immunocompromised animals. After confluence, the NS were dissociated mechanically using HBSS (without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ ) and reseeded. In the "differentiation" condition, also called "migration media", the DMEM/F12 medium was supplemented with fetal bovine serum (0.5%), fungizone and B27. For this latter condition, GBM cells were cultured in adherence on 2D planar surfaces (PS) or 3D nanofibers of various stiffnesses. The NS remained in culture during 5 days at  $37^\circ\text{C} / 5\%\text{CO}_2$ .

To obtain NS with the same size, we used Corning® 96 well round bottom ultra-low attachment microplates coated with a covalently bond hydrogel (Corning 7007). Dissociated GBM NS cultured in proliferation condition, were seeded at 7500 cells per well and remained in culture during 6 days until formation of single neurosphere due to sedimentation

GSCs transfection was done through electroporation with Amaxa Mouse Neural Stem Cell Nucleofector with proper program. The transfection was achieved by adding  $1 \mu\text{g}$  of CRISPR Cas 9 plasmid (Santa Cruz) for one million cells. Transfected plasmid contained GFP which allowed us to sort only green cells (by *Fluorescence-activated cell sorting* technic) and to deposit one cell by well in Corning® 96 wells round bottom ultra-low attachment microplates. After proliferation until the formation of a single neurosphere, GSCs were amplified and characterized by sequencing and western blot analysis.

**MTT test:** Thirty thousand cells dissociated were seeded on NF of various stiffnesses or on PS. After 5 migration days, 0.5µg/µl of MTT (Sigma) was added in the media during 3 hours at 37°C/5%CO<sub>2</sub>. DMSO (sigma) was then added and the media was transferred in 96 wells plates to be analyzed by a Clariostar microplate reader.

**Cellular growth analysis:** Ten thousand cells were seeded in 96 wells plates pre-coated with poly-2-hydroxyethyl methacrylate (poly-HEME, Sigma), and counted daily with Z2 counter (Beckman Coulter). Before counting, GSC were dissociated with Trypsin 2.5%/EDTA (10mM) and incubated 10min at 37°C/5%CO<sub>2</sub> before particle counting.

**Immunostaining:** After 5 days of culture, Gli4 on NF or PS were fixed by a solution of 4% of PFA . Cells were blocked and permeabilized using a solution of PBS - triton 0.5% - horse serum 5%. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. The antibodies used in immunofluorescence were: N-Cadherin (D4R1H) (Cell Signaling 13116S), Vinculin (Sigma Aldrich V9264), ZO-1 (D7D12) (Cell Signaling 8193S), TCF8/ZEB1 (D80D3) (Cell Signaling 3396S), Calpain-2 (abcam ab155666) and Integrin β1 (Millipore AB1952). Fluorochrome-coupled secondary antibodies (1/500) were incubated 2 hours at room temperature. The actin cytoskeleton was stained with phalloidin and cell nuclei with Hoechst 33342. NF and coverslips with GSCs NS were mounted in fluoromount medium.

**Microscopy:**Image capturing and Z-stack acquisition were performed using Confocal 2 Zeiss LSM 5 Live DUO and Widefield 1 – Zeiss Axioimager Z1/ Zen (with an apotome) microscopes. Imaris x64 8.1.2 software has been used for 3D image reconstitution. Quantifications were done using ZEN software. SEM images were performed using Hitachi S4800, Zeiss EVO HD15.

**Western Blot:** Proteins were extracted by submerging the NF in RIPA buffer (+ phosphatase/protease inhibitors). Protein lysate were separated by SDS-PAGE. PVDF membranes were blocked by TBS-Tween 0.1% - milk 5%. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. The antibodies used in western blot are: N-Cadherin (D4R1H) (Cell Signaling 13116S), Vimentin (D21H3) (Cell Signaling 5741S), βCatenin (D10A8) (Cell Signaling 8480S), ZO-1 (D7D12) (Cell Signaling 8193S), TCF8/ZEB1 (D80D3) (Cell Signaling 3396S), Calpain-2 (abcam ab155666) Galectin-3 (abcam ab2785), Integrin β1 (Millipore AB1952), Talin1/2 (abcam ab11188) and GAPDH as a loading control (Millipore MAB374). Horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies were incubated 2 hours at room temperature. The Chemidoc XRS+ imager was used for chemi-luminescence detection. The pixel quantifications were done using Image Lab software.

**Sequencing:** Genomic DNA amplification of MGAT5 gene have been done by PCR. Amplified DNA were purified using ExoSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase). The sequence reaction was done using BigDye and then purified once again before formamide addition.

**Statistical analysis:** Forces were analyzed using the Asylum Research software. All data are reported as mean ± standard error of the mean. One-way ANOVA test was used for comparison between samples, or t.test for two samples comparison. Statistical analysis of the data was performed on Prism GraphPad.

## **Results:**

### ***Characterization of 3D NF matrix with MWCNTs***

To follow the effects of fibers fabrication on their nanomechanical properties, we performed AFM spectroscopy.

The average Young's moduli of control, 0.0015% WT MWCNT + 0.007% WT triton, 0.00625% WT MWCNT+ 0.3125% WT triton and 0.05% WT MWCNT+ 2.5% WT triton fibers are the following:  $3.2 \pm 1.9$  kPa,  $166 \pm 29$  kPa,  $542 \pm 90$  kPa and  $1260 \pm 430$  kPa, respectively. Our results, gathered in Fig.1 A, show a dramatic increase in the Young modulus as a function of MWCNT and triton content. Samples will be renamed henceforth as S3.2, S166, S542 and S1260. The elasticity of the four samples is significantly different ( $p < 0.01$ , one-way ANOVA test).

Force curves, as the one presented in Supplementary 1 (A5, B5, C5, D5), were measured on four samples, control, 0.0015% WT MWCNT + 0.007% WT triton, 0.00625% WT MWCNT+ 0.3125% WT triton and 0.05% WT MWCNT+ 2.5% WT triton, to investigate fiber elasticity that is related mainly to intrinsic properties (percentage of MWCNT and triton).

The electrospinning technic allowed us to create a 3D matrix of nanofibers enabling a confinement situation (Fig. 1). Indeed, the porosity distribution was found between  $0.5 \mu\text{m}^2$  and  $7 \mu\text{m}$  (45). The addition of MWCNTs did not change the porosity distribution (Fig. 1D). Besides, this didn't alter the fibers' rugosity or diameter (Figure 1B and C) indicating that MWCNTs were located inside the PAN nanofibers (Fig. 1E) without changing physical parameters like the nanofibers' diameter, rugosity or surface chemistry (Supplementary Fig. 2) or matrix confinement properties. This allows a sharp modulation of the mechanical properties thanks to a small amount of MWCNTs (Fig. 1A).

As NF have autofluorescence, we performed a lambda scan at the excitation wavelengths of 405, 458, 488, 514, 561 and 633nm. Fibers emitted for every excitation wavelength, but with a higher intensity at 405nm (Supplementary Fig. 3). The intensity of the NF autofluorescence did not interfere with the immunostaining observations and quantifications as its intensity was much weaker than those observed in immunostaining. This autofluorescence actually turned out to be a convenience as it allowed us to visualize the topoinduction and the NF-GSC interaction during the migration.

### ***Optimal fibers' elasticity increases the migration of GSCs on 3D NF matrix and triggers GSCs' migration in proliferation condition***

To perform the migration assay, we plated neurospheres (NS) of identical size on the NF and let them migrate in the differentiation media. To measure migration areas, we subtracted the area of the NS containing non-

migrating cells from the total area (Figure 3C).  $3.2 \pm 1.9$  kPa,  $166 \pm 29$  kPa,  $542 \pm 90$  kPa and  $1260 \pm 430$  kPa samples will be renamed henceforth as S3.2, S166, S542 and S1260 respectively.

After 5 days of GSC migration, we observed a ~4-fold increase in the migration area on the S166 NF compared with the GSCs on the S3.2 fibers. Migration areas then decreased on stiffer substrates, on S542 and S1260 NF (Figure 2 A,E). As a result, we found an optimal stiffness (46) for GSCs' migration, at 166kPa in our NF, that allows a significant increase in migration.

Moreover, on the S166 NF (Fig. 2A), we observed that the NS remaining on the NF was smaller than in the other conditions. This can be explained by a larger proportion of GSCs having left the NS.

To further investigate the influence of the mechanical properties on GSC migration, we deposited GSC-NS in proliferation medium (with growth factors and without serum) on NF with different stiffness (Fig. 2B and F). GSCs hardly migrated in proliferation medium, with exception of NFs grown on S166, where actually some migration was observed. This demonstrates that the optimal stiffness condition is sufficient to trigger migration, even in the unfavorable proliferation medium.

We have verified whether the migratory differences were not caused by fiber cytotoxicity or a favorable situation to proliferate (Figure 2C,F). Through MTT assays, we didn't see cytotoxicity or proliferation differences on NFs of different stiffnesses confirming that the optimal stiffness promotes migration and does not enhance proliferation which might thereby have pushed GSCs out of the NS to find their place in the network.

All this results corroborate that GSCs are in a higher invasive state on S166 fibers.

### ***GSCs in the 3D NF matrix change their shape through the variations of elasticity but not their focal adhesion morphology***

Cell length as well as cell morphology are associated with invasiveness and directionality of migration (8)(7)(47). Therefore, we deposited dissociated GSCs in the different conditions of stiffness in order to observe and quantify their morphology. We measured GSCs' length (Fig. 3B) and width (Fig. 3C) to observe their difference in deformability (Fig. 3D).

Firstly, in all conditions GSCs are highly bipolar in comparison with GSCs in 2D conditions (Fig. 3A) (48). On 2D, S3.2 and S166 GSC length was very similar, but became shorter on S542 and S1260 (Fig. 3B). The width of all GSCs on NF was much smaller than on 2D with S166 being the smallest (Fig. 3C).

In conclusion, GSCs on S166 seemed to be more deformable, allowing for a better migration inside the fiber felt. The increase of cancer stem cell deformability is known to be associated with higher invasiveness (1)(49). The modulation of GSC morphology is consistent with the observed increased invasiveness on S166(Figure 3).

Vinculin immunostaining showed a diffuse FA morphology in 3D and did not seem to be modified through rigidity (Figure 3A). Nevertheless, the FA organization appeared different from 2D where FAs seem to be organized in clusters. Phalloidin staining in 2D showed GSCs stress fibers, which didn't appear in 3D (50)(51).

Increased cell deformability, cytoskeletal reorganization and FA dynamic changes in cancer cells are associated with EMT and enhancement of invasive potential (52)(53). Therefore we decided to investigate the expression of proteins associated with EMT or cytoskeletal dynamics.

### ***Optimal elasticity increases the expression of EMT proteins in GSCs and modifies focal adhesion dynamics***

Talin is upregulated in cancer cell invasion and is a key FA regulator (54). It forms the link between integrin and actin cytoskeleton in mature FA (55)(27) and may act as a tension sensor (56). On S166 NF we could see an increase in the total amount of talin and of its cleaved form (Figure 4A, Supplementary Fig.5). Talin cleavage is linked to rigidity sensing (27). This result is consistent with the calpain 2 increase visible at the optimal rigidity (Figure 4A, Supplementary Fig. 5). Indeed, calpain2 is activated by calcium, cleaves talin and thus regulates FA dynamics during a local increase of calcium level (26). This suggests a translational regulation in both calpain2 and talin on S166 fibers, since the cleaved talin to intact talin ratio remained unchanged (supplementary Fig. 5). These two proteins were up-regulated if the cells were cultured on S166 which reflects an increase in FA contributing to migration.

Interestingly, Integrin  $\beta$ 1 expression doesn't increase in our conditions. Then, it would be relevant to observe activated Integrin  $\beta$ 1 level in the S166 condition (57). Indeed, talin expression increase indicate higher level of FA maturation in this situation (55). It is also possible that in this case, the link between GSCs and NF is not mediated by Integrin  $\beta$ 1, but by another integrin's subunit. This should be investigated.

Zeb1 is preferentially expressed in highly invasive GBM cells and is correlated with poor prognosis as well as a weak response to Temozolomide (TMZ) (58). Furthermore, Zeb1 activates EMT, maintains cell stemness and promotes mobile and migratory phenotypes in cancer stem cells (46). Zeb1 has is responsible for a cytoskeleton rearrangement through the overexpression of N-Cadherin (24). Though N-cadherin, as a representative EMT marker, has a limited prognostic value in glioblastoma, its overexpression is correlated with unfavorable clinical results (59).

At the optimal elasticity on the S166 NF, the expression of EMT proteins N-cadherin and Zeb1 are increased compared to the control condition S3.2 (Fig. 4C and Supplementary Fig. 5) and are correlated with the enhanced migratory ability and deformability of GSCs (Figure 2 and 3).

Sox2 expression and activation has been frequently observed in poorly differentiated tumors, has an important role in GSCs' stemness maintenance and is correlated with EMT (46) and poor prognosis in glioblastoma.

Moreover, its downregulation is correlated with a decrease of invasiveness and migration. GSCs with high Sox2 expression are more resistant to TMZ, while its inhibition sensitizes glioma cells to this agent (60)(61)(62).

At the optimal elasticity of the 3D nanofiber model, a great increase in the expression of Sox2 was observed (Fig. 4C and supplementary Fig. 5). This again confirms the highly invasive phenotype expression on S166.

When Fabisiewicz *et al.* (2017) compared cluster-migrating tumor cells with individual-migrating cells, the former show increased resistance to cell death, higher tumor-initiating capacity and worse prognosis in different types of cancers (63)(64). This is consistent with our results. In cells grown on S166, overexpression of the tight junction protein ZO-1 was observed (Fig. 4C, Supplementary 5). ZO-1 is often reduced in EMT, because EMT usually leads to single-cell migration (65)(66). Nevertheless, in our case the presence of ZO-1 in the EMT-like configuration of GSC is more in line with the situation described by Friedl *et al.* (2012) of “Collective Mesenchymal Migration” which requires cell-cell junctions (67). The simultaneous upregulation of ZO-1 and N-cadherin has been shown previously to contribute to the invasive character of melanoma cells (68). Ultimately, with the overexpression of ZO-1 being only present at the optimal elasticity, it may underlie that the migration mechanism (EMT-like mesenchymal collective migration) on the S166 NF differs in other rigidities in terms of cell-cell and cell-matrix interactions (Figure 4B and C, Figure 2 A and E). This is consistent with the previously described implication of ZO-1 in mechanotransduction process (69).

Vimentin expression is relatively low in cells grown on our fibers with respect to the 2D condition (Figure 4C and supplementary 5).

MGAT5 is involved in EMT and catalyzes the addition of  $\beta$ 1,6 GlcNAc- branched N-glycans on proteins (33) (70). The extracellular part of transmembrane proteins carrying branched N-glycans are recognized by galectin 3 on neighboring cells and form so-called galectin lattices. Glycosylation of integrins by MGAT5 and their recognition by galectin 3 lead to integrin activation followed by FA maturation (30) (71). Consequently, MGAT5 and galectin 3 play a role in both EMT and FA. Since we observed an important upregulation of galectin 3 in cells grown on the S166 fibers we suspected that MGAT5 would be essential in mechanoreception and cell migration in this condition.

### ***CRISPR Cas9 KO of MGAT5 decreases migration velocity at the optimal elasticity***

Following the observation of the overexpression in EMT proteins and upregulation of galectin 3 and proteins implicated in FA dynamic on the S166 NF, we generated several knocked-out MGAT5 clones derived from a primary GSC cell culture using the CRISPR Cas9 technique (Fig. 5A). Mutants were produced with a mix of 3 RNA guides targeting exons 2 and 5 of the MGAT5 gene. We carried out experiments with four different clones of MGAT5 KO GSCs transfected and cultured separately. Preliminary observations of the cells revealed the presence of strong contact inhibition in MGAT5 KOs (Fig. 5B and C) through an increased

number of aggregates in MGAT5 KOs compared to GSC WT after 24h. We observed a daily decrease in the number of aggregates in every condition, but in the absence of MGAT5 the decline was slower indicating difficulties of the latter to aggregate. MGAT5 KOs proliferated as quickly as GSCs WT (Supplementary Fig. 5A) and GSCs without MGAT5 are smaller than WT GSCs. Indeed, same size neurospheres MGAT5 KO are smaller than GSCs WT (Supplementary 5B) but exhibit no changes in proliferation velocity.

After 5 days of migration in the differentiation media, same size NS of GSC MGAT5 KO on NF of different stiffnesses had a greatly reduced migration area on the S166 NF at optimal stiffness compared to GSC WT (Figure 5D and F). Nevertheless, this decrease didn't appear in other stiffnesses and the migration area was actually increased on the S3,2 NF in absence of MGAT5 ( $P=0,009$ ). However, the migration area of GSC MGAT5 KO at 3,2 kPa is far from the GSC WT migration area increase on S166 NF. This might be caused by the contact inhibition visible by the NS fragmentation in GSCs MGAT5 KO compared to GSCs WT (Figure 5 B and C). This result confirmed MGAT5's implication in the increased migration area at 166kPa.

To investigate further, we wanted to see if MGAT5's KO inhibited migration triggered on the S166 NF by the proliferation condition (Figure 5 E and F). Because of the GSC MGAT5 KO high contact inhibition in proliferation due to the galectin3 role in cell/cell junction stabilization (72), we observed an increased migration area of MGAT5 ko GSCs in the proliferation condition at S3,2 and S1260. Nevertheless, it is difficult to determine if this migration increase or if MGAT5 ko GSCs sprawling into the 3D NF matrix. These "migrations" remained much lower than those observed in GSCs WT in the differentiation condition.

#### ***MGAT5 KO changes EMT protein expression, focal adhesion dynamic and reduces cell length***

We then investigated the expression of EMT and focal adhesion dynamic proteins in MGAT5 KO GSCs. We observed a decrease in N-cadherin expression in MGAT KO GSCs on the S166 NF compared to GSCs WT, that was on the contrary increased on the S542 and S1260 NFs compared to WT condition. In addition, there was no differences in N-Cadherin expression between GSC KO MGAT5 and GSC WT in 2D on the S3,2 NF (Figure 6D et Supplementary 6).

There was no modification in Zeb1 expression levels between WT GSC and MGAT5 KO GSC. However, differences in expression levels of Zeb1 were no longer visible in MGAT5 KO GSC between different stiffness conditions and 2D. In conclusion, MGAT5 inhibition diminishes rigidity-regulated Zeb1 expression modulation and decreasesMGAT5 inhibition consequently acts on Zeb1 expression's modulation that results from rigidity and decreases N-cadherin expression at the optimal migration rigidity (Figure 6D et Supplementary 6).

Therefore, MGAT5 could play a key role in the mechanical environment perception of GSCs and result in the modulation of EMT proteins expression.

Concerning focal adhesion proteins, we noted that calpain 2 expression decreased on the S166 NF in the absence of MGAT5 compared to WT GSCs. Unlike WT GSCs, calpain 2 expression then increased back at 1260kPa. Talin was no longer overexpressed on the S166 NF in MGAT5 KO GSC in comparison with control GSCs. The decrease of calpain 2 expression via MGAT5 inhibition is consistent with the lack of talin increase. MGAT5 KO may lead to FA maturation and turn-over decrease, correlated with the decrease of MGAT5 KO GSC's migration compared to WT GSC's (Figure 6D et Supplementary 6).. Concurrently with the absence of FA and EMT proteins increase in GSC KO MGAT5 at the optimal stiffness compared to other stiffnesses, ZO-1 was also not increasing in comparison with WT GSCs. This is consistent with the decrease of mechanical properties response without MGAT5 (Figure 6D et Supplementary 6). There was no vimentin expression changes between WT GSCs and MGAT5 KO GSCs. Nevertheless, no differences were noted for KO GSC between 2D and 3D in different stiffness conditions.

Galectin 3 in GSCs without MGAT5 showed similar expression level in all stiffness conditions consistently with the absence of MGAT5, in comparison with WT GSCs.

Surprisingly Sox2 exhibits no decrease in its protein expression level on the S166 NF in comparison with WT GSCs, but increase on the S542 NF.

It was interesting to note that concerning EMT and FA proteins expressions, there were no differences in 2D between WT GSCs and MGAT5 KO GSCs.

When we measured the MGAT5 KO GSC length compared to the WT GSC, it appeared that GSCs are shorter on S3.2, S166 and S542 NFs without MGAT5. Moreover, GSCs length differences between different stiffness conditions disappearing without MGAT5. In addition, there was a decrease in GSCs width ( $P=0,0016$ ) from S3.2 to S166 NFs that did not appear in the MGAT5 KO ( $P=0,15$ ). Therefore, MGAT5 KO GSCs might be less deformable than WT GSCs on the S166 NF, thus less able to invade the NF network at the optimal stiffness (Figure 6 A, B). This is illustrated by the increase of GSCs Width/Length Ratio (Figure 6C). Finally, the MGAT5 KO GSCs are finer than WT GSCs (Figure 6B), but this is maybe due to the supposed smaller size of GSCs without MGAT5 (Supplementary 5A, B).

## **Discussion:**

Tumors cells exhibit important surface glycosylation changes (73)(74). MGAT5 overexpression is associated with malignant tumors and has an important role in the glycosylation of cell/ECM and cell/cell interaction proteins and in EMT. MGAT5 mediates the addition of  $\beta$ 1,6GlcNAc branched to N-glycans on proteins (75)(76) and form a lattice between membrane proteins through the binding of galectin 3. This process has been associated with actin microfilament remodeling and FA adhesion maturation leading to cell/substrate adhesion changes (31)(30). Moreover, integrins glycosylation are essential for their heterodimerization and FA's function and contributes to the tumor phenotype (77)(57). Galectin 3 additionally would permits the

recruitment of active Integrin at the focal adhesion site and enabling the activation of Focal adhesion kinase (FAK) (30) (77)(57)..

Matrix elasticity of tissue microenvironment sustains great changes during tumor progression and changes focal adhesions dynamics (78). It is also implicated in EMT induction and promotes the shift of TGF  $\beta$ 1 from apoptosis inducer to EMT promoter (79)(24).

Nevertheless, the link between MGAT5 and the matrix mechanical properties has not been highlighted yet.

In our model, GSCs at 166kPa are in a mechanical condition that we consider as "optimal" for their migration and that is correlated with an increase in GSCs migration area. But when the stiffness increases again further to reach 542kPa and 1260kPa, GSCs migration area decreases. This « optimal » stiffness for migration in NF is associated with an EMT-like phenotype in mesenchymal collective migration noticed through Zeb1 and N-Cadherin overexpression's and focal adhesions maturation due to both calpain 2 and talin up-regulations. Stemness marker Sox2 increase on S166 NF and is associated with a highly invasive phenotype of GSCs (80)(62).

ZO1 expression increase at the "optimal stiffness" could indicate higher needs for cell-cell junction in this migratory condition and may be due to greater strength through collective migration on the S166 NF which may favor the transmission of mechanical information within collective migration.

Finally, it is usually described that vimentin increase occurs in the epithelial-mesenchymal transition. Despite EMT phenotype of GSC on the S166 NF, vimentin is not increased in this condition. However, recent studies show that partial EMT with a hybrid phenotype is essential for cancer cells invasion (81)(82). This can support the highly migratory phenotype in the "EMT-like" configuration observed on the S166 NF. Furthermore, vimentin has been observed to stiffen cells (83) and in the S166 condition, we have seen that GSCs are more deformable. This can support the lack of vimentin increase on the S166 NF.

To what mentioned previously, this optimal migration condition, which is sufficient to trigger migration in proliferation conditions (cf Figure 2B, F), seems to combine many parameters associated with GSCs highly aggressive phenotype and related to increased chemotherapies resistance.

Extracellular galectin 3 recognizes  $\beta$ 1,6GlcNAc branched to N-glycans on FA proteins and allows junctions between membrane proteins, promotes their clustering, maturation, activation, integrin  $\beta$ 1 internalization, and is involved in cell/cell and cell/matrix adhesion through the formation of a lattice between FA proteins (30)(31)(71). These adhesions, particularly through integrins, transmit mechanical information to the cytoskeleton via a deformation applied to the membrane(84). This coordinated information about mechanical properties on stiff surfaces leads to enhanced FA maturation and an increase in an « EMT-like » process. Therefore, N-glycosylated lattice formation between FA proteins recognized by galectin 3 is essential for coordinated transmission of mechanical information to the cytoskeleton. MGAT5 KO should lead to a decrease in this mechanical transmission and thus a decrease of an "EMT-like" process.

Consequently, as a link between FA proteins and EMT process, the S166 condition promotes increase of galectin3, suggesting its implication in mechanoreception through FA and EMT.

Indeed, in MGAT5 KO GSCs, compared to WT GSCs, we observed at 166kPa a decrease in migration areas, in GSCs length, in N-cadherin as well as in the expression of proteins involved in FA turn-over and maturation. We suppose there are difficulties in the maturation of adhesions in MGAT5 ko GSCs as evidenced by the decrease in calpain2 and talin expression on the S166 NF.

Without MGAT5, Galectin3 expression profile didn't change between NF with different stiffness. This shows great impact of stiffness on galectin 3 mediated by MGAT5.

Nevertheless, stiffness did not seem to change directly MGAT5 expression (Data not shown). Therefore, it could be relevant to have a look at ST6GAL1 ( $\alpha$  2,6 sialyltransferase 1) expression, an enzyme that creates terminal  $\alpha$ 2,6 sialic acid linkages on polylectosaminic extensions catalyzed by MGAT5 (85). Moreover, ST6GAL1 was previously observed upregulated during EMT process (86).

ZO1 decrease at S166 in MGAT5 KO GSCs compared to WT. These confirmed the impact of mechanical properties and EMT on cell/cell contact and higher need for GSCs at optimal stiffness to be cohesive. Because galectin 3 is greatly implicated in cell/cell contact (72), ZO1 decrease can be linked both by galectin3 downregulation at S166 in the absence of MGAT5 and decrease of mechanical properties sensed by GSCs.

We did not observe decrease in Zeb1 expression in MGAT5 KO GSCs in comparison with the GSC WT, but we could observe a loss of the differences in expression between the various rigidities. Therefore, the absence of MGAT5 does not have a direct influence on Zeb1, but rather influences the perception of the mechanical environment information that influences Zeb1 regulation. This shows that MGAT5 significantly contributes to the lattice formation allowing perception of the mechanical environment through FA maturation and promoting EMT in the optimal rigidity condition.

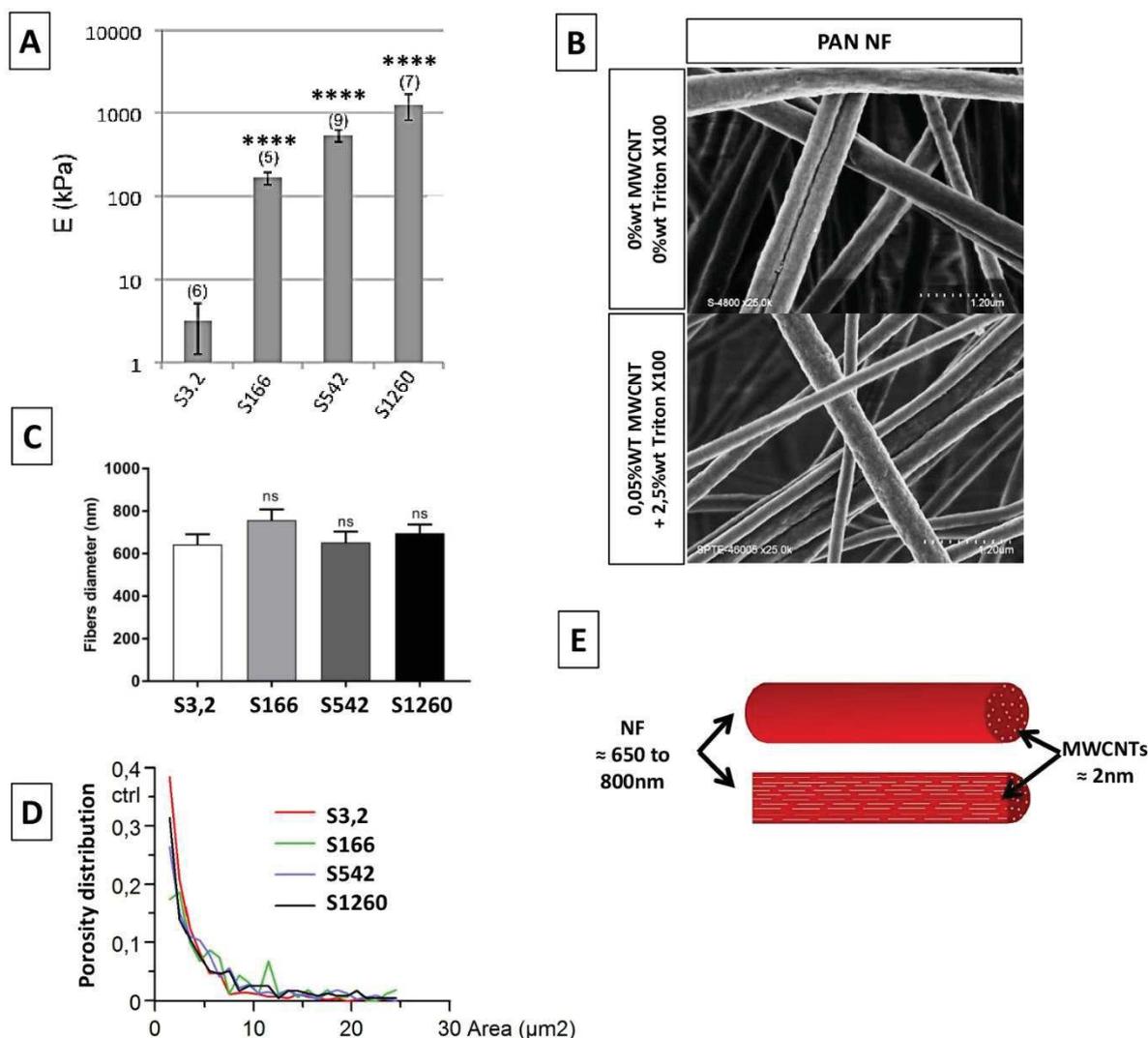
Finally on the S1260 NF in MGAT5 KO GSC, there was an increase in Calpain2 expression. An increase of N-cadherin also appeared on S542 and S1260 NFs. In the case of a sensitivity loss of the mechanical properties, we could suggest it requires a much higher stiffness for membrane deformation without MGAT5 than in WT to induce EMT-like or FA turn-over.

The lack of changes in Sox2 expression indicates the impact of stiffness on Sox2 expression is not modulated by MGAT5 influences on FA maturation (87).

We can therefore hypothesize that one of the mechanisms involving MGAT5 in EMT processes is mediated by mechanotransduction. Without  $\beta$ 1,6GlcNAc branched to N-glycans, Galectin3 oligomers are less able to form bridges between FA glycoprotein and thus form dysfunctional lattice, FA cannot mature and thus cannot transmit mechanical deformation information to the cytoskeleton. In conclusion, the absence of MGAT5 leads to a decrease in migration speed, EMT-like processes and FA turn-over through the inhibition of mechanotransduction.

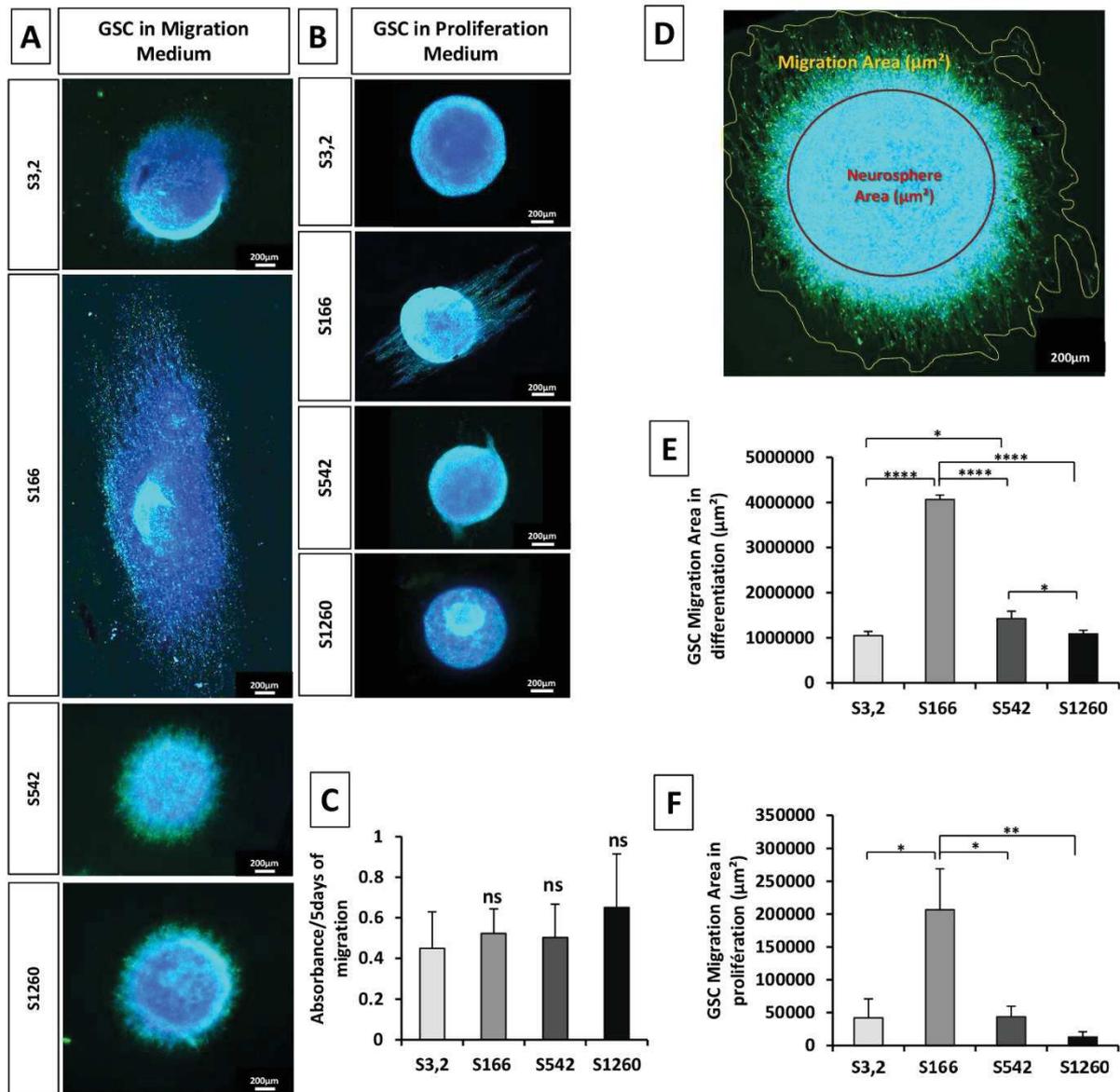
Figures :

Figure 1 :



**Figure 1: Characterization of the NF with different concentrations of MWCNTs and Triton (A)** Evolution of the Young's modulus as a function of MWCNT revealing a dramatic hardening of the samples as a function of carbon nanotubes content. Bars represent the obtained average of the Gaussian peaks fitted on the elasticity value distributions of individual force maps. In brackets the number of the analyzed force maps is indicated. Error bars are standard deviation of the mean. The elasticity of the four samples is significantly different ( $p < 0.01$ , one-way ANOVA test). (B) SEM images of fibers surface. (C) Fibers diameter (D) Percentage of porosity distribution measured by confocal microscopy and 3D reconstitution (E) Schematic representation of the theoretical MWCNTs position inside the NF.

**Figure 2 :**



**Figure 2: Migration area of GSCs increase at 166kPa on 3D NF matrix and triggers GSCs' migration in proliferation condition.** (A) Same size WT GSCs NS in differentiation media (for migration) after 5 days of migration on 3D NF of different stiffnesses ranging from 3.2 to 1260kPa. (Scale: 200 $\mu\text{m}$ ) F-Actin stain with Phalloïdin (Green), Nucleus stain with Hoechst (Blue) (B) Same size GSCs WT NS in proliferation media after 5days of migration on 3D NF of different stiffnesses ranging from 3.2 to 1260kPa. (Scale: 200 $\mu\text{m}$ ) F-Actin stain with Phalloïdin (Green), Nucleus stain with Hoechst (Blue) (C) MTT assay showing no proliferative effect of NF at different stiffnesses compared to 2D (Red) . MTT was achieved by adding 30000 cells on nanofibers of different stiffnesses and absorbance was analyzed at 5days of migration. (D) Migration Area measurement techniques, by subtracting neurosphere area ( $\mu\text{m}^2$ ) (red) from the migration area ( $\mu\text{m}^2$ ) (yellow) (E) Migration area mean in migration media at different stiffnesses showing an increase of migration at 166kPa (n=3 with a minimum of 6 GSCs NS by condition) (F) Migration area mean in

proliferation media at different stiffnesses showing an increase of migration at 166kPa (n=3 with a minimum of 4 GSCs NS by condition).

**Figure 3 :**

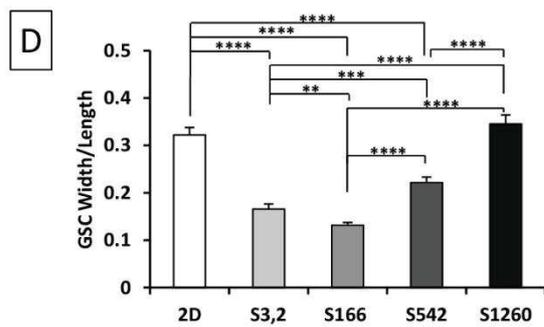
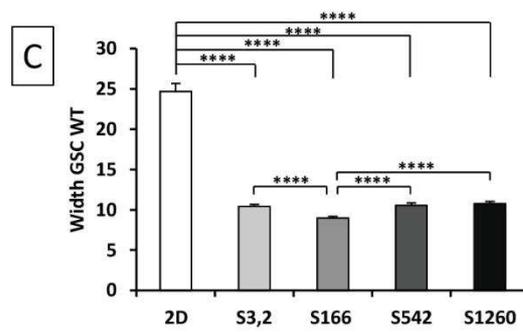
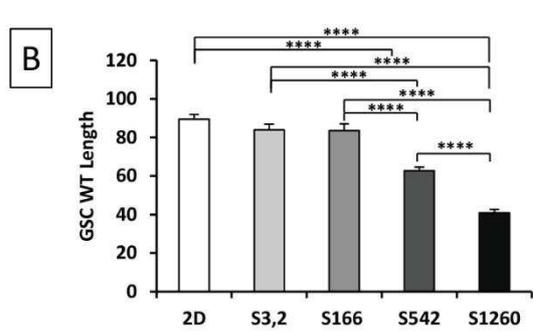
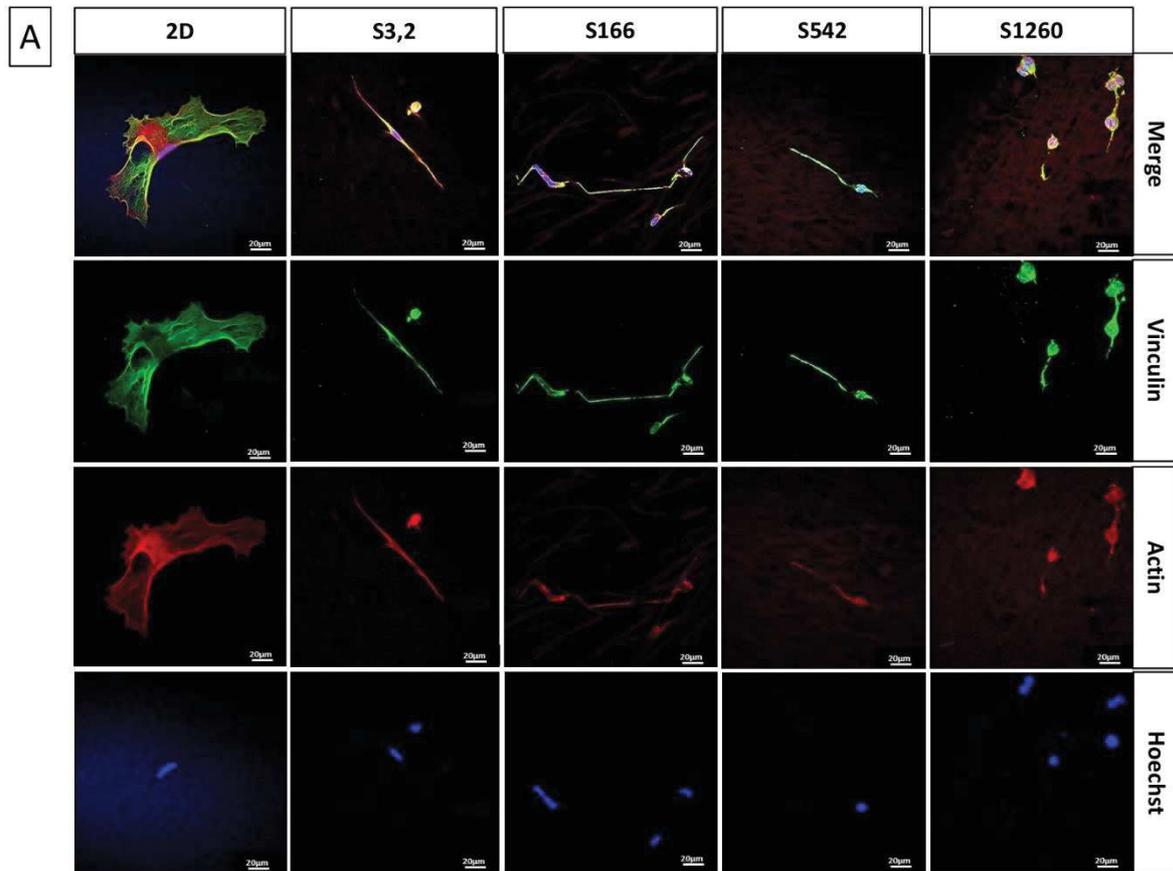
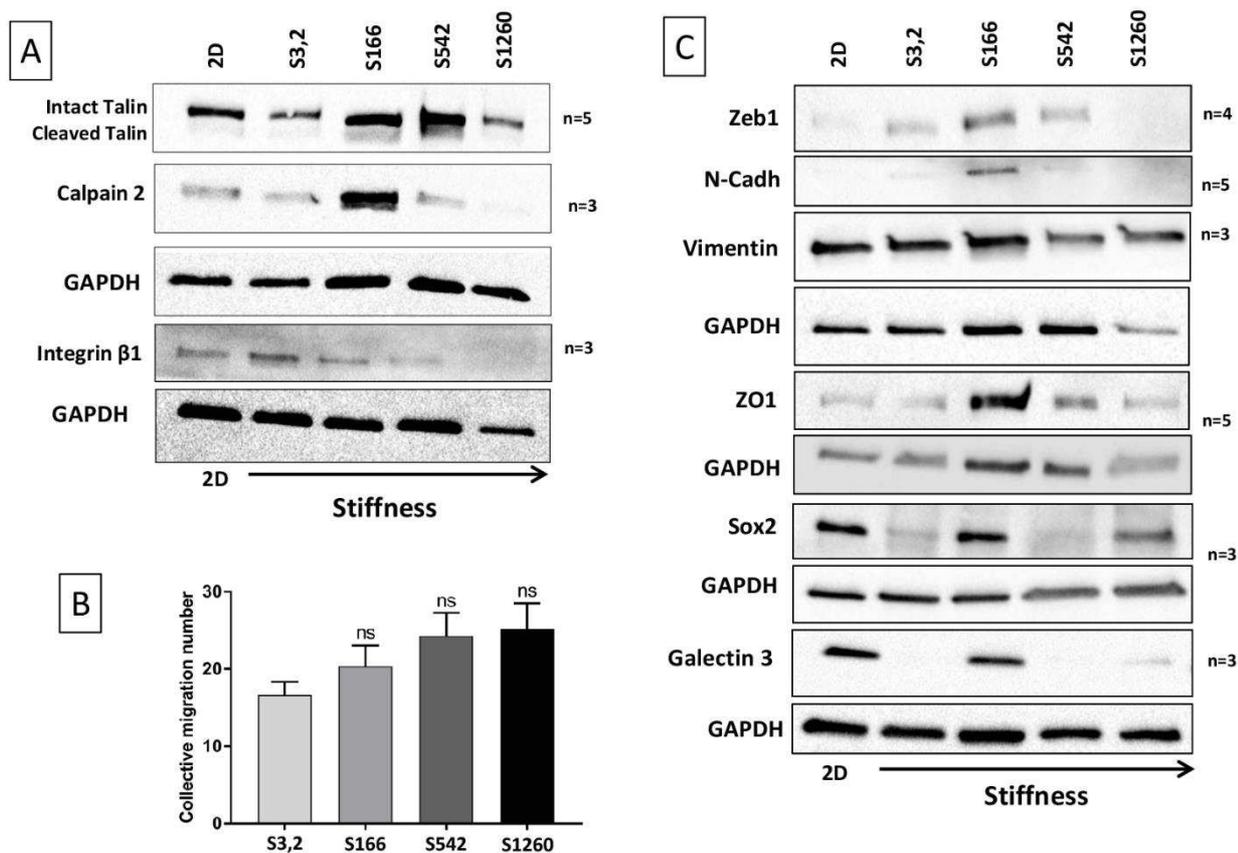


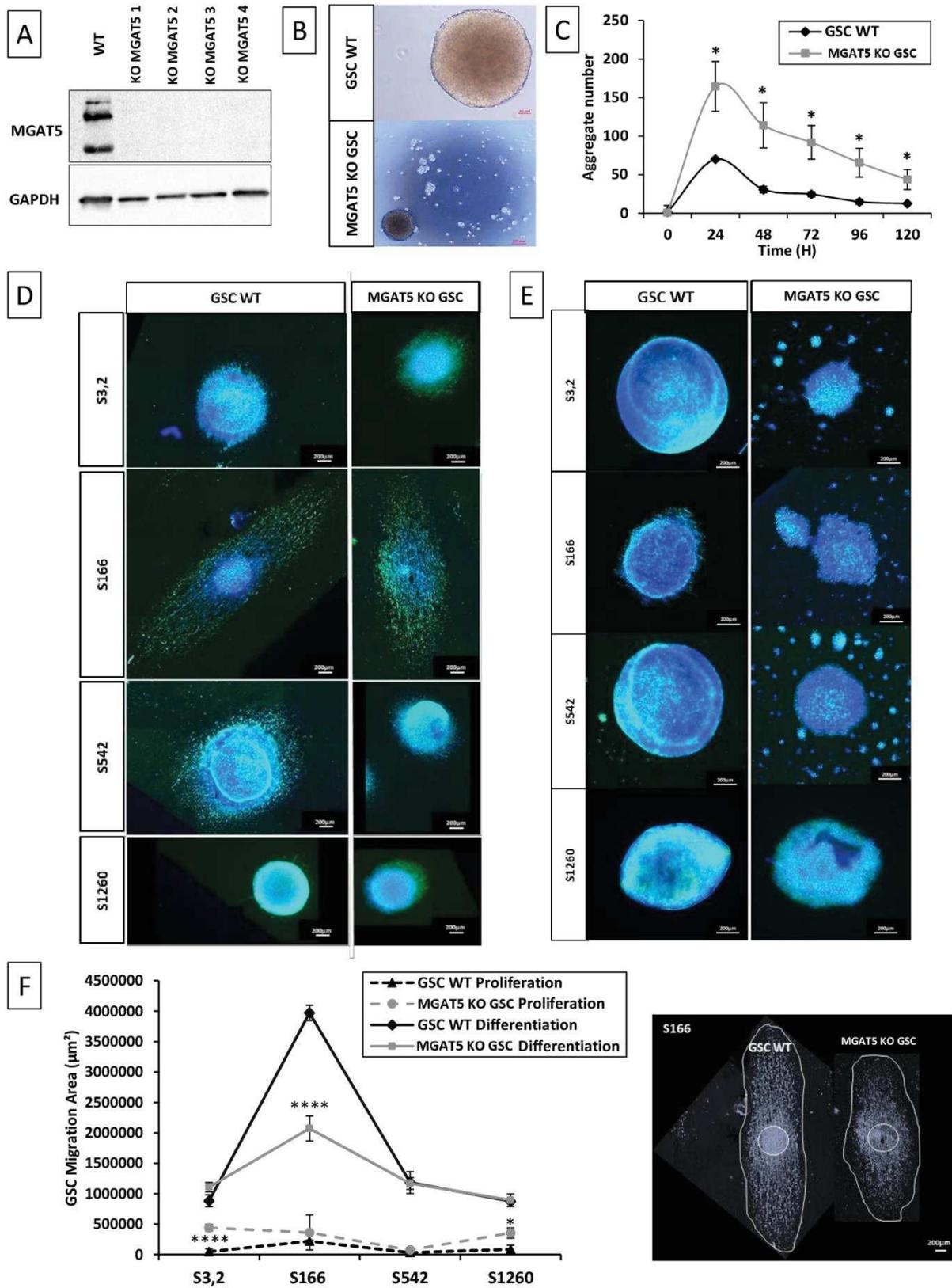
Figure 3: GSCs in the 3D NF matrix change their shape through the variations of elasticity but not their focal adhesion morphology (A) WT GSCs morphology in 2D and 3D with stiffness increases. Immunostaining : Vinculin (Green), F-Actin stain with Phalloïdin (red) , NF autofluorescence (Red), Nucleus stain with Hoechst (Blue). Scale: 20 $\mu$ m. (B) WT GSCs cell length ( $\mu$ m) and (C) WT GSCs cell Width ( $\mu$ m) quantify on dissociated cells stained with Hoechst and Phalloïdin (D) Ratio Width on length reporting cell distortion to migrate into the fiber felt.

**Figure 4 :**



**Figure 4: Optimal elasticity increases the expression of EMT proteins in GSCs and modifies focal adhesion dynamic.** Western Blot membranes showing (A) Focal Adhesions Proteins expression Talin, Integrin  $\beta$ 1 and Calpain2. (B) Quantification of collective migration at different rigidities. (C) Expression of EMT proteins ZEB1, N-Cadherin, Vimentin ZO-1 and  $\beta$  Catenin and Stemness marker Sox2

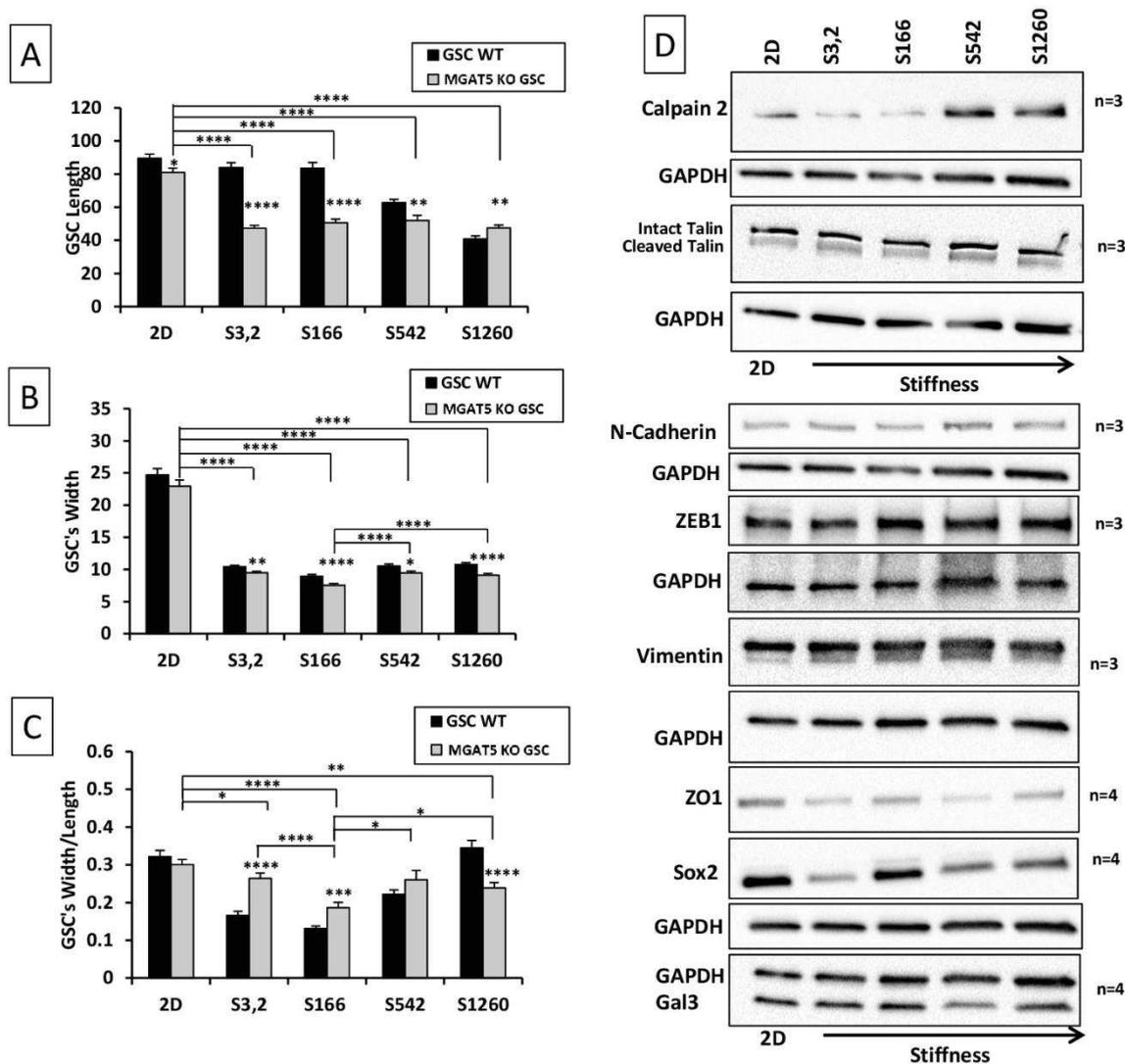
**Figure 5 :**



**Figure 5 : CRISPR Cas9 KO of MGAT5 decreases GSC's migration velocity at 166kPa. (A)** MGAT5 protein expression in GSCs transfected with CRISPR Cas9 for MGAT5 compared to WT GSCs. **(B)**

Contact inhibition in MGAT5 KO GSCs compared to WT GSCs (C) MGAT5 KO GSC have more numerous and smaller NS (right) Aggregates quantified daily in 96 wells seeded with 10000 cells. (n=3) (D) Picture of GSC KO MGAT5 migration behavior in migration media of WT GSCs at every stiffnesses. F-Actin stain with Phalloïdin (Green), Nucleus stain with Hoechst (Blue) (E) Picture of MGAT5 KO GSCs migration behavior in proliferation media of WT GSCs at every stiffnesses. F-Actin stain with Phalloïdin (Green), Nucleus stain with Hoechst (F) Quantification of Migration Area ( $\mu\text{m}^2$ ) in the differentiation and proliferation condition comparing WT GSCs and MGAT5 KO GSCs.

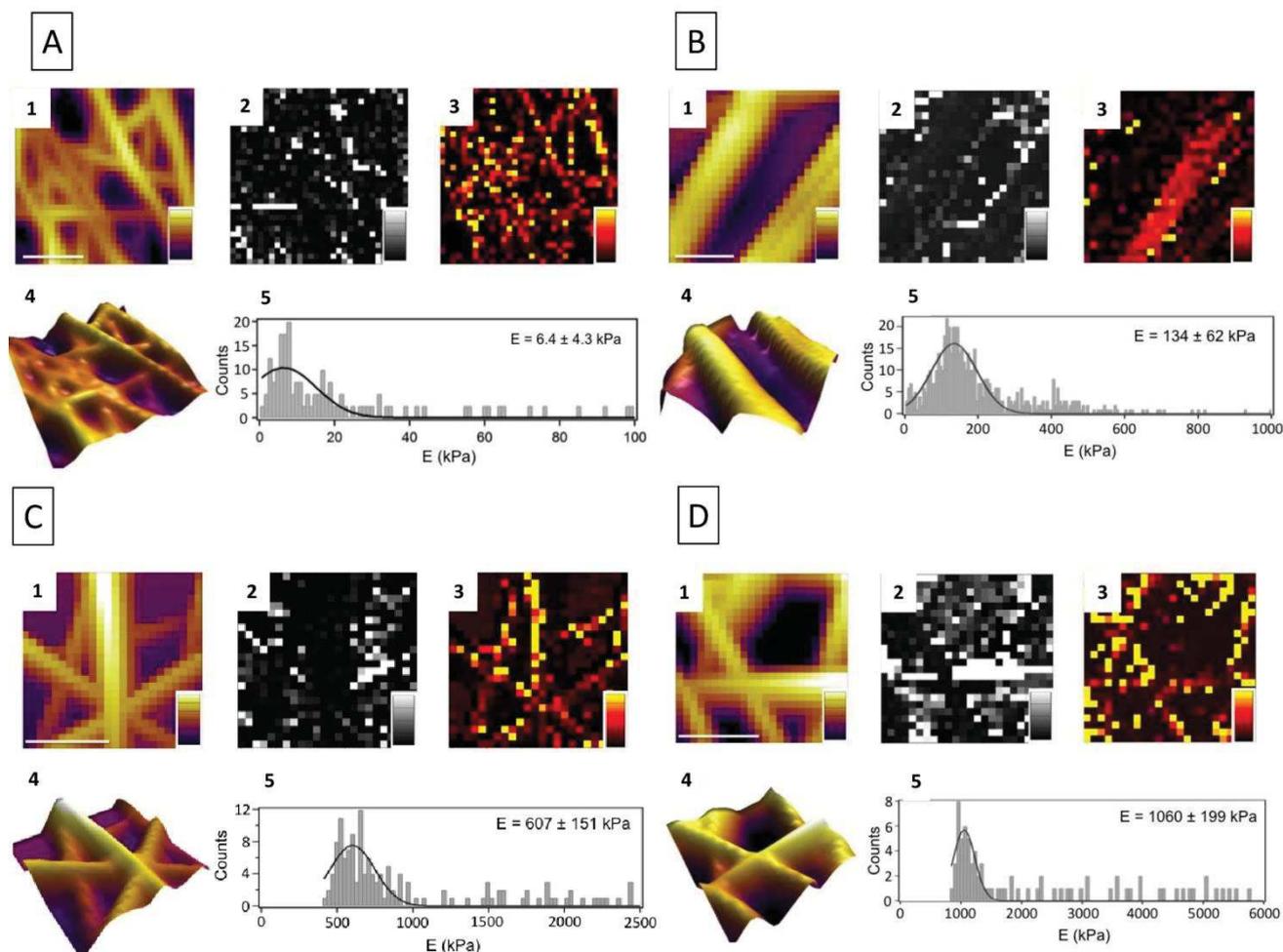
**Figure 6 :**



**Figure 6: MGAT5 KO GSCs changes EMT protein expression, focal adhesion dynamic and reduces cell length.** (A) Cell length ( $\mu\text{m}$ ) and (B) Cell Width ( $\mu\text{m}$ ) of WT GSCs compared to MGAT5 KO GSCs and WT GSCs quantify on dissociated cells stained with Hoechst and Phalloïdin (C) Ratio Width on length of WT GSCs compared to MGAT5 KO GSCs reporting cell distortion capabilities to migrate into the fiber felt. (D) Western Blot membranes showing Focal Adhesions Proteins expression on MGAT5 KO GSCs

Talin, Calpain2, EMT proteins expression ZEB1, N-Cadherin, vimentin, Stemness marker Sox2 and Galectin3.

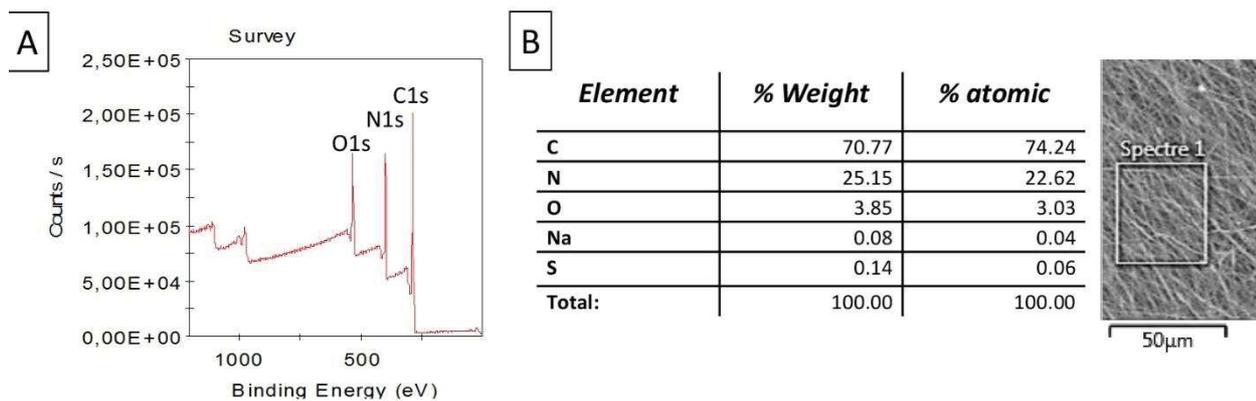
### Supplementary Figure 1 :



**Supplementary Figure 1: AFM force-volume maps.** (A) Control NF, (B) 0,0015%wt MWCNTs NF, (C) 0,00625%wt MWCNTs NF, (D) 0,05%wt MWCNTs NF. (A1, B1, C1, D1) Cartography of the height of the contact point recorded during the force-volume measurement. (A2, B2, C2, D2) Corresponding adhesion maps are shown in panels B. Generally, the stiffest fibers present the highest adhesion to the tip that can go up to 3nN, a rather large adhesion force in comparison to the forces applied to the fibers by the tip during measurements (300pN closely related to cells' forces (Bangasser et al. 2017b)). (A3, B3, C3, D3) Corresponding Young's Modulus maps, revealing a dramatic hardening of the samples as a function of carbon nanotubes content. Corresponding Young's modulus histograms are presented in panels 5, showing the heterogeneity of fibers' stiffness. In particular, panels A5 and B5 depict a Gaussian distribution of the mean while panels C5 and D5 display a narrow, spiked Gaussian peak with little spread and followed by a long tail, containing higher elasticity values. (A4, B4, C4, D4) 3D reconstructions of height of the contact point map

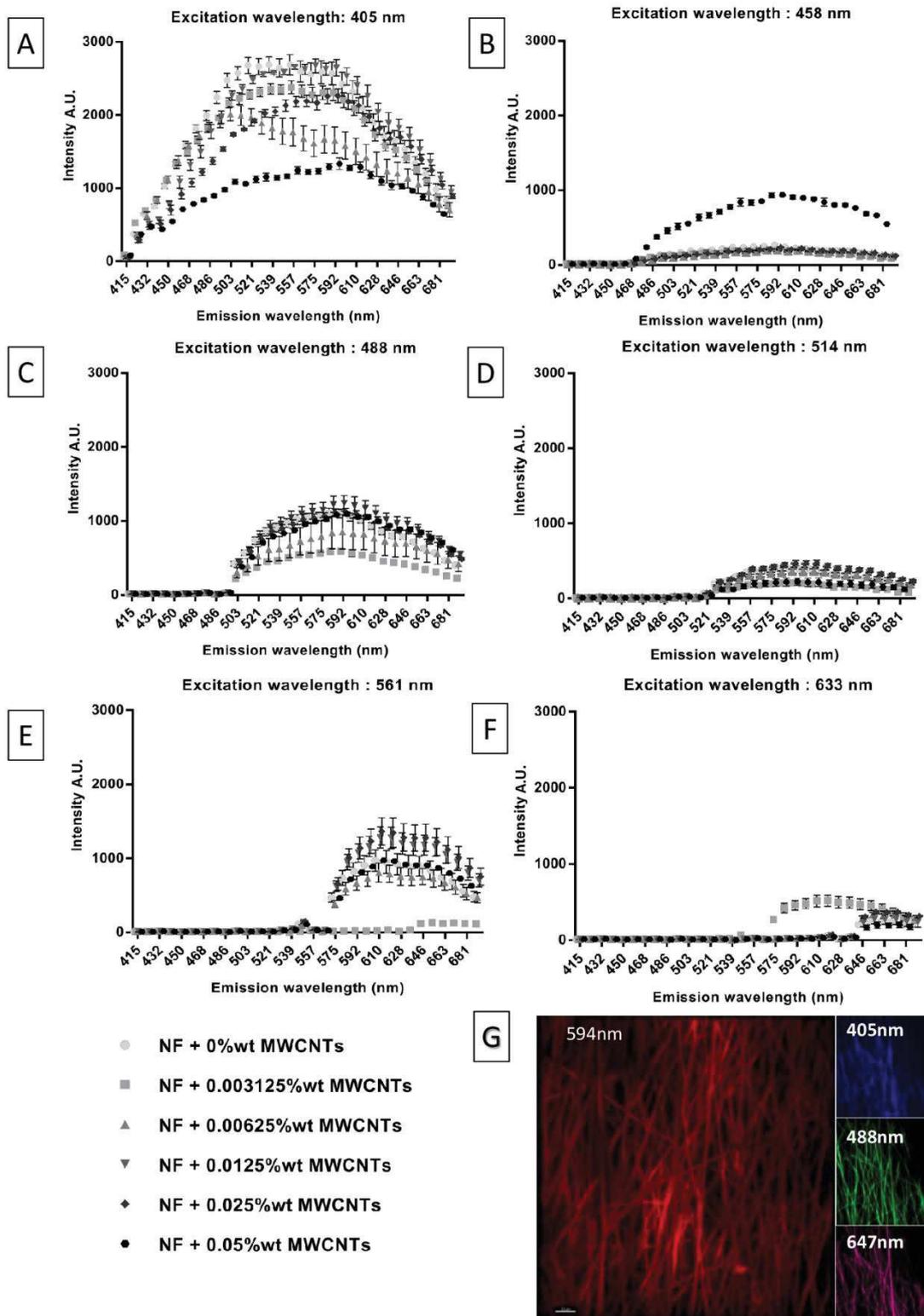
recorded during the force-volume measurement roughly exposing their morphology and shape. Contact point's height are shown in panels 1. (A5, B5, C5, D5) Associated Young's modulus histograms. Histograms were best fitted with one Gaussian. Mean values (E) are also indicated. (Scale bars 2.5  $\mu\text{m}$ ). For all samples, force-volume images, constructed from force curves collected at each point in a two-dimensional scan, were acquired in relative triggering mode.

### Supplementary Figure 2 :



**Supplementary 2: Surface Chemistry** (A) XPS analysis of surface chemistry of control NF without MWCNTs. (B) SEM analysis of 1260kPa NF composition.

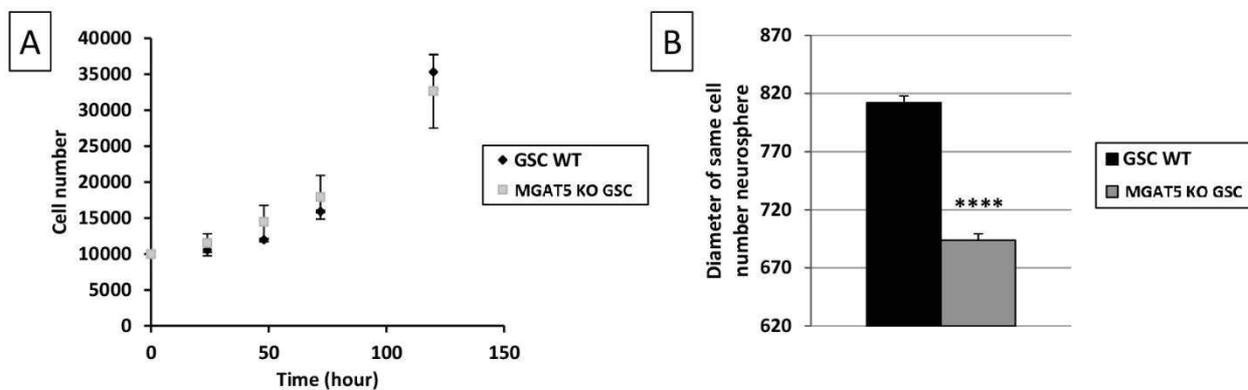
### Supplementary Figure 3 :



Supplementary 3: Lambda scan of the NF with different concentrations of MWCNTs and Triton x100, with emission wavelength intensities at the following excitation wavelengths (A) 405 nm (B)

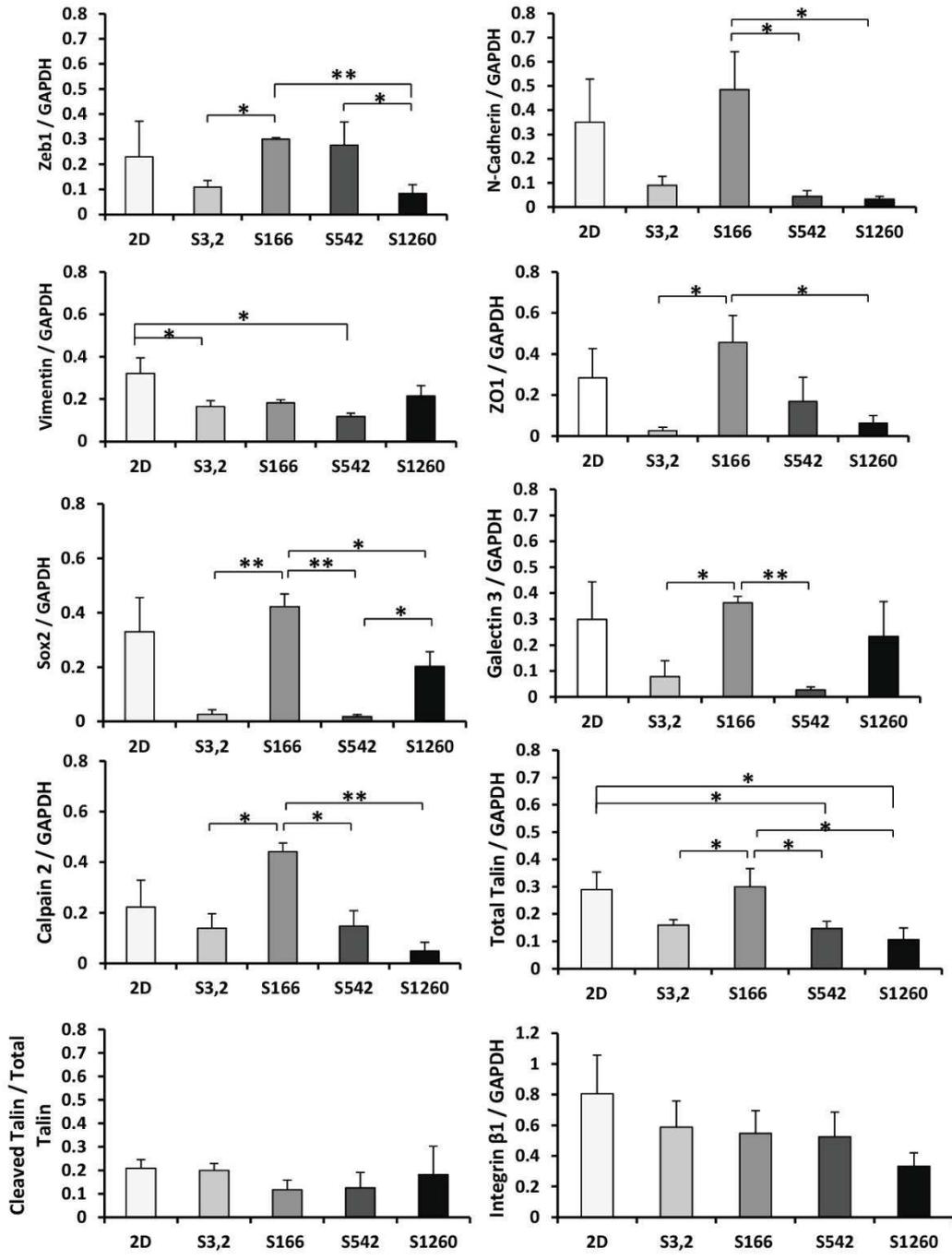
458nm (C) 488 nm (D) 514nm (E) 561nm (F) 633nm. (G) Picture of NF with fluorescence microscopy showing the NF fluorescence.

### Supplementary Figure 4 :



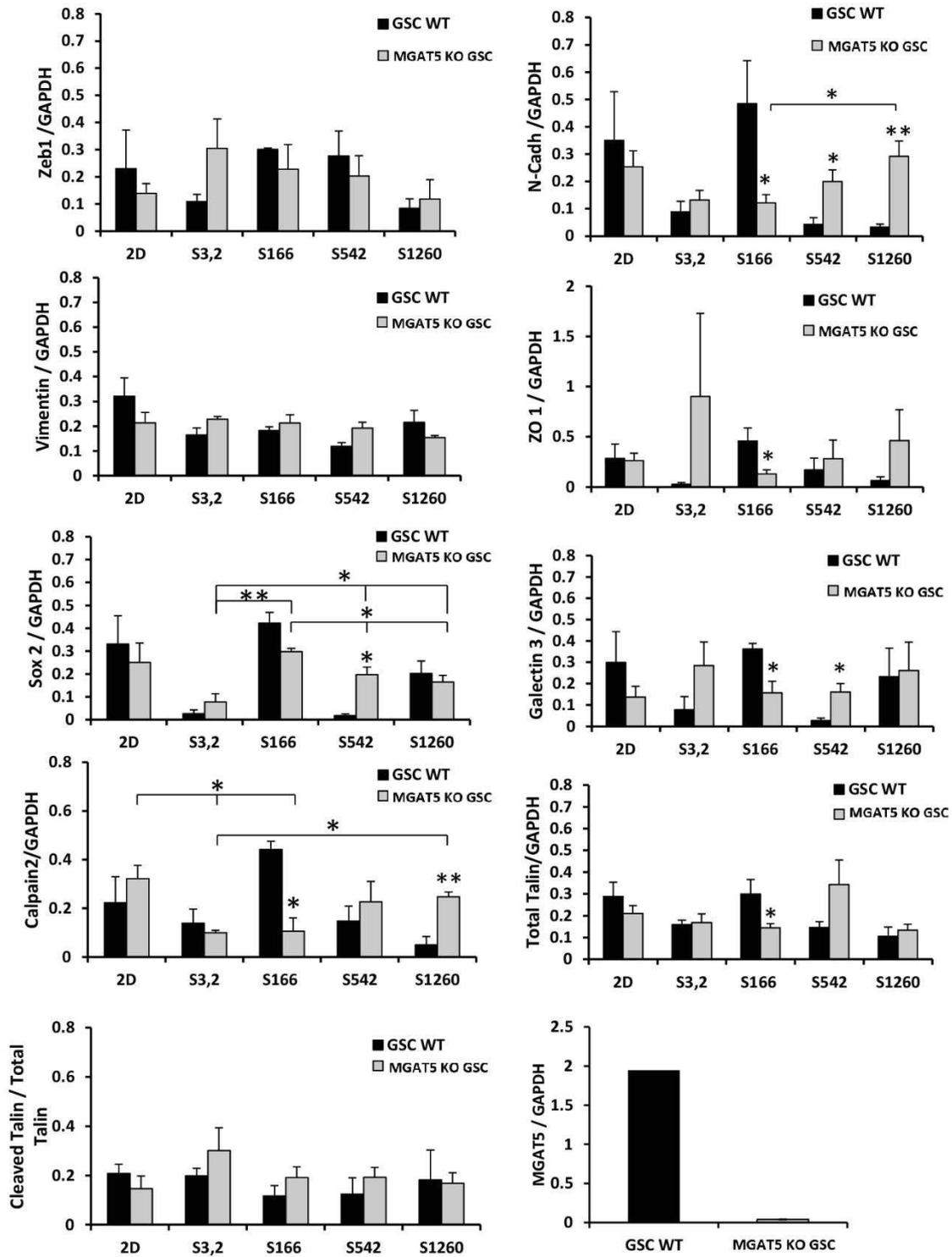
**Supplementary 4: MGAT5 KO GSC NS size and growth compared to WT GSCs** (A) MGAT5 KO GSC growth compared to WT GSCs. Ten thousand GSCs were seeded in 96 wells dissociated and counted daily. (B) GSC ko MGAT5 NS size compared to WT GSCs. 7500 GSCs were seeded in 96 wells plate ultra-low attachment and NS' diameter were measured after 6days of growth.

**Supplementary Figure 5:**



**Supplementary 5: Western Blot quantification of WT GSC proteins expression.**

## Supplementary Figure 6:



Supplementary 6: Western Blot quantification of MGAT5 KO GSC proteins expression compared to WT GSC.

## References :

1. Cuddapah VA, Robel S, Watkins S, Sontheimer H. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;15:455–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3765>
2. Scherer HJ. Structural development in gliomas. *Am J Cancer*. 1938;34:333–51.
3. Stiles CD, Rowitch DH. Glioma Stem Cells: A Midterm Exam. *Neuron*. 2008.
4. Pogoda K, Chin L, Georges PC, Byfield FJ, Bucki R, Kim R, et al. Compression stiffening of brain and its effect on mechanosensing by glioma cells. *New J Phys*. 2014;
5. Jain SR, Jain RK. tumors during progression : Implications for vascular collapse. 2014;73:3833–41.
6. Ivkovic S, Beadle C, Noticewala S, Massey SC, Swanson KR, Toro LN, et al. Direct inhibition of myosin II effectively blocks glioma invasion in the presence of multiple motogens. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2012;23:533–42. Available from: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E11-01-0039>
7. Christopher Beadle †, Marcela C. Assanah ‡, Pascale Monzo,§ Richard Vallee,§ Steven S. Rosenfeld ‡, Canoll and P. The Role of Myosin II in Glioma Invasion of the Brain. *Seikagaku*. 2010;82:327–31.
8. Watkins S, Sontheimer H. Hydrodynamic cellular volume changes enable glioma cell invasion. 2012;31:17250–9.
9. Ulrich TA, De Juan Pardo EM, Kumar S. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Res*. 2009;
10. Umesh V, Rape AD, Ulrich TA, Kumar S. Microenvironmental stiffness enhances glioma cell proliferation by stimulating epidermal growth factor receptor signaling. *PLoS One*. 2014;
11. Bangasser BL, Shamsan GA, Chan CE, Opoku KN, Tüzel E, Schlichtmann BW, et al. Shifting the optimal stiffness for cell migration. *Nat Commun*. 2017;
12. Darci T. Butcher\*, Tamara Alliston‡,§,|| and VMW. Forcing tumor Progression. 2009;9:108–22.
13. Ulrich TA, De Juan Pardo EM, Kumar S. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Res*. 2009;69:4167–74.
14. Gkretsi V, Stylianopoulos T. Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Front Oncol* [Internet]. 2018;8:145. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00145/full#B15%0Ahttp://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00145/full>
15. Beliveau A, Thomas G, Gong J, Wen Q, Jain A. Aligned Nanotopography Promotes a Migratory State in Glioblastoma Multiforme Tumor Cells. *Sci Rep*. 2016;

16. Xiwei Zheng, Cong Bi, Marissa Brooks and DSH. BIOMECHANICAL and BIOCHEMICAL REMODELING of STROMAL EXTRACELLULAR MATRIX IN CANCER. *Anal Chem.* 2015;25:368–79.
17. Nelson MT, Short A, Cole SL, Gross AC, Winter J, Eubank TD, et al. Preferential, enhanced breast cancer cell migration on biomimetic electrospun nanofiber “cell highways.” *BMC Cancer.* 2014;14:1–16.
18. Lou J, Stowers R, Nam S, Xia Y, Chaudhuri O. Stress relaxing hyaluronic acid-collagen hydrogels promote cell spreading, fiber remodeling, and focal adhesion formation in 3D cell culture. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2018;154:213–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.004>
19. Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Trier SM, Keely PJ. Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. *Biophys J.* 2008;95:5374–84.
20. Meel MH, Schaper SA, Kaspers GJL, Hulleman E. Signaling pathways and mesenchymal transition in pediatric high-grade glioma. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. Springer International Publishing; 2017;75:871–87. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-017-2714-7>
21. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28:15–33.
22. Przybyla L, Muncie JM, Weaver VM. Mechanical Control of Epithelial-to-Mesenchymal Transitions in Development and Cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2016;
23. Kerstein PC, Nichol Iv RH, Gomez TM. Mechanochemical regulation of growth cone motility. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015;9:244. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84936950581&partnerID=tZOtx3y1>
24. Kahlert UD, Nikkhah G, Maciaczyk J. Epithelial-to-mesenchymal(-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. *Cancer Lett* [Internet]. 2013;331:131–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.12.010>
25. Leight JL, Wozniak MA, Chen S, Lynch ML, Chen CS. Matrix rigidity regulates a switch between TGF-1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell.* 2012;
26. Kerstein PC, Patel KM, Gomez XTM. Calpain-Mediated Proteolysis of Talin and FAK Regulates Adhesion Dynamics Necessary for Axon Guidance. 2017;37:1568–80.
27. Saxena M, Chagede R, Hone J, Wolfenson H, Sheetz MP. Force-Induced Calpain Cleavage of Talin Is Critical for Growth, Adhesion Development, and Rigidity Sensing. *Nano Lett.* 2017;17:7242–51.
28. Liu Y, Liu B, Zhang G, Zou J, Zou M, Cheng Z. Calpain inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via switching the development of epithelial-mesenchymal transition. *Naunyn Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology;* 2018;1.

29. Taniguchi N, Kizuka Y. Glycans and cancer: Role of N-Glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. *Adv Cancer Res.* 2015;
30. Goetz JG. Bidirectional control of the inner dynamics of focal adhesions promotes cell migration. *Cell Adhes. Migr.* 2009.
31. Lagana A, Goetz JG, Cheung P, Dennis JW, Nabi IR, Lagana A, et al. Galectin Binding to Mgat5-Modified N-Glycans Regulates Fibronectin Matrix Remodeling in Tumor Cells Galectin Binding to Mgat5-Modified N-Glycans Regulates Fibronectin Matrix Remodeling in Tumor Cells. 2006;26:3181–93.
32. Padhiar AA, Fan J, Tang Y, Yu J, Wang S, Liu L, et al. Upregulated  $\beta$ 1-6 branch N-glycan marks early gliomagenesis but exhibited biphasic expression in the progression of astrocytic glioma. 2015;5:1101–16.
33. Hassani Z, Saleh A, Turpault S, Khiati S, Morelle W, Vignon J, et al. Phostine PST3.1a Targets MGAT5 and Inhibits Glioblastoma-Initiating Cell Invasiveness and Proliferation. *Mol Cancer Res [Internet]*. 2017;15:1376–88. Available from: <http://mcr.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1541-7786.MCR-17-0120>
34. Saxena N, Mogha P, Dash S, Majumder A, Jadhav S, Sen S. Matrix elasticity regulates mesenchymal stem cell chemotaxis. *J Cell Sci [Internet]*. 2018;jcs.211391. Available from: <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.211391>
35. Svaldo Lanero T, Cavalleri O, Krol S, Rolandi R, Gliozzi A. Mechanical properties of single living cells encapsulated in polyelectrolyte matrixes. *J Biotechnol.* 2006;124:723–31.
36. Hertz H. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *J fur die Reine und Angew Math.* 1882;1882:156–71.
37. Sneddon IN. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int J Eng Sci.* 1965;3:47–57.
38. Vinckier a, Semenza G. Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *FEBS Lett.* 1998;430:12–6.
39. Butt HJ, Cappella B, Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf Sci Rep.* 2005;59:1–152.
40. Martin M, Benzina O, Szabo V, Végh A-G, Lucas O, Cloitre T, et al. Morphology and Nanomechanics of Sensory Neurons Growth Cones following Peripheral Nerve Injury. *PLoS One [Internet]*. 2013;8:e56286. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0056286>
41. Radmacher M, Fritz M, Kacher CM, Cleveland JP, Hansma PK. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys J [Internet]*. 1996;70:556–67. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349596796029>

42. International Society of Biorheology. T, Ohayon J, Picart C, Tracqui P. An extended relationship for the characterization of Young's modulus and Poisson's ratio of tunable polyacrylamide gels. [Internet]. Biorheology. Pergamon Press; 2006 [cited 2018 Sep 25]. Available from: <https://content-iospress-com.gate2.inist.fr/articles/biorheology/bir442>
43. Guichet PO, Bieche I, Teigell M, Serguera C, Rothhut B, Rigau V, et al. Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. *Glia*. 2013;61:225–39.
44. Dromard C, Guillon H, Rigau V, Ripoll C, Sabourin JC, Perrin FE, et al. Adult human spinal cord harbors neural precursor cells that generate neurons and glial cells in vitro. *J Neurosci Res* [Internet]. Wiley-Blackwell; 2008 [cited 2018 Sep 25];86:1916–26. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.21646>
45. Monzo P, Chong YK, Guetta-Terrier C, Krishnasamy A, Sathe SR, Yim EKF, et al. Mechanical confinement triggers glioma linear migration dependent on formin FHOD3. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2016;27:1246–61. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84963582773&partnerID=tZOtx3y1>
46. Bangasser BL, Shamsan GA, Chan CE, Opoku KN, Tüzel E, Schlichtmann BW, et al. Shifting the optimal stiffness for cell migration. *Nat Commun*. 2017;8:1–10.
47. Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM. Random versus directionally persistent cell migration. *Mol Cell*. 2010;10:538–49.
48. Osswald M, Jung E, Sahm F, Solecki G, Venkataramani V, Blaes J, et al. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;528:93–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature16071>
49. Singh A, Brito I, Lammerding J. Beyond Tissue Stiffness and Bioadhesivity: Advanced Biomaterials to Model Tumor Microenvironments and Drug Resistance. *Trends in Cancer* [Internet]. Elsevier Inc.; 2018;4:281–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trecan.2018.01.008>
50. Cukierman E. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Sci (New York, NY)*. 2001;294:1708–12.
51. Nam S, Hu KH, Butte MJ, Chaudhuri O. Strain-enhanced stress relaxation impacts nonlinear elasticity in collagen gels. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2016;113:5492–7. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1523906113>
52. Xu W, Mezencev R, Kim B, Wang L, McDonald J, Sulchek T. Cell Stiffness Is a Biomarker of the Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells. *PLoS One*. 2012;7.

53. Chen YQ, Lan HY, Wu YC, Yang WH, Chiou A, Yang MH. Epithelial-mesenchymal transition softens head and neck cancer cells to facilitate migration in 3D environments. *J Cell Mol Med.* 2018;22:3837–46.
54. Xiwei Zheng, Cong Bi, Marissa Brooks and DSH. HHS Public Access. *Anal Chem.* 2015;25:368–79.
55. Bosch-Fortea M, Martín-Belmonte F. Mechanosensitive adhesion complexes in epithelial architecture and cancer onset. *Curr Opin Cell Biol.* 2018;50:42–9.
56. Kumar A, Ouyang M, Van den Dries K, McGhee EJ, Tanaka K, Anderson MD, et al. Talin tension sensor reveals novel features of focal adhesion force transmission and mechanosensitivity. *J Cell Biol.* 2016;213:371–83.
57. Qinglei Hang A, Tomoya Isaji A, Sicong Hou A, Yuqin Wang, a, b Tomohiko Fukuda A, Gua J. A Key Regulator of Cell Adhesion: Identification and Characterization of Important N-Glycosylation Sites on Integrin alpha5 for Cell Migration. 2017;37:1–14.
58. Siebzehnruhl FA, Silver DJ, Tugertimur B, Deleyrolle LP, Siebzehnruhl D, Sarkisian MR, et al. The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation , invasion and chemoresistance. 2013;1196–212.
59. Noh M, Oh S, Ahn E, Kim Y, Jung T, Jung S, et al. Prognostic significance of E-cadherin and N-cadherin expression in Gliomas. *BMC Cancer;* 2017;1–10.
60. Garros-Regulez L, Garcia I, Carrasco-Garcia E, Lantero A, Aldaz P, Moreno-Cugnon L, et al. Targeting SOX2 as a Therapeutic Strategy in Glioblastoma. *Front Oncol [Internet].* 2016;6:1–7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2016.00222/full>
61. Ben-porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, George W, Regev A, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet.* 2008;40:499–507.
62. Velpula KK, Dasari VR, Tsung AJ, Dinh DH, Rao JS. Cord blood stem cells revert glioma stem cell EMT by down regulating transcriptional activation of Sox2 and Twist1. *Oncotarget.* 2011;2:1028–42.
63. Cheung KJ, Ewald AJ. A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. *Science (80- ).* 2016;352:167–9.
64. Fabisiewicz A, Grzybowska E. CTC clusters in cancer progression and metastasis. *Med Oncol. Springer US;* 2017;34:1–10.
65. Iser IC, Pereira MB, Lenz G, Wink MR. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Process in Glioblastoma: An Updated Systematic Review and In Silico Investigation. *Med Res Rev.* 2017;37:271–313.
66. Mittal V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2018;13:395–412.

67. Iliina O, Friedl P. Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J Cell Sci*. 2009;
68. Smalley KSM, Brafford P, Haass NK, Brandner JM, Brown E, Herlyn M. Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. *Am J Pathol*. 2005;166:1541–54.
69. Spadaro D, Le S, Laroche T, Mean I, Jond L, Yan J, et al. Tension-Dependent Stretching Activates ZO-1 to Control the Junctional Localization of Its Interactors. *Curr Biol* [Internet]. Elsevier Ltd.; 2017;27:3783–3795.e8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.014>
70. Li X, Wang X, Tan Z, Chen S, Guan F. Role of Glycans in Cancer Cells Undergoing Epithelial–Mesenchymal Transition. *Front Oncol* [Internet]. 2016;6:1–5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2016.00033/abstract>
71. Goetz JG, Joshi B, Lajoie P, Strugnell SS, Scudamore T, Kojic LD, et al. Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. *J Cell Biol*. 2008;180:1261–75.
72. Nabi IR, Shankar J, Dennis JW. The galectin lattice at a glance. *J Cell Sci* [Internet]. 2015;128:2213–9. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.151159>
73. Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;15:540–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3982>
74. Paszek MJ, Dufort CC, Rossier O, Bainer R, Mouw JK, Godula K, et al. The cancer glyocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. 2015;511:319–25.
75. Taniguchi N, Kizuka Y. Glycans and cancer: Role of N-Glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics [Internet]. 1st ed. *Adv. Cancer Res*. Elsevier Inc.; 2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.acr.2014.11.001>
76. Takahashi M, Kizuka Y, Ohtsubo K, Gu J, Taniguchi N. Disease-associated glycans on cell surface proteins. *Mol Aspects Med* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;51:56–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2016.04.008>
77. Isaji T, Sato Y, Zhao Y, Miyoshi E, Wada Y, Taniguchi N, et al. N-glycosylation of the ??-propeller domain of the integrin ??5 subunit is essential for ??5??1 heterodimerization, expression on the cell surface, and its biological function. *J Biol Chem*. 2006;281:33258–67.
78. Kerstein PC, Nichol IV RH, Gomez TM. Mechanochemical regulation of growth cone motility. *Front Cell Neurosci*. 2015;
79. Leight JL, Wozniak M a., Chen S, Lynch ML, Chen CS. Matrix rigidity regulates a switch between TGF-1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell*. 2012;23:781–91.

80. Garros-Regulez L, Garcia I, Carrasco-Garcia E, Lantero A, Aldaz P, Moreno-Cugnon L, et al. Targeting SOX2 as a Therapeutic Strategy in Glioblastoma. *Front Oncol*. 2016;6:1–7.
81. Gloushankova NA, Rubtsova SN, Zhitnyak IY. Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells. *Tissue Barriers*. 2017.
82. Jolly MK. Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Front Oncol* [Internet]. 2015;5:1–19. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2015.00155/abstract>
83. Messica Y, Laser-Azogui A, Volberg T, Elisha Y, Lysakovskaia K, Eils R, et al. The role of Vimentin in Regulating Cell Invasive Migration in Dense Cultures of Breast Carcinoma Cells. *Nano Lett*. 2017;17:6941–8.
84. Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M. Mechano-sensing by actin filaments and focal adhesion proteins. *Commun Integr Biol* [Internet]. 2012;5:572–7. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cib.21891>
85. Takahashi M, Kizuka Y, Ohtsubo K, Gu J, Taniguchi N. Disease-associated glycans on cell surface proteins. *Mol. Aspects Med*. 2016.
86. Lu J, Isaji T, Im S, Fukuda T, Hashii N, Takakura D, et al.  $\beta$ -Galactoside  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase 1 promotes transforming growth factor- $\beta$ -mediated epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2014;289:34627–41.
87. Velpula KK, Dasari VR, Tsung AJ, Dinh DH, Rao JS. Cord blood stem cells revert glioma stem cell EMT by down regulating transcriptional activation of Sox2 and Twist1. *Oncotarget* [Internet]. 2011;2:1028–42.





# Partie III : Brevet

*Réseau tridimensionnel biocompatible et son utilisation en tant que support de cellules*

# Introduction

La nature infiltrante des cellules de gliome rend impossible la résection chirurgicale malgré de grands progrès en neurochirurgie et leurs capacités de radio et chimiorésistance empêchent leur éradication conduisant à des récives. Il est donc impératif de connaître les mécanismes détaillés pour développer des méthodes d'interventions efficaces. De ce fait, disposer de nouvelles matrices 3D pour la culture cellulaire permettant de récapituler *in vitro* les différents paramètres physiques et chimiques du microenvironnement influençant la migration semble indispensable.

Les deux précédentes études ont permis la mise au point de matrices 3D de nanofibres biocompatibles, présentant une perméabilité pour la migration en profondeur des GSC et la réalisation d'analyses complexes. Nous avons également pu modifier leur rigidité via l'ajout de nanotubes de carbone et la chimie de surface via la laminine. Il est donc possible avec ce réseau de dissocier l'impact des propriétés physiques de celui des propriétés chimiques sur les différents comportements migratoires observés. De plus ce système 3D de fibres ne semble pas présenter à notre connaissance les limitations décrites dans la littérature sur les systèmes 3D. Toutes ces observations nous ont donc conduits à un dépôt de brevet et à une volonté d'étendre ce système à d'autres types cellulaires.

Enfin l'induction de différents comportements migratoires des GSC en fonction des paramètres modifiés ont permis d'envisager ce système également pour du criblage haut débit de composés anti-prolifératifs et/ou antimigratoires. En effet, de nombreuses études montrent la différence d'efficacité de composés anticancéreux lors de tests comparatifs entre des systèmes 2D de culture classique (boîtes de Pétris, lames de verre...) et les systèmes de culture 3D. Ces tests vont bien souvent dans le sens de modifications des IC50 en 3D par rapport à la 2D (Langhans 2018).

De plus, le test de composés sur des cellules dans une matrice 3D correspondant au type cellulaire semblerait adéquat. Les paramètres physiques de l'environnement pouvant impacter directement les types migratoires, la différenciation, la dédifférenciation ou encore la trans-différenciation des cellules qui y sont cultivées semblent indiquer qu'il est envisageable d'adapter le modèle au type cellulaire en contrôlant finement les paramètres physico-chimiques.

Dans notre cas, les possibilités d'analyses complexes, d'imagerie et de modulations de la rigidité des nanofibres dérivées du PAN permettent d'envisager ces matrices pour réaliser le criblage et l'identification de composés anti-migratoires ou anti-prolifératifs, ainsi que de réaliser ces tests dans différentes conditions migratoires, comme lors d'un processus EMT.

**RESEAU TRIDIMENSIONNEL BIOCOMPATIBLE  
ET SON UTILISATION EN TANT QUE SUPPORT DE  
CELLULES  
CN103498211  
Fr1851324**

**Norbert Bakalara, David Cornu, Emilie Marhuenda et Ali Saleh**

## **Abregé**

### **Réseau tridimensionnel biocompatible**

#### **Et son utilisation en tant que support de cellules**

L'invention a pour objet un réseau tridimensionnel infusible de fibres de polymère réticulé, adapté en tant que support cellulaire, et notamment caractérisé en ce que le diamètre desdites fibres est compris entre 0,1 et 1,5  $\mu\text{m}$ , la taille des interstices entre lesdites fibres est comprise entre 0,1 et 50  $\mu\text{m}^2$ , et la rigidité dudit réseau est caractérisée par un module d'élasticité compris entre 0,01 et 10 000 kPa, de préférence entre 0,1 et 10 000 kPa, de préférence entre 0,1 et 1 000 kPa, plus préférentiellement entre 0,1 et 300 kPa.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un réseau tridimensionnel de fibres de polymère réticulé comprenant une étape de synthèse dudit réseau par électrofilage d'une solution de PAN, optionnellement additionnée d'un agent rigidifiant, suivie par une étape de traitement thermique sous atmosphère oxydante et à une température comprise entre 40 °C et 400 °C, de préférence entre 200 °C et 300 °C.

L'invention a enfin pour objet un réseau tridimensionnel infusible de fibres de polymère réticulé en tant que support de cellules, utilisable notamment pour l'étude de la survie et de la migration cellulaires.





# Discussion et perspectives

---

La récurrence liée à la migration, est un obstacle majeur aux thérapies efficaces dans le cas des glioblastomes mais également dans de nombreux cancers. La compréhension des mécanismes fondamentaux de la migration influencée par tous les différents paramètres environnementaux, qu'ils soient physiques ou chimiques, est donc essentielle.

De plus, bien que d'un meilleur pronostic, 70% des gliomes de grade II présentent une récurrence et une transformation anaplasique dans les 10 ans suivant la première chirurgie, faisant des propriétés invasives des cellules de gliomes un problème plus général, étendu à différents grades tumoraux (Manini et al. 2018).

La très grande complexité de gliomes se traduit tant par la coexistence de nombreux modes migratoires différents, collectifs ou individuels, mésenchymateux ou amiboïdes que par des phénotypes intermédiaires. Cette diversité migratoire est dépendante de nombreux paramètres intra ou extra-cellulaires et les cellules migrantes de gliomes profitent de structures cérébrales préexistantes pour favoriser la migration et sont capables de réarranger drastiquement leur micro-environnement de sorte à le rendre plus favorable.

Par conséquent pouvoir comprendre et à terme, cibler la migration devient indispensable. C'est dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de thèse. D'une part, par la mise au point d'une nouvelle matrice 3D fibrillaire biomimétique dont il est possible de moduler les propriétés physico-chimiques indépendamment, et d'autre part, par la diminution importante de l'agressivité induite à une rigidité optimale pour la migration, *via* l'inhibition de la MGAT5. De plus, le système se montre prometteur pour les tests de composés antiprolifératifs et/ou antimigratoires dans des conditions plus proches de l'*in vivo*, capables d'induire différents comportements migratoires.

Comme nous l'avons décrit précédemment, les GSC possèdent des voies de migrations préférentielles de structures fibrillaires comme, le corps calleux, la membrane basale des vaisseaux sanguins, l'espace subarachnoïdien ou le parenchyme sain (Cuddapah et al. 2014a). La membrane basale présente sur les vaisseaux sanguins, bien connue pour l'augmentation des comportements migratoires (Kawataki et al. 2007), possède une composition qui lui est propre contenant de la laminine contrairement aux autres structures (Bonnans, Chou, and Werb 2014).

En plus de l'aspect fibrillaire, plusieurs configurations d'alignements augmentés sont également décrites comme étant capables de promouvoir la migration des GSC. Le processus desmoplastique favorisant l'alignement des protéines de la MEC augmentant la migration (P. G. Gritsenko, Ilina, and Friedl 2012b) (Xiwei Zheng, Cong Bi, Marissa Brooks 2015a) et, la migration abondante dans le corps calleux qui est une structure hautement alignée et une des voies préférentielles de migration des GSC (Cuddapah et al. 2014b).

Le système des nanofibres dérivées de PAN non renforcées que nous avons mis au point présente dans nos conditions de préparation un diamètre de fibres moyen de 0.65 $\mu$ m. Ce diamètre est comparable à celui des axones du corps calleux décrit dans la littérature aux alentours de 0.6 $\mu$ m de diamètre (Liewald et al. 2014) (Publi.1 Fig 1.E). L'organisation orientée du réseau de fibres fait également penser à l'organisation tridimensionnelle de cette structure (Publi 1. Fig A et B). Le diamètre des pores entre 0.5 et 7  $\mu$ m<sup>2</sup> et leur

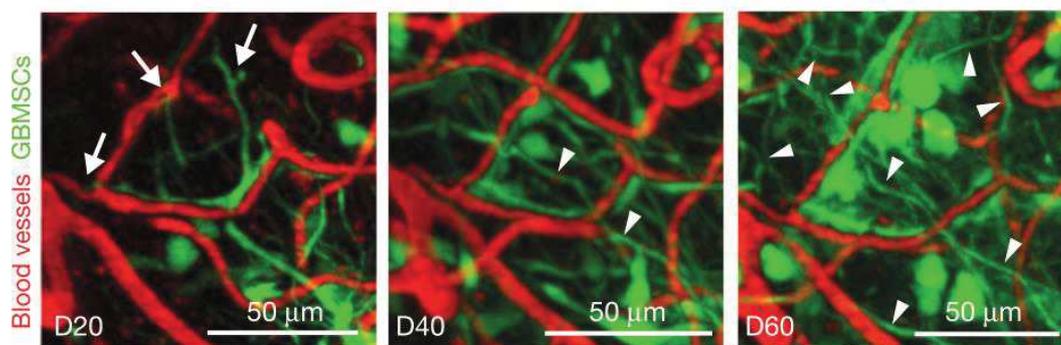
distribution permettent le maintien en situation de confinement tout en restant permissif pour les GSC (P. Monzo et al. 2016) (Publi 1. Fig A et B).

Ainsi, la topologie fibreuse de nos matrices 3D récapitule celle des MEC cérébrales en contact avec les cellules de glioblastome au cours de leur migration, constituée de fibres myélinisées (Publi 2. Fig. 1), de prolongements axoniques et dendritiques ainsi que de trajets le long des vaisseaux sanguins.

Comme nous l'avons vu précédemment dans notre première étude « A novel 3D nanofibre scaffold conserves the *in vivo* plasticity of glioblastoma stem cell invasion by regulating galectin-3 and integrin  $\beta$ 1 expression », nous avons utilisé deux cultures primaires de cellules souches de glioblastome différentes (Gli4 et GliT) présentant des profils transcriptomiques bien distincts.

L'une des premières observations lors du dépôt des GSC sur les fibres, fut la morphologie très différente entre les cellules en 2D et celles sur les matrices 3D de NF. En 2D les GSC sont étalées, présentant souvent de larges lamellipodes lorsqu'elles sont déposées de manière dissociées. En 3D, les GSC sont bien plus fines et présentent une configuration bipolaire ou très polarisée (invadopodes à l'avant et noyau à l'arrière) suivant les fibres, avec de longs pseudopodes capables de s'enrouler le long des NF. Leurs noyaux semblent également subir une déformation et paraît plus « allongé » mais cette observation nécessite quantification (Publi. 1 Fig. 2 E et F). La même observation a été faite entre Gli4 et GliT.

De plus la morphologie des GSC observée sur les fibres est bien plus proche de celle qui a été observée *in vivo* sur des GSC xénogreffées dans un cerveau de souris (Osswald et al. 2015a). De plus les cellules migrent profondément dans l'épaisseur du réseau, mettant en évidence sa permissivité (Publi 1. Fig.2B).



Figures 55 : GSC dans un cerveau de souris après 60jours, migrant le long des vaisseaux sanguins et dans le parenchyme sain (Osswald et al. 2015b).

Lors du dépôt de neurosphères de Gli4 sur les fibres, après 5 jours de migration, nous avons pu observer la capacité de ces cellules à réaliser de la migration collective dans le réseau de fibres en absence de protéines de la MEC. Puis, lorsque nous avons fonctionnalisé le réseau avec de la laminine, nous avons pu observer alors une migration de type individuelle.

A l'inverse, lors du dépôt de NS de GliT que nous avons laissé migrer 5 jours également, le passage en migration individuelle en présence de LN fut bien moins important, avec une migration collective toujours marquée dans ces conditions (Publi. 1, Fig. 5 C et D).

Le dépôt de laminine que nous utilisons avait pour but de mimer en partie la composition protéique de membrane basale des vaisseaux sanguins. De plus, les cellules de gliomes ont été rapportées comme sécrétant elle-même de la laminine (Kawataki et al. 2007). Nous ne savons pas à ce stade si des protéines de la MEC sont sécrétées par les Gli dans cet environnement 3D et si ces protéines produites interagissent avec le réseau. Nous avons par la suite, plutôt concentré notre attention sur la signalisation induite par l'adhésion des cellules aux fibres en présence et en absence de laminine.

Nous avons observé que le sens de migration est gouverné par l'orientation des fibres, qui lorsqu'elles sont alignées permettent de mimer la topographie de surface trouvée lors des processus desmoplastiques (Northey, Przybyla, and Weaver 2017), le long de la substance blanche du corps calleux ou de la membrane basale des vaisseaux sanguins. Ces inductions directionnelles de la migration illustrent donc le processus de topo-induction ou d'haptokinésie induit par les fibres.

La complexité des glioblastomes et leur hétérogénéité, conduisent les cellules à posséder des affinités différentes au micro-environnement et aux protéines de la MEC. Cette différence d'affinité peut provenir soit de l'hétérogénéité inter tumorale entre les différents patients, soit de l'hétérogénéité intra tumorale due à la zone de prélèvement de l'échantillon collecté sur le patient à l'origine, qui nous est inconnue sur nos cultures primaires. En effet, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que la réponse migratoire des GSC diffère en fonction de la localisation du prélèvement provenant de la périphérie ou du centre de la tumeur par exemple.

L'analyse transcriptomique entre ces deux cultures cellulaires a mis en évidence, parmi plus de 935 gènes régulés de manière différentielle, une différence d'expression des intégrines, des protéines de la MEC et des molécules d'adhésions (Publi. 1 Sup. Table 6). Ainsi pour Gli4, il y a une expression plus importante de la transcription du gène LAMA2 de la laminine, COL11A1 du collagène, de l'intégrine ITGA10 et de la CAMKIID impliquée dans la migration. Les GliT quant à elles montrent une transcription plus importante du gène de la laminine LAMA1, des gènes du collagène COL1A1, COL4A6, COL20A1, COL22A1, des gènes des intégrines ITGA6 et ITGA5, et pour les molécules d'adhésions L1CAM, CAMK2N1, MCAM, NRCAM.

Au vu de la capacité des cellules de gliomes à sécréter leurs propres protéines de MEC et du profil transcriptomique, il serait intéressant de quantifier l'expression de collagène réalisée par les GliT lorsqu'elles sont en neurosphère en conditions de prolifération et sur les fibres en conditions de différenciation, et de tester également si la réalisation d'un revêtement de collagène pourrait permettre aux GliT d'augmenter leur migration individuelle.

Les différences de migration entre ces deux lignées, en plus de leurs différences de profil transcriptomique, pourrait laisser supposer une différence d'affinité pour la laminine entre Gli4 et GliT. De

plus, de manière hypothétique, leurs différences pourraient s'expliquer également par la localisation des échantillons d'origines au sein du glioblastome des patients dont ils sont issus.

Le fait que l'absence de protéines de la MEC ou le manque d'affinité pour une protéine de la MEC conduise à un comportement de migration collective est dû à un processus appelé anoïkis (Gudipaty and Rosenblatt 2017). Il s'agit de la mort des cellules par leur détachement des protéines de la MEC. Ce mode migratoire a déjà été décrit dans les glioblastomes par Serres et al. en 2014 (Serres et al. 2014) et par Gritsenko et al. en 2017 (P. Gritsenko et al. 2017). Dans notre cas, en absence de protéines de la MEC ou de protéines pour lesquelles il y a une affinité, nous observons que les cellules vont migrer collectivement en conservant leurs jonctions cellules-cellules, via la N-Cadhérine notamment (Publi. 1 Fig. 3C), en accord avec les observations de Gritsenko et al. en 2017 (P. Gritsenko et al. 2017). Cette hypothèse est appuyée par les expressions protéiques que nous avons observées.

Dans le cas des Gli4 en condition 3D +LN, nous pouvons observer une augmentation de l'intégrine  $\beta 1$ , de la galectine 3 ainsi qu'une augmentation de la quantité de FAK par rapport aux autres conditions (Publi 1, Fig. 6A et Sup.3). L'augmentation de l'intégrine  $\beta 1$  et de la galectine 3 est liée à une résistance à l'apoptose et à l'anoïkis (Xin, Dong, and Guo 2015) et les intégrines  $\beta 1$  utilisent plusieurs voies de signalisation incluant FAK (Paoli, Giannoni, and Chiarugi 2013). Ces deux protéines sont donc impliquées dans le passage en migration individuelle observé précédemment.

La galectine 3 module les adhérences cellules-cellules et les adhérences cellules-MEC (Nabi, Shankar, and Dennis 2015), promeut l'interaction avec la laminine (Barboni, Bawumia, and Hughes 1999), permet l'hétérodimérisation des intégrines  $\alpha 5\beta 1$ , est essentielle à leur adressage à la surface cellulaire (Isaji et al. 2006) et, favorise l'organisation des intégrines  $\beta 1$  en large cluster (Yang et al. 2017). Par conséquent, c'est ici la surexpression concomitante de l'intégrine  $\beta 1$  et de la galectine3 en 3D+LN qui va favoriser le passage d'une migration collective à une migration individuelle. L'organisation en large cluster des intégrines  $\beta 1$  favorisée par l'augmentation de la galectine3 est nécessaire à la migration le long des fibres et est visible grâce au marquage intégrines  $\beta 1$  (Publi 1, Fig. 6B et Sup.3).

De plus, l'augmentation de l'intégrine  $\beta 1$ , décrite comme permettant l'interaction avec la laminine une fois hétérodimérisée (Belkin and Stepp 2000), illustre l'augmentation d'interactions cellules-MEC pour les Gli4, en même temps que FAK (Tomakidi et al. 2014) en condition 3D+LN et montre l'augmentation des adhérences focales fonctionnelles permettant le lien avec la MEC. Ce résultat est cohérent avec la diminution des contacts cellules-cellules au profit d'une migration individuelle augmentant donc l'adhérence cellules-MEC.

L'augmentation du ratio pFAK/FAK avec la phosphorylation de FAK sur la tyrosine 397 (Y397) est corrélée à une augmentation de la dynamique de désassemblage des adhérences focales (Tomakidi et al. 2014) (Swaminathan, Fischer, and Waterman 2016). En 3D +LN, le fait qu'il n'augmente pas signifie la présence d'adhérences focales plus stables et plus importante en 3D – et +LN qu'en 2D+LN. L'absence d'augmentation

du ratio Taline Clivée/Taline Totale en 3D et de la Calpaïne 2 en 3D +LN va également dans ce sens, car le clivage de Taline par la Calpaïne 2 est augmenté lors du processus de désassemblage des adhérences focales (Publi 1, Fig. 6A et Sup.3)(Franco et al. 2004b).

Enfin, l'intégrine  $\beta 1$  en présence de laminine peut être hétérodimérisée avec les intégrines  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$  (Belkin and Stepp 2000),  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  ou encore l'intégrine  $\alpha 5$ , et il a été montré une expression d'intégrines  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$  sur la vascularisation tumorale (Kawataki et al. 2007). Il serait donc intéressant de voir avec quelles intégrines la sous-unité  $\beta 1$  est hétérodimérisée, avec une priorité sur la sous-unité  $\alpha 5$ , connue pour reconnaître l'isoforme 511 de la laminine que nous utilisons ici (Kawataki et al. 2007). De plus, l'hétérodimérisation du couple d'intégrines  $\alpha 5 \beta 1$  est dépendante de la MGAT5 et donc de la galectine 3 (Yang et al. 2017).

En 2D+LN, la réponse des GSC Gli4 à la laminine n'est pas une augmentation de la taille ou de la force des adhérences, car il n'y a pas d'augmentation de la galectine 3 ni de l'intégrine  $\beta 1$ , mais une augmentation de leur turn-over car il y a une augmentation de la calpaïne 2, du ratio Taline Clivée/Taline Totale (Franco et al. 2004b) et du ratio pFAK/FAK. Ceci illustre l'augmentation de la dynamique de désassemblage et l'instabilité des adhérences focales en 2D (Publi 1, Fig. 6A et Sup.3) (Tomakidi et al. 2014).

Ici on peut donc voir une réponse différentielle des Gli4 à la laminine en fonction des propriétés physiques du support et des contraintes migratoires auxquelles elles doivent répondre. On suppose que les larges clusters d'intégrines  $\beta 1$  ainsi que la diminution du désassemblage des adhérences focales permettent aux Gli4 un lien plus fort à la matrice pour que la cellule puisse exercer une force de traction nécessaire pour sa pénétration dans les pores étroits des NF lors de la migration individuelle (Fraleay et al. 2010). Il serait intéressant de regarder la dynamique du cytosquelette et la contractilité corticale via la myosine II contractile, souvent décrite comme impliquée dans la migration 3D et les situations de confinements (Paluch, Aspalter, and Sixt 2016a). Il serait également relevant de réaliser de la vidéo microscopie en 3D (comme nous avons pu le faire pour l'imagerie calcique) pour observer la dynamique de l'actine le long des fibres, via par exemple, une actine-GFP. En 2D au contraire la réponse migratoire va être vers une migration favorisant l'assemblage et le désassemblage des adhérences focales sans augmentation de la liaison cellule-matrice.

Par cette première publication nous avons pu mettre en évidence la validité du système 3D de NF de PAN et sa biocompatibilité. Nous avons également pu voir que les GSC vivent, adhèrent et migrent sur le réseau qui présente une bonne perméabilité pour l'infiltration cellulaire. Les expressions protéiques (intégrines  $\beta 1$ , galectine 3, calpaïne 2) et les comportements migratoires ont également été validés lorsque nous les avons comparés à ceux observés lors de xénogreffes sur cerveau de souris. Le mimétisme des NF ont également permis d'observer des comportements migratoires similaires à ceux observés dans le corps calleux (Publi 1, Fig. 7D) ou le long de la membrane basale des vaisseaux sanguins (P. G. Gritsenko, Ilina, and Friedl 2012b).

De plus ce système a permis de mettre en évidence des réponses différentielles aux protéines de la MEC en fonction de la dimensionnalité et des affinités des GSC à des protéines de la MEC spécifiques.

Néanmoins, il serait très intéressant dans ce contexte de réaliser un revêtement au collagène, que l'on suppose sécrété par les GliT, ou à l'acide hyaluronique que l'on retrouve abondamment dans le corps calleux et d'observer les comportements migratoires induits.

Ce furent toutes ces observations qui nous ont conduits dans un premier temps à envisager un dépôt de brevet, avec la volonté de tester le système de NF de PAN sur d'autres lignées cellulaires.

Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés à l'impact de la rigidité sur la migration des GSC. Dans la deuxième publication « MGAT5 promotes highly invasive phenotype of GSCs induced by optimal stiffness » nous avons renforcé les nanofibres avec des nanotubes de carbone à très faible concentration de sorte à créer une échelle de rigidité moyenne allant de 3.2kPa (NF de PAN sans MWCNT) à 166 kPa , 542kPa et 1260kPa.

Il est difficile de rapprocher ces rigidités à celles trouvées *in vivo*. Tout d'abord parce que les propriétés mécaniques du cerveau et celles rapportées dans les cas de gliomes sont mesurées *via* l'élastographie par résonance magnétique (McIlvain et al. 2018), permettant d'obtenir une vision d'ensemble des propriétés mécaniques cérébrales dépendantes des zones. Les différentes zones sont souvent mesurées aux alentours de 3-4kPa dans un contexte non GBM (Murphy et al. 2013)(McIlvain et al. 2018). Il s'agit donc d'une vision macroscopique ne rendant pas compte des propriétés mécaniques qu'il est possible de rencontrer à l'échelle d'une cellule. De plus, en fonction des différentes composantes de la MEC rencontrées, elles ne possèdent pas les mêmes propriétés mécaniques. Par exemple, les fibrilles de collagène ont été mesurées à 1200 MPa, ce qui est une valeur très haute. L'élastine quant à elle, est mesurée à 1MPa (Handorf et al. 2015). La membrane basale des vaisseaux sanguins est comprise entre 0.7 et 10 MPa, mais lorsque toute la paroi du vaisseau est mesurée, le module trouvé a été de 100 à 400kPa, dépendant de l'épaisseur (Sarveswaran et al. 2016). On peut donc aisément imaginer que la grande diversité des propriétés mécaniques, inhérentes au tissu et à son état, puisse conduire à de micro-rigidifications locales par exemple conduisant à une diversité de propriétés physiques perçues par la cellule, non mesurables *in vivo* par élastographie par résonance magnétique.

Chauvet et al. en 2015 ont publié que des patients atteints de gliomes de bas-grade et de glioblastomes présentent des rigidités intracérébrales de  $23.7 \pm 4.9$  kPa et  $11.4 \pm 3.6$  kPa alors que le tissu sain cérébral a de son côté été estimé à  $7.3 \pm 2.1$  kPa (Chauvet et al. 2015). Pogoda et al. en 2014 avaient quant à eux décrit le fait que les tissus de gliomes présentaient une rigidification plus importante que les tissus sains lorsqu'ils étaient comprimés, mais que sans compression ils ne présentaient pas de rigidités plus importantes que le tissu sain (Pogoda et al. 2014b). Enfin Box et al. en 2015 ont décrit que la rigidité en périphérie des tumeurs sur des souris xénogreffées était plus haute que dans la masse tumorale (Box et al. 2016).

Au vu de toutes ces informations entre les propriétés mécaniques micro et macroscopiques et la capacité des cellules de gliomes à sécréter leur propres protéines de la MEC, il est très difficile de statuer sur

des propriétés mécaniques particulières, représentatives des GBM ou définissant une structure spécifique rencontrée par les GSC.

Nous avons donc testé une gamme de rigidités (Publi 2 Fig. 1 A, Supp 1 A, B, C et D). La modulation des propriétés mécaniques a été réalisée sans modifier la rugosité des fibres (Publi 2 Fig. 1 B), ni leur diamètre (Publi 2 Fig. 1 C), ni leur chimie de surface (Publi 2 Supp. 3 A et B) ou encore leur espacement (Publi 2 Fig. 1 D). Les nanotubes de carbone sont incorporés à l'intérieur des nanofibres électrospum (Publi 2 Fig. 1 E). Les NF présentent une auto-fluorescence à toutes les longueurs d'onde de 405 à 681 nm qui n'est pas modifiée en fonction des différentes concentrations de nanotubes de carbone (Publi 2 Supp.3)

La mesure de rigidité a été réalisée grâce à la microscopie à force atomique (AFM) par le Dr. Martà Martin-Fernandez du Laboratoire Charles Coulomb (UMR5221 CNRS Université de Montpellier), grâce à l'application de forces de 300pN sur les nanofibres en solution sachant que les forces exercées par une cellule sont estimées de 0.1 à 1000pN (Bangasser et al. 2017b). Les essais sont donc encore une fois réalisés dans des conditions tentant de rester au plus proche des propriétés mécaniques rencontrées *in vitro* par les cellules.

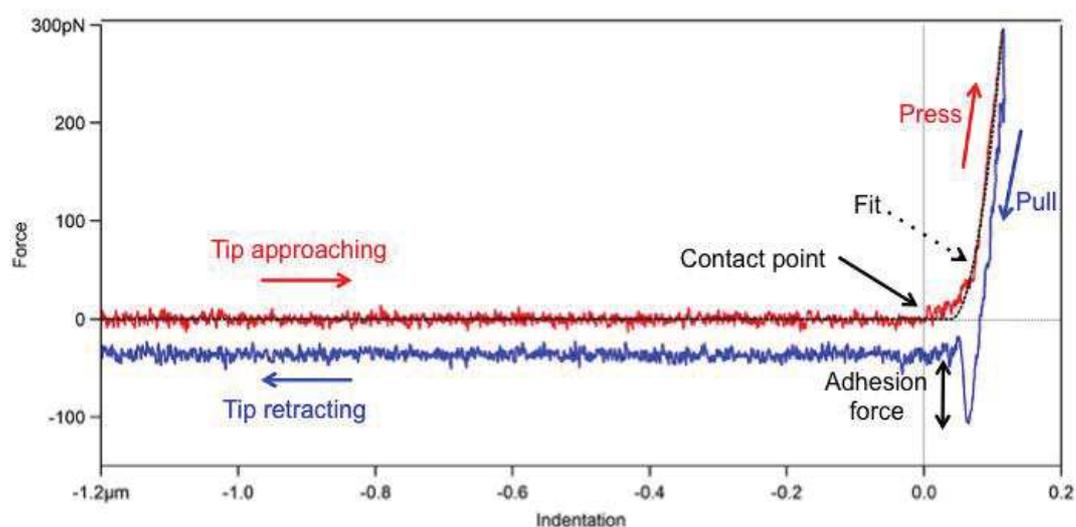


Figure 56 : Courbe de force d'adhésion mesurée avec l'AFM. D'abord on approche la pointe polarisée de l'AFM d'une fibre de l'échantillon. Ensuite la pointe entre en contact avec la fibre, puis une force de 300pN est appliquée. Une fois les 300pN atteints la pointe est reculée. Néanmoins une fois que le matériau est censé être revenu à sa position initiale, la fibre continue d'adhérer à la pointe, et donc y reste collée pendant l'éloignement de celle-ci jusqu'à ce que la force de cohésion du réseau de fibres ne devienne plus importante que la force d'interaction fibre-pointe. C'est la force d'adhésion. La déformation élastique est obtenue à partir des courbes de forces en fonction de la charge appliquée à la pointe. Le module de Young (E) a été calculé pour chaque force à partir de la partie approchante des courbes de forces.

Sur cette deuxième étude nous avons étudié uniquement les Gli4. Pour la suite les différentes conditions de rigidités 3.2, 166, 542 et 1260kPa seront renommées : S3,2, S166 , S542 et S1260.

Tout au long de cette étude, nous avons décidé de travailler en absence de protéines de MEC pour n'observer que l'impact des propriétés physiques sur la migration. En effet comme nous avons pu le voir précédemment, la dimensionnalité ou encore la rigidité (dans le cas du verre) favorise une réponse différentielle aux protéines de MEC et modifie la dynamique des adhérences focales. L'avantage de cette matrice 3D de NF nous permettant de dissocier l'impact des propriétés mécaniques de celui des propriétés chimiques en conservant l'affinité des cellules pour le support, nous permettra donc de réaliser des observations avec une modulation seule de la rigidité.

Lorsque nous avons déposé les NS de Gli4 (que j'appellerai GSC pour la suite) sur toutes les conditions de rigidité, après 5 jours de migration, nous avons pu voir l'existence d'une rigidité optimale de migration à 166kPa pouvant augmenter jusqu'à 4 fois la vitesse de migration. Une rigidité optimale pour la migration des GSC avait déjà été décrite par Bangasser et al. en 2017 aux alentours de 100kPa (Bangasser et al. 2017b). Nos résultats sont donc cohérents avec cet ordre de grandeur (Publi 2 Fig. 2 A et E). L'observation de cette augmentation de migration a été faite en condition de migration, c'est-à-dire en condition de différenciation.

Par la suite, nous avons voulu observer si cette rigidité optimale pouvait être suffisante pour être un facteur d'induction de la migration, même dans une situation non favorable qui est ici celle de prolifération. Dans cette condition de culture nous sommes en absence de sérum et en présence de facteur de croissance. Ce milieu de prolifération est d'ordinaire utilisé pour cultiver les neurosphères en condition de non-adhérence. Nous avons alors pu voir que lorsque les NS ont été déposées sur les fibres et ont migré pendant 5 jours en condition de prolifération, la rigidité optimale S166 a été suffisante pour induire la migration.

Ceci signifie que cette rigidité peut-être un signal déclencheur de migration, mettant en évidence que les facteurs de croissance ou les protéines de la MEC ne sont pas les seuls responsables de l'induction de la migration (Publi 2 Fig. 2 B et F).

Nous avons tout de même vérifié que l'augmentation de la migration ne soit pas due à un effet pro-prolifératif des différentes fibres, qui aurait alors pu favoriser la croissance en expansion décrite par Friedl et ses collaborateurs (2012) (Friedl et al. 2012) par exemple, ou forcer la sortie des cellules de la neurosphère par compression et ainsi augmenter la migration. A 5 jours, nous n'observons pas de différence de prolifération entre les différentes rigidités (Publi 2 Fig. 2 C).

Ces premiers résultats permettent de se questionner sur le déclenchement de la migration *in vivo* lors de la croissance tumorale, indépendamment de l'aspect chimique ou chimiotactique du microenvironnement. Du fait de la sécrétion de protéines de la MEC par les cellules tumorales changeant la rigidité du microenvironnement et de l'augmentation du confinement due à la croissance tumorale, la question se pose

donc sur ce qu'il se passe *in vivo* lors de la rencontre des GSC avec des propriétés mécaniques favorables au déclenchement de la migration.

Comme décrit dans la première publication, en 3D les cellules sont beaucoup plus fines et bipolaires qu'en 2D ; elles suivent les fibres et cela dans toutes les conditions de rigidités (Publi. 2 Fig. 3 A). Néanmoins les différences de rigidités ont conduit à des modifications de la morphologie des cellules. A S3.2 et S166, les cellules sont plus longues qu'à S542 et S1260, ce que l'on pourrait attribuer à un phénotype moins invasif à plus haute rigidité en 3D (Lyons et al. 2016). De plus dans les conditions S3.2, S542 et S1260, les cellules sont un peu plus larges qu'à S166 (Publi. 2 Fig. 3 B et C). La taille du noyau étant le facteur limitant à l'infiltration (C. D. Paul, Mistrionis, and Konstantopoulos 2017), des cellules plus fines, c'est-à-dire avec un noyau et un corps cellulaire plus déformables sont attribuées à un phénotype plus invasif (Watkins and Sontheimer 2012) en accord avec l'augmentation de la migration dans la condition S166. Il a de plus été décrit par Tee et al. en 2011 que la rigidité du substrat impacte la rigidité et la surface des cellules lorsqu'elles sont dans des espaces ouverts. Néanmoins dans des situations de confinement ou quand les cellules sont limitées à de petites surfaces d'adhésion, la forme des cellules domine la rigidité du substrat et la rigidité du substrat n'influence plus la rigidité de la cellule (Tee et al. 2011). Nos résultats sont cohérents avec ces observations.

La modification de la morphologie des cellules dans ces matrices 3D à différentes rigidités est visible sur la Figure 3D de la Publi. 2 lors de l'augmentation du ratio de la largeur/longueur.

L'augmentation du comportement invasif des cellules tumorales est bien souvent reliée à l'EMT. De plus la rigidité est connue pour augmenter l'EMT également (W. Zhang et al. 2017). Par conséquent, nous avons voulu observer l'expression des différents marqueurs qui y sont assimilés dans les GSC sur toutes les conditions de rigidités (Publi. 2, Fig. 4C et Supp.5). En conséquence, dans la condition S166, nous avons pu voir l'augmentation de la N-cadhérine, dont l'expression augmente dans la GMT (Ferrer, Moura Neto, and Mentlein 2018), ainsi que de ZEB1 qui est un gène régulateur de l'EMT, relié à un mauvais pronostic dans les GBM (Siebzehnubl et al. 2013a). Il y a également l'augmentation de SOX2 sur les NF S166 (Publi. 2, Fig. 4C et Supp.5), décrit comme étant corrélé à un mauvais pronostic, à la radio et à la chimiorésistance dans les processus de GMT (Garros-Regulez et al. 2016a). SOX2 serait régulé par un autre régulateur de l'EMT qui est Twist1 (Velpula et al. 2011a).

Bien que la vimentine soit impliquée dans l'EMT, elle ne semble pas ici présenter d'augmentation sur les NF S166 en comparaison avec les autres rigidités en 3D (Publi. 2, Fig. 4C et Supp.5). Néanmoins l'expression en 2D ne présente de différence qu'avec les conditions S3.2 et S542. Jolly et al. en 2015 ont décrit que le phénotype d'EMT partiel est essentiel pour la migration des cellules cancéreuses (Jolly 2015). Nous sommes peut-être ici dans cette configuration.

La MGAT5 est connue pour favoriser l'EMT et être augmentée durant celle-ci (Hassani et al. 2017), néanmoins les mécanismes par lesquels sont permis cette implication restent peu compris. Ici, l'augmentation de la galectine 3 sur les NF S166 nous montre l'implication de la MGAT5 dans le processus d'EMT induit par

cette rigidité optimale pour la migration (Publi. 2, Fig. 4C et Supp.5). En effet la galectine 3 reconnaît les motifs  $\beta$ 1,6-GlcNAc transférés par la MGAT5 sur les glycoprotéines (Fortuna-Costa et al. 2014). Par conséquent, l'implication de la MGAT5 induit l'augmentation de la galectine 3.

L'EMT est souvent décrite par un passage en migration individuelle. Toutefois, il s'agit d'un processus pouvant présenter de nombreuses modulations, dont les caractéristiques peuvent également être dépendantes du type cellulaire dans lequel elle a lieu. Il est possible d'avoir des phénotypes intermédiaires, comme par exemple un comportement de migration « collective mésenchymateuse » décrite par Friedl et al. (Friedl et al. 2012). Ce mode migratoire correspond ici à nos observations car dans la condition S166, qui induit une nette augmentation de la migration et un phénotype EMT-like, il n'y a pas de diminution de la migration collective (Publi. 2, Fig. 4B) et une augmentation de ZO1 impliquée fortement dans les jonctions cellules-cellules est observée (Publi. 2, Fig. 4C et Supp.5).

La protéine ZO1 a également été décrite comme diminuant lors de l'EMT, mais ceci est dû au fait du passage en migration dite « individuelle » nécessitant moins de jonctions cellules-cellules et plus de jonctions cellules-matrices. De plus, il a déjà été démontré que dans des cellules de mélanome l'augmentation concomitante de ZO1 et de la N-cadhérine était associée avec un phénotype invasif (Smalley et al. 2005). De plus, les cellules tumorales circulantes, décrites dans de nombreux cancers, lorsqu'elles migrent en étant regroupées (ou en « cluster ») ont une résistance à l'apoptose plus élevée, une capacité d'initiation des tumeurs plus importante et conduisent à un plus mauvais pronostic que les migrations individuelles. Enfin la migration collective permettrait une chimiorésistance plus importante (Fabisiewicz and Grzybowska 2017).

L'augmentation de ZO1 uniquement à S166 peut être due à une augmentation des besoins de transmission d'informations mécaniques et de cohésion à cette rigidité et dans cette condition migratoire. Un besoin de renforcement des jonctions cellules-cellules répondrait peut-être à la migration « mésenchymateuse collective », permettant de réaliser des forces de traction plus grandes entre les cellules, permettant une migration collective plus rapide.

Dans les conditions de rigidité optimale pour la migration S166, nous nous trouvons donc dans une situation regroupant de nombreux paramètres associés à une agressivité importante et à une chimiorésistance. En effet cette condition regroupe l'augmentation de l'EMT, du phénotype souche et de la migration collective même si elle n'est habituellement pas décrite dans le même contexte que l'EMT.

Au niveau des adhérences focales maintenant, dont la cohérence implique la galectine 3 également, nous pouvons voir une augmentation de la quantité de taline totale ainsi qu'une augmentation de la calpaïne 2 à S166 (Publi. 2, Fig. 4C et Supp.5). Il y a donc une augmentation de la quantité globale de taline clivée, mais pas du ratio taline clivée/taline totale, qui n'est alors pas due à une augmentation de l'activité de la calpaïne2 mais plutôt à une augmentation de la quantité des adhérences focales matures fonctionnelles (Elosegui-Artola et al. 2016) et donc de calpaïne2 nécessaire, conduisant probablement à une modification de la dynamique des adhérences.

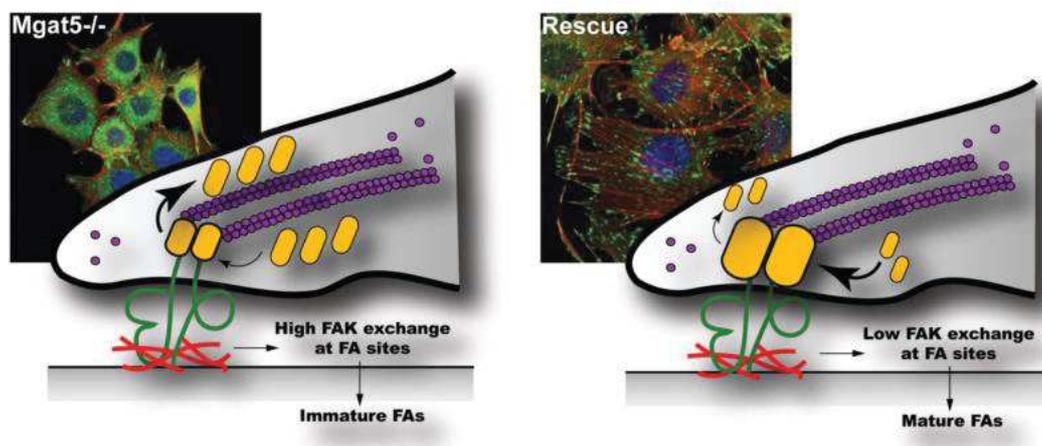
L'intégrine  $\beta 1$  quant à elle, ne voit pas son expression augmentée à S166 bien que l'augmentation de la taline totale et de la calpaïne2 semble indiquer une augmentation du nombre ou de la taille des adhérences focales matures (Publi. 2, Fig. 4C et Supp.5). Ici il faudrait donc que nous testions la forme activée de l'intégrine  $\beta 1$  car l'augmentation de la forme activée témoigne de l'augmentation du nombre d'adhérences focales fonctionnelles, ainsi que l'intégrine  $\alpha 5$ . La littérature décrit que l'activation de l'intégrine  $\beta 1$  via son hétérodimérisation avec l'intégrine  $\alpha 5$  permet leur recrutement aux membranes grâce à la galectine3 (Qinglei Hang et al. 2017). De plus l'hétérodimérisation de ce couple d'intégrines est régulée par la MGAT5, qui va glycosyler l'intégrine  $\alpha 5$ , permettant ensuite son hétérodimérisation avec l'intégrine  $\beta 1$  qui sera alors activée (Isaji et al. 2006).

Enfin, la calpaïne2 a récemment été vue comme impliquée dans la régulation de l'EMT (Y. Liu et al. 2018) mettant en évidence le rôle des protéines d'adhérences focales dans la régulation de l'agressivité et de l'EMT.

L'augmentation probable ici du nombre ou de la taille des adhérences focales matures met en évidence l'augmentation du comportement migratoire en réponse au signal mécanique à S166.

L'augmentation ici de l'intégrine  $\beta 1$  n'apparaît pas en première analyse, en accord avec les observations du premier article (Publi 1, Fig. 6A et Sup.3) car, nous ne passons pas ici en migration individuelle, par conséquent cette augmentation d'agressivité à S166 n'augmente pas les jonctions cellules-matrices. Néanmoins, nous observons une augmentation de la galectine 3, qui pourrait être liée à l'augmentation de l'agressivité de manière plus générale, indépendamment de la migration individuelle ou collective.

La MGAT5 est impliquée dans l'EMT (Hassani et al. 2017), dans l'hétérodimérisation des intégrines et, avec la galectine 3, dans la maturation des adhérences focales. Par conséquent, son inhibition semblait permettre de faire le lien entre deux phénomènes. De plus le treillis galectine3/MGAT5 est associé à la maturation des adhérences focales (Goetz 2009) et à leur renouvellement permettant de promouvoir un comportement migratoire (Melo et al. 2011).



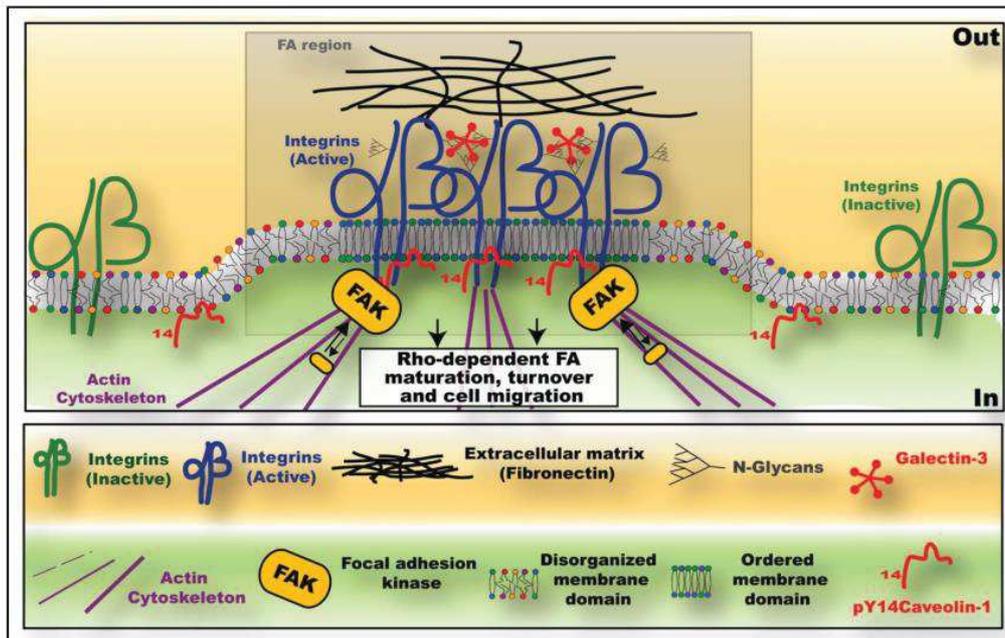


Figure 57 : Schéma récapitulant l'implication du treillis galectine3/MGAT5 dans la régulation des adhérences focales. Le treillis permet donc la maturation des adhérences focales et leur renouvellement (Goetz 2009).

Comme détaillé dans l'introduction, les adhérences focales sont des biocapteurs mécaniques bidirectionnels qui permettent aux cellules d'intégrer des signaux intracellulaires et extracellulaires. Elles ont été de nombreuses fois décrites comme capables d'intégrer l'information mécanique, telle que la rigidité, et de transmettre cette information au cytosquelette.

Par conséquent l'inhibition de la MGAT5 dans notre contexte est prometteuse. Nous avons donc décidé de réaliser son inhibition via la technique CRISPR Cas9 sur les cultures primaires de GSC Gli4 (Publi 2, Fig. 5A et Supp.6). Toutes les expérimentations réalisées par la suite sur les mutants MGAT5 KO ont été réalisées avec un n=3 ou n=4, où chaque n est issu d'un clone MGAT5 KO différent, cultivés séparément, pour s'assurer que le phénotype observé n'est pas dû aux clones sélectionnés lors du tri des cellules mais bien dû à la mutation. Le tri a été réalisé dans le but d'isoler et de caractériser les cellules sur lesquelles la transfection a été efficace et portant bien la mutation MGAT5.

La première observation faite sur les GSC MGAT5 KO fût la même que celle réalisée par l'équipe auparavant dans la publication « Phostine PST3.1a Targets MGAT5 and Inhibits Glioblastoma-Initiating Cell Invasiveness and Proliferation » par Z. Hassani et al. en 2017 (Hassani et al. 2017). Les GSC montrent une inhibition de contact (Publi 2, Fig. 5B et C), c'est-à-dire qu'elles présentent des difficultés à rester cohésives et font donc de nombreux agrégats, à l'inverse des GSC WT qui ont tendance à se regrouper pour former de très grosses neurosphères en condition de prolifération.

Les GSC WT et les GSC MGAT5 ko ne semblent pas présenter de différences en termes de prolifération (Publi 2, Supp. 4). C'est aussi cohérent avec les résultats vus précédemment par l'équipe. La

Phostine PST3.1a n'avait présenté des effets antiprolifératifs qu'à partir de l'utilisation au micromolaire, alors que l'effet anti migratoire en 2D été visible au nanomolaire.

Lors du dépôt des neurosphères de GSC présentant une inhibition de la MGAT5 sur les fibres de différentes rigidités, nous avons pu voir une diminution importante de la migration à la rigidité optimale S166 en condition de différenciation (Publi 2, Fig. 5D,F). Ces résultats nous ont donc confirmé l'implication de la MGAT5 dans l'agressivité présente à S166.

Suite à l'observation de l'effet anti-migratoire de la mutation MGAT5 KO sur les GSC à S166 en différenciation, nous avons voulu voir si l'absence de la MGAT5 était également capable d'inhiber le déclenchement de la migration à S166 en condition de prolifération. Malheureusement, nous n'avons pas pu conclure à ce sujet, l'inhibition de contact étant trop importante, comme ce qui est visible sur la Publi. 2 Fig. 5 E. De nombreux agrégats se détachent des neurosphères et l'augmentation de migration des GSC MGAT5 KO par rapport au GSC WT visible à S3.2 ne permet pas de déterminer s'il s'agit véritablement de migration ou d'un étalement des cellules à l'intérieur de la matrice 3D. De même pour la situation S1260.

A S166 et S542 il ne semble pas y avoir de différences migratoires, mais il est encore une fois difficile de déterminer s'il ne s'agit pas d'inhibition de contact (Publi 2, Fig. 5E,F).

Nous avons également quantifié la morphologie des cellules aux différentes rigidités. La première observation fut que les GSC MGAT5 KO sont beaucoup moins longues à S3.2 et S166, et un peu moins longues à S542 que les GSC WT. De plus, contrairement au GSC WT, elles ne présentent pas de différences de longueurs entre les différentes rigidités, mettant en évidence la diminution de perception de l'environnement mécanique des GSC MGAT5 KO (Publi 2, Fig. 6A).

La largeur des GSC MGAT5 KO quant à elle, est diminuée par rapport au GSC WT (Publi 2, Fig. 6B). Néanmoins, il n'y a plus de différences de largeurs entre la condition S3.2 et la condition de rigidité optimale S166. La largeur des GSC MGAT5 KO réaugmente à nouveau à S542 et S1260 mais reste toujours plus petite que les GSC WT. Cette largeur moins importante que celle des GSC WT peut être due au fait que les cellules sans MGAT5 sont plus petites (Publi 2, Supp.4 A et B). En effet malgré l'absence de différences en termes de prolifération, les neurosphères composées du même nombre de cellules sont plus petites pour les GSC mutantes que pour les WT.

La différence de longueur des GSC MGAT5 ko et la diminution importante des variations entre les différentes rigidités sont surtout visibles lorsque l'on regarde le ratio de la largeur sur la longueur des GSC (Publi 2, Fig. 6C). Les différences de ratio observées entre les différentes rigidités chez les GSC MGAT5 ko sont bien moins importantes que chez les GSC WT.

Il semble donc que les GSC mutantes font moins varier leur morphologie en réponse aux différentes rigidités que les GSC WT, et semblent moins agressives à S3.2, S166 et S542 au vue de la diminution de leur longueur (Lyons et al. 2016).

Suite à la diminution de migration observée à S166 chez les GSC MGAT5 KO, nous avons regardé à nouveau les protéines impliquées dans l'EMT et les adhérences focales chez les mutants.

Concernant l'EMT, nous avons pu observer à S166 une diminution de la N-cadhérine à S166 dans les GSC MGAT5 KO en comparaison avec les GSC WT, ainsi qu'une diminution de ZO1. Zeb1 ne présente pas de différence entre les GSC WT et les GSC MGAT5 KO en termes de niveau d'expression à chaque rigidité, néanmoins Zeb1 ne présente plus de différence d'expression entre les différentes rigidités chez les GSC MGAT5 ko (Publi 2, Fig. 6D, Supp.6).

La vimentine quant à elle, ne semble pas présenter de différence d'expression entre les GSC WT et les GSC MGAT5 KO, mais ne présente également plus de différence entre la 2D et les conditions S3.2 et S542 (Publi 2, Fig. 6D, Supp.6).

Au niveau des adhérences focales, il y a une diminution de la calpaïne2 à S166 chez les mutants MGAT5 KO par rapport au WT, qui réaugmente ensuite à S1260. La diminution de la calpaïne 2 à S166 est cohérente et concomitante avec une diminution de la quantité de taline totale chez les GSC MGAT5 KO par rapport aux WT. La taline ne semble plus présenter également de différences entre les différentes rigidités. La calpaïne 2 quant à elle n'a plus de différences d'expression entre les rigidités S3.2, S166 et S542 chez les mutants (Publi 2, Fig. 6D, Supp.6).

La galectine 3 elle aussi ne montre plus de modulation en fonction des rigidités chez les GSC MGAT5 KO et voit son expression diminuer à S166 en comparaison avec les GSC WT (Publi 2, Fig. 6D, Supp.6). Ce résultat était attendu du fait de l'absence de MGAT5 qui est identifiée comme responsable de son augmentation.

SOX2 par contre ne semble pas présenter de modification entre les GSC WT et les mutants, excepté une augmentation de son expression à S542 pour les GSC MGAT5 KO (Publi 2, Fig. 6D, Supp.6). Par conséquent, la modulation de son expression en fonction de la rigidité n'est pas dépendante du treillis MGAT5/Galectine 3. Son changement d'expression semble dépendant d'un autre mécanisme. SOX2 ayant été démontré comme régulé par Twist1 (Velpula et al. 2011a), il serait intéressant d'observer la modulation de Twist1 et SOX2 avec et sans MGAT5.

Au vue de l'expression de toutes ces protéines liées à l'EMT chez les GSC MGAT5 ko en comparaison avec les GSC WT, nous pouvons déduire que cela semble cohérent avec la diminution de l'aire de migration et donc de l'agressivité observée à S166 chez les GSC MGAT5 ko en comparaison avec les GSC WT.

De façon globale, il y a une diminution de la sensibilité à la rigidité chez les mutants MGAT5 KO. La diminution de la quantité de calpaïne 2 et de taline totale à S166 indique une quantité d'adhérences focales matures et fonctionnelles diminuée chez les mutants par rapport aux WT, associées au niveau d'expression constant de la galectine 3 entre les différentes rigidités chez le mutant. L'absence de modulation de la

galectine 3 ne permet donc pas l'augmentation d'adhérences focales matures chez les mutants MGAT5, que l'on a pu observer à S166 chez les GSC WT, et induit donc une diminution de la sensibilité aux propriétés mécaniques.

Du côté de l'EMT, la diminution de la N-cadhérine à S166 montre également une diminution de la sensibilité à la rigidité induisant l'EMT des GSC MGAT5 KO. Nous pouvons supposer que l'absence de MGAT5 ne joue pas sur l'expression de Zeb1 au vu de son expression, mais joue plutôt sur la réponse de celui-ci à la perception de l'environnement physique.

Les adhérences focales étant connues pour leurs capacités de perception de l'environnement mécanique, nous avançons l'hypothèse que l'inhibition de la MGAT5, ne pouvant plus ajouter de motif  $\beta$ 1,6-GlcNAc reconnue par la galectine 3 au niveau des adhérences focales, impacte la réponse de celles-ci à la rigidité. Les adhérences focales, ne pouvant alors plus envoyer suffisamment l'information mécanique permettant l'augmentation de l'EMT la vitesse de migration à la rigidité optimale S166 s'en trouve diminuée.

Par cette deuxième publication nous montrons donc l'implication de la MGAT5 dans la mécanoréception. Ici, nous proposons que l'influence de la MGAT5 sur l'EMT soit réalisée via la sensibilité des adhérences focales à l'environnement mécanique grâce au treillis MGAT5/Galectine 3. Il serait à présent relevant de xénogreffer nos lignées de GSC MGAT5 ko pour observer leur comportement *in vivo*.

En s'inspirant du schéma de Goetz et al. en 2009 (Goetz 2009), nous proposons donc le mode d'action si dessous.

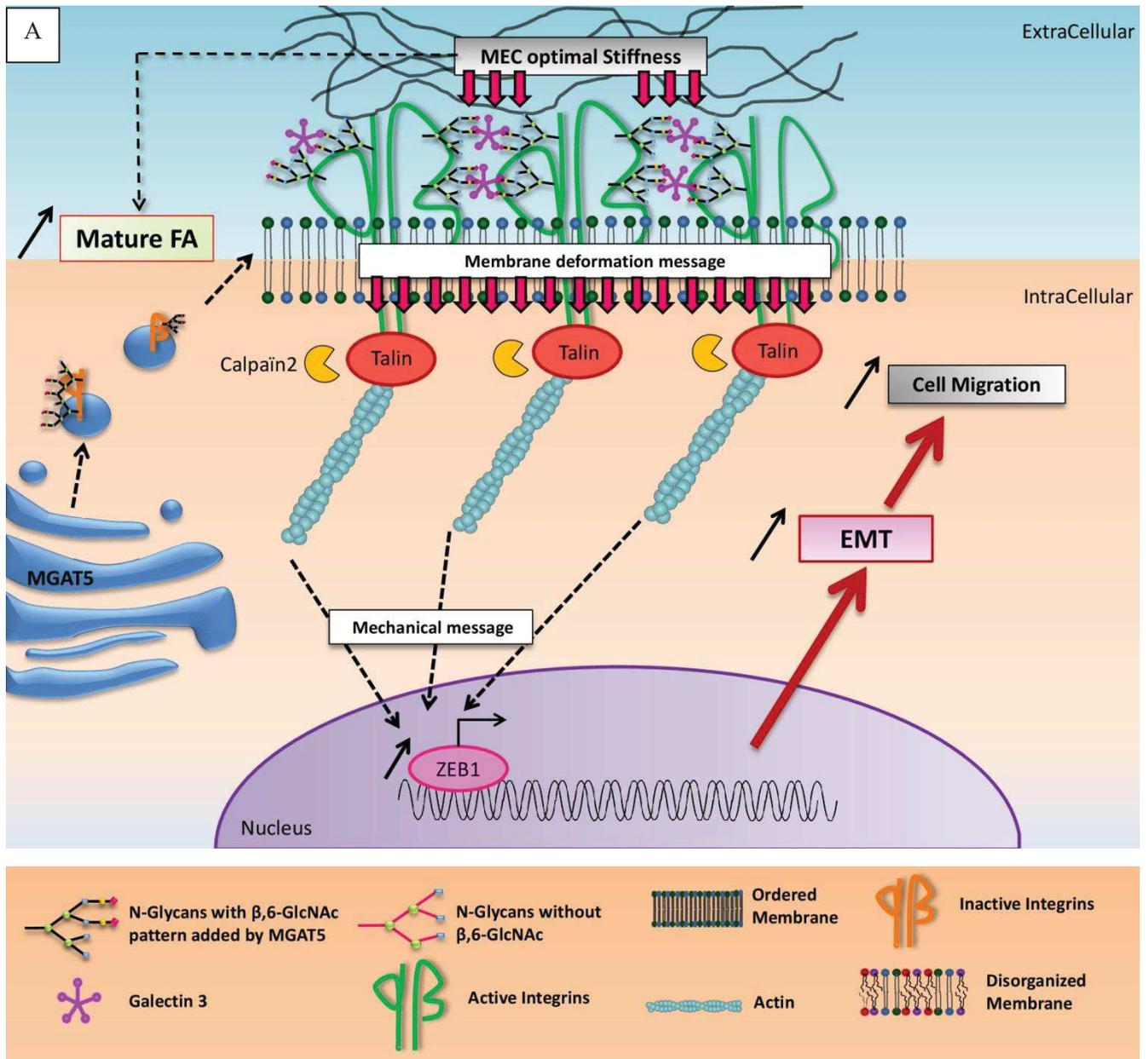


Figure 58 A : Schéma récapitulatif représentant l'implication du treillis MGAT5/galectine 3 dans la mécanotransduction et l'EMT. Situation en présence de MGAT5. En présence d'une rigidité optimale, il y a une augmentation du treillis MGAT5/Galectine 3 aux adhérences focales, permettant l'augmentation de leur maturation, favorisant l'envoi de l'information mécanique au noyau, permettant la transcription de Zeb1 promouvant l'EMT.

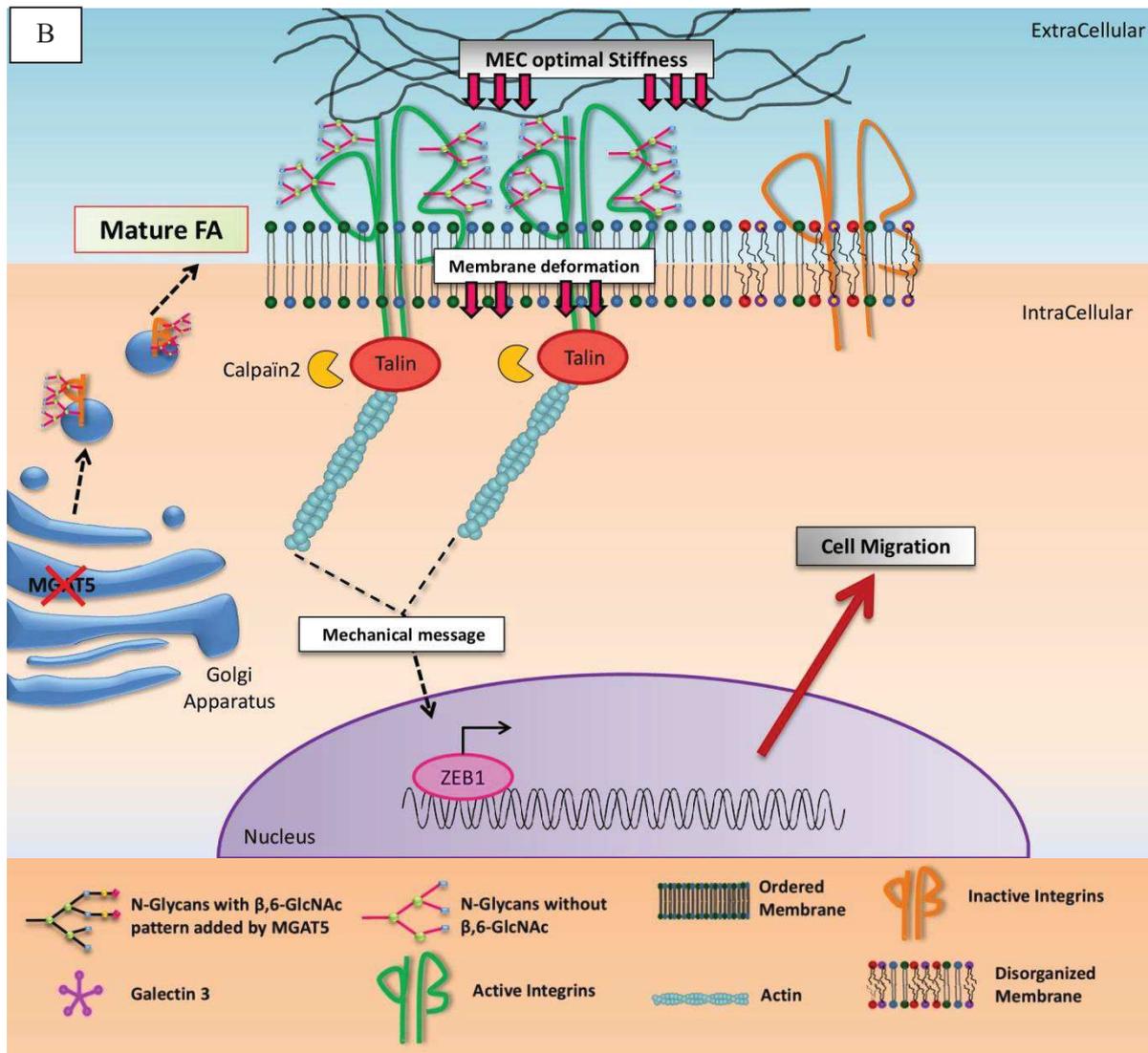


Figure 58 B : Schéma récapitulatif représentant l'implication du treillis MGAT5/galectine 3 dans la mécanotransduction et l'EMT. Situation en absence de MGAT5. En présence d'une rigidité optimale, il ne peut pas y avoir d'augmentation du treillis MGAT5/Galectine 3 aux adhérences focales, qui ne pourront alors pas retranscrire l'information mécanique. Il n'y aura alors pas d'augmentation de l'EMT.

Malgré l'efficacité de l'inhibition de la MGAT5 sur la migration, l'EMT et les adhérences focales, lorsque nous avons observé l'expression de la MGAT5 dans les différentes conditions de rigidités chez les GSC WT, nous n'avons pas vu de modulations de celle-ci (résultats non montrés ici). Il serait donc indispensable d'observer l'expression de la ST6GAL1 dans les différentes rigidités. Le caractère multibranché  $\beta$ 1,6 catalysé par la MGAT5 voit ses extensions polylactosaminiques contrôlées par cette enzyme via l'ajout d'un acide sialique  $\alpha$ 2,6 (Takahashi et al. 2016a). L'avidité de la galectine 3 pour les motifs  $\beta$ 1,6 est donc contrôlée par la ST6GAL1. Par conséquent, comme la ST6GAL1 contrôle le treillis galectine 3 et que la galectine 3 est augmentée sur les NF S166, nous pouvons supposer un modulation de son expression, qui a d'ailleurs été déjà observée durant l'EMT (J. Lu et al. 2014).

De façon tout à fait intéressante, en 2D les GSC WT présentent les mêmes expressions de protéines que dans la condition 3D S166 au niveau des adhérences focales, de l'EMT ou encore de la galectine 3, sous-entendant une perception de la rigidité différente entre 2D et 3D, du fait de la rigidité très élevée du verre ( $\approx 70$  GPa (Nouri et al. 2017)). Néanmoins, lors de l'inhibition de la MGAT5, la condition 2D ne présente pas de modification de l'expression de ces protéines en comparaison avec les GSC WT. Ceci pourrait signifier que la modulation de la perception de la rigidité par le treillis MGAT5/galectine 3 est inhérente au 3D et à la condition maximale pour la migration S166 (Publi 2, Supp.6).

Une autre possibilité est que la rigidité favorisant une réponse des GSC doit être beaucoup plus importante en absence de MGAT5 pour permettre l'induction de l'EMT et l'augmentation de la migration. En effet, l'absence du treillis MGAT5/galectine3 rendant les adhérences focales moins sensibles à la déformation car moins matures, nous permet d'envisager que l'induction de l'EMT nécessite une déformation des membranes et une tension appliquée au niveau aux adhérences focales plus importante pour parvenir à transmettre l'information mécanique au cytosquelette. Ceci expliquerait la réaugmentation de la N-cadhérine ou de la calpaïne2 observée à S1260 chez les GSC MGAT5 KO en comparaison avec les GSC WT. En absence de MGAT5, les GSC en 3D à S1260 présentent un profil plus proche de la 2D. Nous pourrions supposer par conséquent que la MGAT5 autorise une réponse à des rigidités plus basses en 3D et favorise donc une réponse dans une gamme de rigidités bien plus physiologiques. Néanmoins pour affirmer cette idée, il serait nécessaire de comparer la réponse à la rigidité en 3D avec une gamme de rigidité en 2D.

Nous avons pu observer en 2D sur les cellules Gli4 que le mécanorécepteur Piezo1, se trouve également à proximité des adhérences focales dans cette configuration migratoire, suggérant un rôle fonctionnel à cette proximité, peut-être identique en 3D et dans différentes rigidités (Nourse and Pathak 2017). Ce mécanorécepteur permet la perception de l'information mécanique comme la rigidité, le confinement ou la compression tissulaire. Ce type de canaux ioniques peut être activé mécaniquement de deux façons : la transduction de force à travers des ancrages du cytosquelette au mécanorécepteur, ou la transduction des forces par la membrane (Nourse and Pathak 2017). La première façon inclut la possibilité qu'un ancrage extracellulaire ou intracellulaire tire sur le canal, permettant son ouverture *via* un changement de conformation (Nourse and Pathak 2017). Nous émettons l'hypothèse ici que cet ancrage au niveau extra cellulaire pourrait être réalisé grâce au treillis galectine.

Nos résultats préliminaires, qui ne sont pas présentés ici, montre une co-localisation de Piezo1 avec les zones où l'actine et la vinculine sont très présentes. La galectine 3 est elle aussi localisée au niveau des adhérences focales en 2D. Par conséquent il serait vraiment très intéressant de regarder la glycosylation de ce mécanorécepteur et l'implication qu'elle pourrait avoir dans sa sensibilité.

L'induction de ces différents modes migratoires sur ces matrices de NF 3D, qu'ils soient individuels, collectifs, en configuration EMT-like ou en migration collective mésenchymateuse, rendent ce modèle prometteur pour tester différentes molécules anti-migratrices durant le développement pré-clinique. Il serait en

effet possible de tester les molécules sur différentes configurations migratoires. De plus les possibilités d'analyses complexes qu'offre ce réseau permettent d'amener plus loin l'étude des éventuels effets des molécules anti-migratoires.

La réalisation de systèmes microfluidiques contenant ce système de fibres permettrait l'étude des variations spatio-temporelles d'un gradient chimique (Cho et al. 2011) sur les différents comportements cellulaires ou sur la migration des cellules tumorales.

Enfin, il serait également intéressant de tester la greffe de ce système 3D, pour évaluer sa biocompatibilité une fois implanté, afin d'envisager une utilisation pour de la régénération tissulaire, ou encore à des fins thérapeutiques. Jain et al. en 2014 ont implanté *in vivo* des nanofibres de Poly-ε-Caprolactone (PCL) dans un cerveau de souris préalablement xéno greffé avec des lignées de cellules souches de glioblastomes U87. Ces nanofibres de PCL ont guidé les cellules de la tumeur initiale jusque dans un espace extracortical. Cet espace extracortical était constitué d'un hydrogel de collagène conjugué à un agent pro-apoptotique : la cyclophosphamide (A. Jain et al. 2014). Il serait donc envisageable de réaliser ce type d'opération, après avoir testé la biocompatibilité en greffe, en implantant les NF *in vivo* post opératoire à l'endroit de l'exérèse de gliomes de bas grade par exemple, en fonctionnalisant les fibres avec un chimio-attractant couplé à un agent pro-apoptotique, de sorte à éviter la récurrence.





# Conclusion générale

---

Durant ces trois années de thèse, nous avons réussi à mettre au point une nouvelle matrice de NF dérivées du PAN biocompatibles et permettant l'infiltration cellulaire. Nous avons pu la fonctionnaliser avec une protéine de la MEC et moduler ses propriétés mécaniques grâce à l'ajout de nanotubes de carbone. Ce système 3D présente des capacités prometteuses en terme d'imagerie et nous a permis de réaliser des analyses transcriptomiques entre la 2D et la 3D en présence ou en absence de LN. L'issue de cette analyse transcriptomique a mis en évidence de nombreux gènes dérégulés en fonction des propriétés physiques dans lesquelles est étudiée la migration.

L'utilisation de deux lignées ayant des comportements très différents *in vivo* a également permis de mettre en évidence des réponses différentes en réaction aux protéines de la MEC utilisée sur les NF, en fonction des affinités inhérentes à ces deux cultures primaires de GSC.

Nous avons pu observer différentes configurations migratoires, individuelles ou collectives, en fonction de la présence de protéines de la MEC et des caractéristiques des GSC, associées à différentes expressions de protéines membranaires. L'expression de ces protéines des adhérences focales et leur dynamique dépendent de la dimensionnalité du système de culture et de ses propriétés mécaniques.

La modulation seule des propriétés mécaniques a montré l'existence d'une rigidité optimale à 166kPa pour la migration des GSC en 3D, induisant une augmentation importante de l'aire de migration des GSC et un comportement migratoire agressif, de type EMT-like. Cette migration augmentée est associée à la surexpression de Zeb1, de la N-cadhérine, de SOX2 et de ZO1, ainsi qu'à la surexpression de la galectine 3. Ce phénotype agressif est également associé à une modification des adhérences focales pour lesquelles nous observons une augmentation de leur configuration mature.

L'augmentation de l'aire de migration et l'augmentation de la galectine 3 à 166kPa associée à la fois à l'EMT et aux adhérences focales, a pu être diminuée fortement via l'inhibition de la MGAT5. Les GSC MGAT5 KO ne pouvant plus réaliser l'augmentation du treillis MGAT5/galectine 3 au niveau des intégrines, diminuent leur maturation et donc diminuent la transmission de l'information mécanique au cytosquelette. La rigidité n'induit alors plus le phénotype EMT-like et l'aire de migration s'en trouve donc diminuée. Par cette étude, nous avons pu montrer l'implication de la MGAT5 et donc de la glycosylation dans la mécanotransduction.

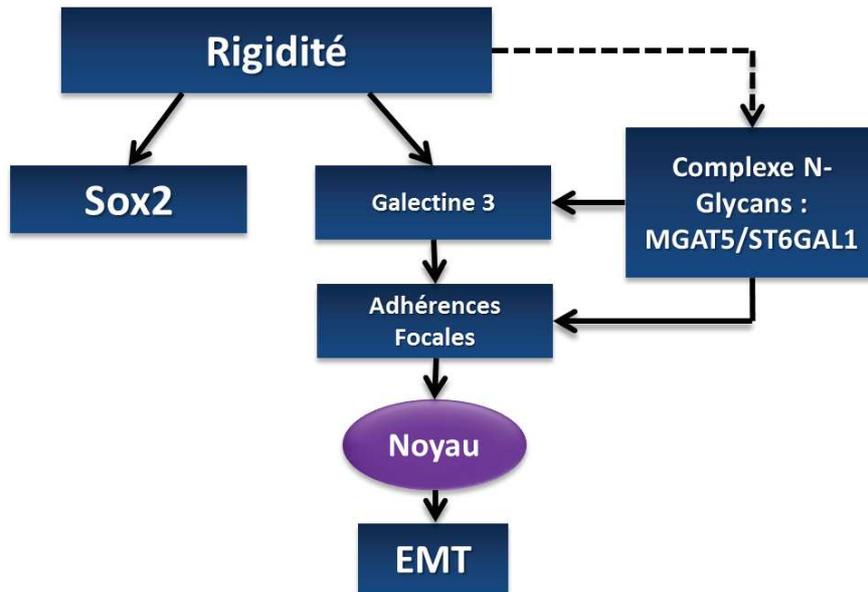


Figure 59 : Schéma résumant l'impact de la rigidité sur Sox2 et la régulation des galectines 3, des adhérences focales et de l'EMT.



# Bibliographie

---

- Adamson, Cory, Okezie O Kanu, Ankit I Mehta, Chunhui Di, Ningjing Lin, Austin K Mattox, and Darell D Bigner. 2009. "Glioblastoma Multiforme: A Review of Where We Have Been and Where We Are Going." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 18 (8): 1061–83. <https://doi.org/10.1517/13543780903052764>.
- Aiello, Nicole M, Ravikanth Maddipati, Robert J Norgard, Emma E Furth, Dafna Bar-sagi, Ben Z Stanger, Nicole M Aiello, et al. 2018. "Article EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration." *Developmental Cell* 45 (6). Elsevier Inc.: 681–695.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.05.027>.
- Akmarina, Nur, B M Said, and D Williams. 2011. "Growth Factors in Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition" 3168: 85–97. <https://doi.org/10.1159/000320360>.
- Amirian, E. Susan, Deborah Marquez-Do, Melissa L. Bondy, and Michael E. Scheurer. 2013. "Antihistamine Use and Immunoglobulin E Levels in Glioma Risk and Prognosis." *Cancer Epidemiology* 37 (6): 908–12. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2013.08.004>.
- Anugraham, Merrina, Francis Jacob, Sheri Nixdorf, Arun Vijay Everest-Dass, Viola Heinzelmann-Schwarz, and Nicolle H. Packer. 2014. "Specific Glycosylation of Membrane Proteins in Epithelial Ovarian Cancer Cell Lines: Glycan Structures Reflect Gene Expression and DNA Methylation Status." *Molecular & Cellular Proteomics* 13 (9): 2213–32. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.037085>.
- Arshad, Salman N., Mohammad Naraghi, and Ioannis Chasiotis. 2011. "Strong Carbon Nanofibers from Electrospun Polyacrylonitrile." *Carbon* 49 (5). Elsevier Ltd: 1710–19. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2010.12.056>.
- Bangasser, Benjamin L., Ghaidan A. Shamsan, Clarence E. Chan, Kwaku N. Opoku, Erkan Tüzel, Benjamin W. Schlichtmann, Jesse A. Kasim, et al. 2017a. "Shifting the Optimal Stiffness for Cell Migration." *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms15313>.
- Bangasser Benjamin L., Ghaidan A. Shamsan, Clarence E. Chan, Kwaku N. Opoku, Erkan Tüzel, Benjamin W. Schlichtmann, Jesse A. Kasim, et al. 2017b. "Shifting the Optimal Stiffness for Cell Migration." *Nature Communications* 8 (May): 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms15313>.
- Bao, Shideng, Qiulian Wu, Roger E. McLendon, Yueling Hao, Qing Shi, Anita B. Hjelmeland, Mark W. Dewhirst, Darell D. Bigner, and Jeremy N. Rich. 2006. "Glioma Stem Cells Promote Radioresistance by Preferential Activation of the DNA Damage Response." *Nature* 444 (7120): 756–60. <https://doi.org/10.1038/nature05236>.
- Barami, Kaveh, Andrew E. Sloan, Aryn Rojiani, Michael J. Schell, Aileen Staller, and Steven Brem. 2009. "Relationship of Gliomas to the Ventricular Walls." *Journal of Clinical Neuroscience* 16 (2): 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2008.03.006>.

- Barboni, E A, S Bawumia, and R C Hughes. 1999. "Kinetic Measurements of Binding of Galectin 3 to a Laminin Substratum." *Glycoconjugate Journal* 16 (7): 365–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10619709>.
- Bateman, John F., Raymond P. Boot-Handford, and Shireen R. Lamandé. 2009. "Genetic Diseases of Connective Tissues: Cellular and Extracellular Effects of ECM Mutations." *Nature Reviews Genetics* 10 (3): 173–83. <https://doi.org/10.1038/nrg2520>.
- Beauchesne, Patrick. 2011. "Extra-Neural Metastases of Malignant Gliomas: Myth or Reality?" *Cancers* 3 (1): 461–77. <https://doi.org/10.3390/cancers3010461>.
- Beliveau, Alexander, Gawain Thomas, Jiabin Gong, Qi Wen, and Anjana Jain. 2016a. "Aligned Nanotopography Promotes a Migratory State in Glioblastoma Multiforme Tumor Cells." *Scientific Reports* 6 (April). Nature Publishing Group: 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep26143>.
- Beliveau, Alexander, Gawain Thomas, Jiabin Gong, Qi Wen, and Anjana Jain. 2016b. "Aligned Nanotopography Promotes a Migratory State in Glioblastoma Multiforme Tumor Cells." *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep26143>.
- Belkin, Alexey M., and Mary Ann Stepp. 2000. "Integrins as Receptors for Laminins." *Microscopy Research and Technique* 51 (3): 280–301. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20001101\)51:3<280::AID-JEMT7>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20001101)51:3<280::AID-JEMT7>3.0.CO;2-O).
- Bell, Robert J A, H Tomas Rube, Alex Kreig, Andrew Mancini, Shaun D Fouse, Raman P Nagarajan, Serah Choi, et al. 2015. "The Mutant TERT Promoter in Cancer." *Science* 348 (6238): 1036–39. <https://doi.org/10.1126/science.aab0015>.
- Ben-porath, Ittai, Matthew W Thomson, Vincent J Carey, Ruping Ge, W George, Aviv Regev, and Robert a Weinberg. 2008. "An Embryonic Stem Cell-like Gene Expression Signature in Poorly Differentiated Aggressive Human Tumors." *Nat Genet* 40 (5): 499–507. <https://doi.org/10.1038/ng.127>.
- Bhardwaj, Nandana, and Subhas C. Kundu. 2010. "Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique." *Biotechnology Advances* 28 (3): 325–47. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>.
- Bhatia, Sangeeta N., and Donald E. Ingber. 2014. "Microfluidic Organs-on-Chips." *Nature Biotechnology* 32 (8). Nature Publishing Group: 760–72. <https://doi.org/10.1038/nbt.2989>.
- Binder, Michaela, Charlotte Roberts, Neal Spencer, Daniel Antoine, and Caroline Cartwright. 2014. "On the Antiquity of Cancer: Evidence for Metastatic Carcinoma in a Young Man from Ancient Nubia (C. 1200bc)." *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090924>.

- Blumenthal, Deborah T, Michael A Vogelbaum, D Ph, Howard Colman, D Ph, Arnab Chakravarti, Stephanie Pugh, et al. 2014. “A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma,” 699–708. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308573>.
- Bonnans, Caroline, Jonathan Chou, and Zena Werb. 2014. “Remodelling the Extracellular Matrix in Development and Disease.” *Nat Rev Mol Cell Biol* 15 (12): 786–801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>.Remodelling.
- Bosch-Fortea, Minerva, and Fernando Martín-Belmonte. 2018. “Mechanosensitive Adhesion Complexes in Epithelial Architecture and Cancer Onset.” *Current Opinion in Cell Biology* 50 (Figure 1): 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.01.013>.
- Boscher, C., and I. R. Nabi. 2013. “Galectin-3- and Phospho-Caveolin-1-Dependent Outside-in Integrin Signaling Mediates the EGF Motogenic Response in Mammary Cancer Cells.” *Molecular Biology of the Cell* 24 (13): 2134–45. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-02-0095>.
- Boscher, Cécile, Yu Zi Zheng, Ramya Lakshminarayan, Ludger Johannes, James W. Dennis, Leonard J. Foster, and Ivan R. Nabi. 2012. “Galectin-3 Protein Regulates Mobility of N-Cadherin and GM1 Ganglioside at Cell-Cell Junctions of Mammary Carcinoma Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 287 (39): 32940–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.353334>.
- Box, Gary, Suzanne Eccles, Yann Jamin, Jessica K R Boulton, Jin Li, Sergey Popov, Philippe Garteiser, et al. 2016. “Exploring the Biomechanical Properties of Brain Malignancies and Their Pathologic Determinants In Vivo with Magnetic Resonance Elastography Exploring the Biomechanical Properties of Brain Malignancies and Their Pathologic Determinants In Vivo with Magneti.” *Cancer Research* 75 (7): 1216–24. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1997>.
- Brockhausen, Inka, Saroja Narasimhan, and Harry Schachter. 1988. “The Biosynthesis of Highly Branched N-Glycans: Studies on the Sequential Pathway and Functional Role of N-Acetylglu- Cosaminyltransferases I, II, III, IV, V and VI.” *Biochimie* 70 (July 1987): 1521–33. [https://ac.els-cdn.com/0300908488902891/1-s2.0-0300908488902891-main.pdf?\\_tid=572bcf08-ac2e-11e7-bfee-00000aacb35d&acdnat=1507470249\\_653349128116e141d50eadf23b425e51](https://ac.els-cdn.com/0300908488902891/1-s2.0-0300908488902891-main.pdf?_tid=572bcf08-ac2e-11e7-bfee-00000aacb35d&acdnat=1507470249_653349128116e141d50eadf23b425e51).
- Brodere-Bondon, Florence, Thanh Huong Nguyen Ho-Boulidoires, Maria Elena Fernandez-Sanchez, and Emmanuel Farge. 2018. “Mechanotransduction in Tumor Progression: The Dark Side of the Force.” *Journal of Cell Biology* 217 (5): 1571–87. <https://doi.org/10.1083/jcb.201701039>.
- Bui, Loan, Alissa Hendricks, Jamie Wright, Cheng Jen Chuong, Digant Davé, Robert Bachoo, and Young Tae Kim. 2016. “Brain Tumor Genetic Modification Yields Increased Resistance to Paclitaxel in Physical Confinement.” *Scientific Reports* 6. Nature Publishing Group: 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep26134>.

- Bulstrode, Harry, Ewan Johnstone, Maria Angeles Marques-torrejon, Kirsty M Ferguson, Raul Bardini Bressan, Carla Blin, Vivien Grant, et al. 2017. “Elevated FOXG1 and SOX2 in Glioblastoma Enforces Neural Stem Cell Identity through Transcriptional Control of Cell Cycle and Epigenetic Regulators,” 757–73. <https://doi.org/10.1101/gad.293027.116>. Freely.
- Bulysheva, Anna A, Gary L Bowlin, Stella P Petrova, and W Andrew Yeudall. 2013. “Enhanced Chemoresistance of Squamous Carcinoma Cells Grown in 3D Cryogenic Electrospun Scaffolds.” *Biomedical Materials* 8 (5). IOP Publishing: 55009. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/8/5/055009>.
- Butt, Hans Jürgen, Brunero Cappella, and Michael Kappl. 2005. “Force Measurements with the Atomic Force Microscope: Technique, Interpretation and Applications.” *Surface Science Reports* 59 (1–6): 1–152. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2005.08.003>.
- “Cadherin Switch during EMT in Neural Crest Cells Leads to Contact Inhibition of Locomotion via Repolarization of Force.” n.d.
- Cai, Xue, and Michael E Sughrue. 2018. “Glioblastoma: New Therapeutic Strategies to Address Cellular and Genomic Complexity.” *Oncotarget* 9 (10): 9540–54. [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget).
- Charles, Nikki A., Eric C. Holland, Richard Gilbertson, Rainer Glass, and Helmut Kettenmann. 2012. “The Brain Tumor Microenvironment.” *Glia* 60 (3): 502–14. <https://doi.org/10.1002/glia.21264>.
- Chaudhuri, Ovijit, Sandeep T Koshy, Cristiana Branco, Jae-won Shin, Catia S Verbeke, Kimberly H Allison, and David J Mooney. 2014. “Phenotypes in Mammary Epithelium” 13 (October). <https://doi.org/10.1038/NMAT4009>.
- Chauvet, D., M. Imbault, L. Capelle, C. Demene, M. Mossad, C. Karachi, A. L. Boch, J. L. Gennisson, and M. Tanter. 2015. “In Vivo Measurement of Brain Tumor Elasticity Using Intraoperative Shear Wave Elastography.” *Ultraschall in Der Medizin* 37 (6): 584–90. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1399152>.
- Chen, Jian, Renée M. McKay, and Luis F. Parada. 2012. “Malignant Glioma: Lessons from Genomics, Mouse Models, and Stem Cells.” *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.009>.
- Chen, Yin Quan, Hsin Yi Lan, Yi Chang Wu, Wen Hao Yang, Arthur Chiou, and Muh Hwa Yang. 2018. “Epithelial-Mesenchymal Transition Softens Head and Neck Cancer Cells to Facilitate Migration in 3D Environments.” *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 22 (8): 3837–46. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13656>.
- Chesler, David, A., Mitchell S. Berger, and A. Quinones-Hinojosa. 2012. “The Potential Origin of Glioblastoma Initiating Cells.” *Frontiers in Bioscience* S4 (1): 190. <https://doi.org/10.2741/S261>.
- Cheung, Kevin J., and Andrew J. Ewald. 2016. “A Collective Route to Metastasis: Seeding by Tumor Cell Clusters.” *Science* 352 (6282): 167–69. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6546>.

- Cheung, Pam, and James W. Dennis. 2007. "Mgat5 and Pten Interact to Regulate Cell Growth and Polarity." *Glycobiology* 17 (7): 767–73. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm037>.
- CHEVANCE, STEPHEN E.MALAWISTA\*† AND ANNE DE BOISFLEURY. 1997. "Random Locomotion and Chemotaxis of Human Blood Polymorphonuclear Leukocytes ( PMN ) in the Presence of EDTA : PMN in Close Quarters Require Neither Leukocyte Integrins nor External Divalent Cations" 94 (October): 11577–82.
- Chistiakov, Dimitry A., and Vladimir P. Chekhonin. 2018. "Circulating Tumor Cells and Their Advances to Promote Cancer Metastasis and Relapse, with Focus on Glioblastoma Multiforme." *Experimental and Molecular Pathology*. Elsevier Inc, #pagerange#. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.07.007>.
- Cho, Daehwan, Lauren Matlock-Colangelo, Chunhui Xiang, Peter J. Asiello, Antje J. Baeumner, and Margaret W. Frey. 2011. "Electrospun Nanofibers for Microfluidic Analytical Systems." *Polymer* 52 (15): 3413–21. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.05.026>.
- Chrissa A. Dwyer1,\* , Wenya Linda Bi2, 3,\* , Mariano S. Viapiano2, 3, and Russell T. Matthews. 2009. "Brevican Knockdown Reduces Late-Stage Glioma Tumor Aggressiveness" 6 (1): 247–53. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x.Endothelial>.
- Christopher Beadle, †, ‡ Marcela C. Assanah, ‡ Pascale Monzo,§ Richard Vallee,§ Steven S. Rosenfeld, and and Peter Canoll. 2010. "The Role of Myosin II in Glioma Invasion of the Brain." *Seikagaku* 82 (4): 327–31. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>.
- Climate, B, Van Dyck, T F Phylogenies, and E P Compare. 2004. "Identification of Human Brain Tumour Initiating Cells" 432 (November). <https://doi.org/10.1038/nature03031.1>.
- Copeland, D D, F S Vogel, and D D Bigner. 1975. "The Induction of Intracranial Neoplasms by the Inoculation of Avian Sarcoma Virus in Perinatal and Adult Rats." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 34 (4): 340–58.
- Corporation, Technology. 2000. "Characterization Factor Sequence Receptor of the Human Attached Epidermal to the Atypical of Recombinant Growth The Extracellular Domain of Human EGF Receptor Been Used in Various Biophysical One Oligosac and Biochemical Preparation of the ' Peak C4 ' Fra" 127 (1): 65–72.
- Cramer, Louise P. 2010. "Forming the Cell Rear First: Breaking Cell Symmetry to Trigger Directed Cell Migration." *Nature Cell Biology* 12 (7). Nature Publishing Group: 628–32. <https://doi.org/10.1038/ncb0710-628>.
- Cuddapah, Vishnu Anand, Stefanie Robel, Stacey Watkins, and Harald Sontheimer. 2014a. "A Neurocentric Perspective on Glioma Invasion." *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn3765>.

- Cuddapah, Vishnu Anand, and Harald Sontheimer. 2010. "Molecular Interaction and Functional Regulation of CIC-3 by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) in Human Malignant Glioma." *Journal of Biological Chemistry* 285 (15): 11188–96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.097675>.
- Cukierman, E. 2001. "Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension." *Science (New York, NY)* 294 (5547): 1708–12. <https://doi.org/10.1126/science.1064829>.
- Curtis L Johnson<sup>1, 2</sup>, Hillary Schwarb<sup>1</sup>, Matthew DJ McGarry<sup>3</sup>, Aaron T Anderson<sup>1, 4</sup>, Graham R Huesmann<sup>1, 5, 6</sup>, Bradley P Sutton<sup>1, 7</sup>, and Neal J Cohen. 2015. "Viscoelasticity of Subcortical Gray Matter Structures." *Anal Chem.* 25 (4): 368–79. <https://doi.org/10.1016/j.cogdev.2010.08.003>. Personal.
- Darci T. Butcher\*, Tamara Alliston<sup>‡,§,||</sup>, and Valerie M. Weaver\*. 2009. "Forcing Tumor Progression" 9 (2): 108–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2544.A>.
- Das, Gopal D. n.d. "Autoradiographic and Histoloaical Evidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats '." "
- Dennis, James W, Ivan R Nabi, and Michael Demetriou. 2009. "Metabolism, Cell Surface Organization, and Disease." *Cell* 139 (7): 1229–41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.008>. Metabolism.
- Dhiman, Harpreet K., Alok R. Ray, and Amulya K. Panda. 2005. "Three-Dimensional Chitosan Scaffold-Based MCF-7 Cell Culture for the Determination of the Cytotoxicity of Tamoxifen." *Biomaterials* 26 (9): 979–86. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.012>.
- Dromard, C., H. Guillon, V. Rigau, C. Ripoll, J.C. Sabourin, F.E. Perrin, F. Scamps, et al. 2008. "Adult Human Spinal Cord Harbors Neural Precursor Cells That Generate Neurons and Glial Cells in Vitro." *Journal of Neuroscience Research* 86 (9). Wiley-Blackwell: 1916–26. <https://doi.org/10.1002/jnr.21646>.
- Dumic, Jerka, Sanja Dabelic, and Mirna Flögel. 2006. "Galectin-3: An Open-Ended Story." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1760 (4): 616–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.12.020>.
- Dupont, Sirio, Leonardo Morsut, Mariaceleste Aragona, Elena Enzo, Stefano Giullitti, Michelangelo Cordenonsi, Francesca Zanconato, et al. 2011. "Role of YAP / TAZ in Mechanotransduction." *Nature* 474 (7350). Nature Publishing Group: 179–83. <https://doi.org/10.1038/nature10137>.
- During, Mechanotransduction, and Osteogenic Differentiation. 2011. "J BMR Matrix Stiffness Regulation of Integrin-Mediated" 26 (45): 730–38. <https://doi.org/10.1002/jbmr.278>.
- Eder, Katalin, and Bernadette Kalman. 2014. "Molecular Heterogeneity of Glioblastoma and Its Clinical Relevance," 777–87. <https://doi.org/10.1007/s12253-014-9833-3>.
- Edwards, Lincoln A., Kevin Woolard, Myung Jin Son, Aiguo Li, Jeongwu Lee, Chibawanye Ene, Samuel A. Mantey, et al. 2011. "Effect of Brain- and Tumor-Derived Connective Tissue Growth Factor on Glioma Invasion." *Journal of the National Cancer Institute* 103 (15): 1162–78. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr224>.

- Elosegui-Artola, Alberto, Roger Oria, Yunfeng Chen, Anita Kosmalska, Carlos Pérez-González, Natalia Castro, Cheng Zhu, Xavier Trepap, and Pere Roca-Cusachs. 2016. “Mechanical Regulation of a Molecular Clutch Defines Force Transmission and Transduction in Response to Matrix Rigidity.” *Nature Cell Biology* 18 (5): 540–48. <https://doi.org/10.1038/ncb3336>.
- Erler, Janine T., and Valerie M. Weaver. 2009. “Three-Dimensional Context Regulation of Metastasis.” *Clinical and Experimental Metastasis* 26 (1): 35–49. <https://doi.org/10.1007/s10585-008-9209-8>.
- Fabisiewicz, Anna, and Ewa Grzybowska. 2017. “CTC Clusters in Cancer Progression and Metastasis.” *Medical Oncology* 34 (1). Springer US: 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12032-016-0875-0>.
- Fakirov, Stoyko. 2016. *Electrospinning: Current Status and Future Trends. Nano-Size Polymers: Preparation, Properties, Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39715-3>.
- Ferrer, Valéria Pereira, Vivaldo Moura Neto, and Rolf Mentlein. 2018. “Glioma Infiltration and Extracellular Matrix: Key Players and Modulators.” *Glia*, no. August 2017: 1–24. <https://doi.org/10.1002/glia.23309>.
- Florczyk, Stephen J., Gang Liu, Forrest M. Kievit, Allison M. Lewis, Jennifer D. Wu, and Miqin Zhang. 2012. “3D Porous Chitosan-Alginate Scaffolds: A New Matrix for Studying Prostate Cancer Cell-Lymphocyte Interactions In Vitro.” *Advanced Healthcare Materials* 1 (5). Wiley-Blackwell: 590–99. <https://doi.org/10.1002/adhm.201100054>.
- Fong, E. L. S., S.-E. Lamhamedi-Cherradi, E. Burdett, V. Ramamoorthy, A. J. Lazar, F. K. Kasper, M. C. Farach-Carson, et al. 2013. “Modeling Ewing Sarcoma Tumors in Vitro with 3D Scaffolds.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (16): 6500–6505. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221403110>.
- Ford, Jill W, and Daniel W Mcvicar. 2010. “NIH Public Access.” *Cancer* 19 (1): 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020.An>.
- Fortuna-Costa, Anneliese, Angélica M. Gomes, Eliene O. Kozłowski, Mariana P. Stelling, and Mauro S. G. Pavão. 2014. “Extracellular Galectin-3 in Tumor Progression and Metastasis.” *Frontiers in Oncology* 4 (June): 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00138>.
- Fraley, Stephanie I, Yunfeng Feng, Ranjini Krishnamurthy, Dong-Hwee Kim, Alfredo Celedon, Gregory D Longmore, and Denis Wirtz. 2010. “A Distinctive Role for Focal Adhesion Proteins in Three-Dimensional Cell Motility.” *Nature Publishing Group* 12 (6). Nature Publishing Group: 598–604. <https://doi.org/10.1038/ncb2062>.
- Franco, Santos J, Mary a Rodgers, Benjamin J Perrin, Jaewon Han, David a Bennin, David R Critchley, and Anna Huttenlocher. 2004a. “Calpain-Mediated Proteolysis of Talin Regulates Adhesion Dynamics.” *Nature Cell Biology* 6 (10): 977–83. <https://doi.org/10.1038/ncb1175>.

- Franco, Santos J, Mary A Rodgers, Benjamin J Perrin, Jaewon Han, David A Bennin, David R Critchley, and Anna Huttenlocher. 2004b. "Calpain-Mediated Proteolysis of Talin Regulates Adhesion Dynamics" 6 (10). <https://doi.org/10.1038/ncb1175>.
- Frantz, C., K. M. Stewart, and V. M. Weaver. 2010. "The Extracellular Matrix at a Glance." *Journal of Cell Science* 123 (24): 4195–4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>.
- Franz, Clemens M., Gareth E. Jones, and Anne J. Ridley. 2002. "Cell Migration in Development and Disease." *Developmental Cell* 2 (2): 153–58. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00120-X).
- Friedl, Peter, and Stephanie Alexander. 2011. "Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity." *Cell* 147 (5). Elsevier Inc.: 992–1009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.016>.
- Friedl, Peter, Stefan Borgmann, and Eva-b Bro. 2001. "Amoeboid Leukocyte Crawling through Extracellular Matrix: Lessons from the Dictyostelium Paradigm of Cell Movement" 70 (October). <https://doi.org/10.1189/jlb.70.4.491>.
- Friedl, Peter, Frank Entschladen, Christoph Conrad, Bernd Niggemann, and S Kurt. 1998. "CD4 + T Lymphocytes Migrating in Three-Dimensional Collagen Lattices Lack Focal Adhesions and Utilize I 1 Integrin-Independent Strategies for Polarization , Interaction with Collagen Fibers and Locomotion," 2331–43.
- Friedl, Peter, Joseph Locker, Erik Sahai, and Jeffrey E Segall. 2012. "Classifying Collective Cancer Cell Invasion." *Nature Cell Biology* 14 (8). Nature Publishing Group: 777–83. <https://doi.org/10.1038/ncb2548>.
- Friedl, Peter, and Katarina Wolf. 2010. "Plasticity of Cell Migration: A Multiscale Tuning Model." *Journal of Cell Biology* 188 (1): 11–19. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909003>.
- Friedlander, David R, C Allen, and J Kelly. 1996. "Migration of Brain Tumor Cells on Extracellular Matrix Proteins In Vitro Correlates with Tumor Type and Grade and Involves A, and Integrins'."
- Gangatharan, Girisaran, Sylvie Schneider-Maunoury, and Marie Anne Breaux. 2018. "Role of Mechanical Cues in Shaping Neuronal Morphology and Connectivity." *Biology of the Cell*, 125–36. <https://doi.org/10.1111/boc.201800003>.
- Garner, Omai B, and Linda G Baum. 2010. "NIH Public Access." *Pathology* 36 (Pt 6): 1472–77. <https://doi.org/10.1042/BST0361472>.Galectin.
- Garros-Regulez, Laura, Idoia Garcia, Estefania Carrasco-Garcia, Aquilino Lantero, Paula Aldaz, Leire Moreno-Cugnon, Olatz Arrizabalaga, et al. 2016a. "Targeting SOX2 as a Therapeutic Strategy in Glioblastoma." *Frontiers in Oncology* 6 (October): 1–7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00222>.

- Garzon-Muvdi, Tomas, Paula Schiapparelli, Colette ap Rhys, Hugo Guerrero-Cazares, Christopher Smith, Deok Ho Kim, Lyonell Kone, et al. 2012. "Regulation of Brain Tumor Dispersal by NKCC1 through a Novel Role in Focal Adhesion Regulation." *PLoS Biology* 10 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001320>.
- Gaub, Benjamin M., and Daniel J. Müller. 2017. "Mechanical Stimulation of Piezo1 Receptors Depends on Extracellular Matrix Proteins and Directionality of Force." *Nano Letters* 17 (3): 2064–72. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b00177>.
- Giampieri, Silvia, Cerys Manning, Steven Hooper, Louise Jones, Caroline S Hill, and Erik Sahai. 2010. "Localised and Reversible TGF  $\beta$  Signalling Switches Breast Cancer Cells from Cohesive to Single Cell Motility" 11 (11): 1287–96. <https://doi.org/10.1038/ncb1973.Localised>.
- Gkretsi, Vasiliki, and Triantafyllos Stylianopoulos. 2018. "Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis." *Frontiers in Oncology* 8 (May): 145. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00145>.
- Globus, Joseph H., and Hartwig Kuhlbeck. 1944. "The Subependymal Cell Plate (Matrix) and Its Relationship to Brain Tumors of the Ependymal Type." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 3 (1): 1–35. <https://doi.org/10.1097/00005072-194401000-00001>.
- Gloushankova, Natalya A., Svetlana N. Rubtsova, and Irina Y. Zhitnyak. 2017. "Cadherin-Mediated Cell-Cell Interactions in Normal and Cancer Cells." *Tissue Barriers*. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1356900>.
- Godugu, Chandraiah, Apurva R. Patel, Utkarsh Desai, Terrick Andey, Alexandria Sams, and Mandip Singh. 2013. "AlgiMatrix™ Based 3D Cell Culture System as an In-Vitro Tumor Model for Anticancer Studies." *PLoS ONE* 8 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053708>.
- Goetz, Jacky G. 2009. "Bidirectional Control of the Inner Dynamics of Focal Adhesions Promotes Cell Migration." *Cell Adhesion and Migration*. <https://doi.org/10.4161/cam.3.2.7295>.
- Goetz, Jacky G., Bharat Joshi, Patrick Lajoie, Scott S. Strugnell, Trevor Scudamore, Liliana D. Kojic, and Ivan R. Nabi. 2008. "Concerted Regulation of Focal Adhesion Dynamics by Galectin-3 and Tyrosine-Phosphorylated Caveolin-1." *Journal of Cell Biology* 180 (6): 1261–75. <https://doi.org/10.1083/jcb.200709019>.
- Gong, A., and S. Huang. 2012. "FoxM1 and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Glioma Stem Cells." *Cancer Research* 72 (22): 5658–62. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0953>.
- Granovsky, M, J Fata, J Pawling, W J Muller, R Khokha, and J W Dennis. 2000. "Suppression of Tumor Growth and Metastasis in Mgat5-Deficient Mice." *Nature Medicine* 6 (3): 306–12. <https://doi.org/10.1038/73163>.

- Gritsenko, Pavlo G., Olga Ilina, and Peter Friedl. 2012a. "Interstitial Guidance of Cancer Invasion." *Journal of Pathology* 226 (2): 185–99. <https://doi.org/10.1002/path.3031>.
- Gritsenko, Pavlo, William Leenders, and Peter Friedl. 2017. "Recapitulating in Vivo-like Plasticity of Glioma Cell Invasion along Blood Vessels and in Astrocyte-Rich Stroma." *Histochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1604-2>.
- Gudipaty, Swapna Aravind, and Jody Rosenblatt. 2017. "Epithelial Cell Extrusion: Pathways and Pathologies." *Seminars in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.05.010>.
- Guichet, Pierre Olivier, Ivan Bieche, Marisa Teigell, Ché Serguera, Bernard Rothhut, Valérie Rigau, Frédérique Scamps, et al. 2013. "Cell Death and Neuronal Differentiation of Glioblastoma Stem-like Cells Induced by Neurogenic Transcription Factors." *Glia* 61 (2): 225–39. <https://doi.org/10.1002/glia.22429>.
- Guo, H.-B., H. Johnson, M. Randolph, T. Nagy, R. Blalock, and M. Pierce. 2010. "Specific Posttranslational Modification Regulates Early Events in Mammary Carcinoma Formation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (49): 21116–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013405107>.
- Habela, C. W., N. J. Ernest, A. F. Swindall, and H. Sontheimer. 2008. "Chloride Accumulation Drives Volume Dynamics Underlying Cell Proliferation and Migration." *Journal of Neurophysiology*. <https://doi.org/10.1152/jn.90840.2008>.
- Haeger, Anna, Katarina Wolf, Mirjam M. Zegers, and Peter Friedl. 2015. "Collective Cell Migration: Guidance Principles and Hierarchies." *Trends in Cell Biology* 25 (9). Elsevier Ltd: 556–66. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.06.003>.
- Handorf, Andrew M., Yaxian Zhou, Matthew A. Halanski, and Wan Ju Li. 2015. "Tissue Stiffness Dictates Development, Homeostasis, and Disease Progression." *Organogenesis* 11 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1080/15476278.2015.1019687>.
- Hang, Qinglei, Tomoya Isaji, Sicong Hou, Sanghun Im, Tomohiko Fukuda, and Jianguo Gu. 2015. "Integrin  $\alpha 5$  Suppresses the Phosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor and Its Cellular Signaling of Cell Proliferation via N -Glycosylation." *Journal of Biological Chemistry* 290 (49): 29345–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.682229>.
- Harpaz, Noam, and Harry Schachter. 1980. "THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Control of Glycoprotein Synthesis BOVINE COLOSTRUM UDP-N-ACETYLGLUCOSAMINE:~D-MANNOSIDE P 2 -N - ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE I. SEPARATION FROM UDP-N-ACETYLGLUCOSAMINE:U-D" 255 (10): 485–4893.
- Hartman, Olga, Chu Zhang, Elizabeth L Adams, Mary C Farach-carson, Nicholas J Petrelli, Bruce D Chase, and John F Rabolt. 2010. "Models and Drug Screening Applications" 10 (8): 2019–32. <https://doi.org/10.1021/bm8012764>.Microfabricated.

- Hassani, Zahra, Ali Saleh, Soumaya Turpault, Salim Khiati, Willy Morelle, Jacques Vignon, Jean-Philippe Hugnot, et al. 2017. "Phostine PST3.1a Targets MGAT5 and Inhibits Glioblastoma-Initiating Cell Invasiveness and Proliferation." *Molecular Cancer Research* 15 (October): 1376–88. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0120>.
- Hayakawa, Kimihide, Hitoshi Tatsumi, and Masahiro Sokabe. 2012. "Mechano-Sensing by Actin Filaments and Focal Adhesion Proteins." *Communicative & Integrative Biology* 5 (6): 572–77. <https://doi.org/10.4161/cib.21891>.
- Hegi, Monika E., Annie-Claire Diserens, Thierry Gorlia, Marie-France Hamou, Nicolas de Tribolet, Michael Weller, Johan M. Kros, et al. 2005. "MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma." *New England Journal of Medicine* 352 (10): 997–1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>.
- Hertz, Heinrich. 1882. "Ueber Die Berührung Fester Elastischer Körper." *Journal Fur Die Reine Und Angewandte Mathematik* 1882 (92): 156–71. <https://doi.org/10.1515/crll.1882.92.156>.
- Holt, Dolly J, Lisa M Chamberlain, and David W Grainger. 2011. "NIH Public Access" 31 (36): 9382–94. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.101>.Cell-cell.
- Hopewell, J. W., and E. A. Wright. 1969. "The Importance of Implantation Site in Cerebral Carcinogenesis in Rats." *Cancer Research* 29 (11): 1927–31.
- Hottinger, Andreas F., Kalil G. Abdullah, and Roger Stupp. 2016. *GLIOBLASTOMA. Glioblastoma*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47660-7.00006-9>.
- Houtz, R.C. 1950. "“Orlon” Acrylic Fiber: Chemistry and Properties." *Textile Research Journal* 20 (11). Sage PublicationsSage CA: Thousand Oaks, CA: 786–801. <https://doi.org/10.1177/004051755002001107>.
- Hu, Xiuli, Shi Liu, Guangyuan Zhou, Yubin Huang, Zhigang Xie, and Xiabin Jing. 2014. "Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Drug Delivery Applications." *Journal of Controlled Release* 185 (1). Elsevier B.V.: 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.018>.
- Huang, Chunyue, Miaojuan Huang, Wenxia Chen, Weiliang Zhu, Hui Meng, Linlang Guo, Ting Wei, and Jian Zhang. 2015. "N-Acetylglucosaminyltransferase v Modulates Radiosensitivity and Migration of Small Cell Lung Cancer through Epithelial-Mesenchymal Transition." *FEBS Journal* 282 (22): 4295–4306. <https://doi.org/10.1111/febs.13419>.
- Huang, Xiaosong. 2009. "Fabrication and Properties of Carbon Fibers." *Materials* 2 (4): 2369–2403. <https://doi.org/10.3390/ma2042369>.

- Huang, Yen Jang, and Shan hui Hsu. 2014. “Acquisition of Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stem-like Phenotypes within Chitosan-Hyaluronan Membrane-Derived 3D Tumor Spheroids.” *Biomaterials* 35 (38). Elsevier Ltd: 10070–79. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.09.010>.
- Hubert, Sandra, and Jean-Pierre Abastado. 2014. “Les Étapes Précoces Du Processus Métastatique.” *Médecine/sciences* 30 (4). Éditions EDK, Groupe EDP Sciences: 378–84. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143004010>.
- Hung, Wei Chien, Jessica R. Yang, Christopher L. Yankaskas, Bin Sheng Wong, Pei Hsun Wu, Carlos Pardo-Pastor, Selma A. Serra, et al. 2016. “Confinement Sensing and Signal Optimization via Piezo1/PKA and Myosin II Pathways.” *Cell Reports* 15 (7). The Authors: 1430–41. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.035>.
- Hynes, Richard O. 2009. “Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils.” *Science* 326 (5957): 1216–19. <https://doi.org/10.1126/science.1176009.Extracellular>.
- Iliina, O., and P. Friedl. 2009. “Mechanisms of Collective Cell Migration at a Glance.” *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.036525>.
- International Society of Biorheology., Thomas, Jacques Ohayon, Catherine Picart, and Philippe Tracqui. 2006. An Extended Relationship for the Characterization of Young’s Modulus and Poisson’s Ratio of Tunable Polyacrylamide Gels. *Biorheology*. Vol. 43. Pergamon Press. <https://content-iospress-com.gate2.inist.fr/articles/biorheology/bir442>.
- Isaji, Tomoya, Yuya Sato, Yanyang Zhao, Eiji Miyoshi, Yoshinao Wada, Naoyuki Taniguchi, and Jianguo Gu. 2006. “N-Glycosylation of the ??-Propeller Domain of the Integrin ??5 Subunit Is Essential for ??5??1 Heterodimerization, Expression on the Cell Surface, and Its Biological Function.” *Journal of Biological Chemistry* 281 (44): 33258–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607771200>.
- Iser, Isabele C., Mariana B. Pereira, Guido Lenz, and Mireia R. Wink. 2017. “The Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Process in Glioblastoma: An Updated Systematic Review and In Silico Investigation.” *Medicinal Research Reviews* 37 (2): 271–313. <https://doi.org/10.1002/med.21408>.
- Ivkovic, S., C. Beadle, S. Noticewala, S. C. Massey, K. R. Swanson, L. N. Toro, A. R. Bresnick, P. Canoll, and S. S. Rosenfeld. 2012. “Direct Inhibition of Myosin II Effectively Blocks Glioma Invasion in the Presence of Multiple Motogens.” *Molecular Biology of the Cell* 23 (4): 533–42. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-01-0039>.
- Iwadata, Yasuo. 2016. “Epithelial-Mesenchymal Transition in Glioblastoma Progression.” *Oncology Letters* 11 (3): 1615–20. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4113>.
- Jain, Anjana, Martha Betancur, Gaurangkumar D. Patel, Chandra M. Valmikinathan, Vivek J. Mukhatyar, Ajit Vakharia, S. Balakrishna Pai, Barunashish Brahma, Tobey J. MacDonald, and Ravi V. Bellamkonda. 2014.

“Guiding Intracortical Brain Tumour Cells to an Extracortical Cytotoxic Hydrogel Using Aligned Polymeric Nanofibres.” *Nature Materials* 13 (3): 308–16. <https://doi.org/10.1038/nmat3878>.

Jain, Saloni R, and Rakesh K Jain. 2014. “Tumors during Progression : Implications for Vascular Collapse” 73 (13): 3833–41. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4521.Co-evolution>.

Jiang, Yiwen, and Lene Uhrbom. 2012. “On the Origin of Glioma.” *Upsala Journal of Medical Sciences* 117 (2): 113–21. <https://doi.org/10.3109/03009734.2012.658976>.

Jin, Shu Guang, Young Il Jeong, Shin Jung, Hyang Hwa Ryu, Yong Hao Jin, and In Young Kim. 2009. “The Effect of Hyaluronic Acid on the Invasiveness of Malignant Glioma Cells: Comparison of Invasion Potential at Hyaluronic Acid Hydrogel and Matrigel.” *Journal of Korean Neurosurgical Society* 46 (5): 472–78. <https://doi.org/10.3340/jkns.2009.46.5.472>.

Jin, Xun, Hee Young Jeon, Kyeong Min Joo, Jun Kyum Kim, Juyoun Jin, Sung Hak Kim, Bong Gu Kang, et al. 2011. “Frizzled 4 Regulates Stemness and Invasiveness of Migrating Glioma Cells Established by Serial Intracranial Transplantation.” *Cancer Research* 71 (8): 3066–75. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1495>.

Jolly, Mohit Kumar. 2015. “Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis.” *Frontiers in Oncology* 5 (July): 1–19. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00155>.

Jose I. Lopeza, Inkyung Kang<sup>†</sup>, a, Weon-Kyoo Youb, Donald M. McDonaldb, and Valerie M. Weaver. 2013. “In Situ Force Mapping of Mammary Gland Transformation.” 3 (9): 910–21. <https://doi.org/10.1039/c1ib00043h.In>.

Kahlert, U. D., G. Nikkhah, and J. Maciaczyk. 2013. “Epithelial-to-Mesenchymal(-like) Transition as a Relevant Molecular Event in Malignant Gliomas.” *Cancer Letters* 331 (2): 131–38. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.12.010>.

Kalluri, Raghu, and Robert A Weinberg. 2009. “Review Series The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition” 119 (6). <https://doi.org/10.1172/JCI39104.1420>.

Karpozilos, A., and N. Pavlidis. 2004. “The Treatment of Cancer in Greek Antiquity.” *European Journal of Cancer* 40 (14): 2033–40. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.04.036>.

Kawamura, Yoichiro, Jun Takouda, Koji Yoshimoto, and Kinichi Nakashima. 2018. “New Aspects of Glioblastoma Multiforme Revealed by Similarities between Neural and Glioblastoma Stem Cells.” *Cell Biology and Toxicology*. *Cell Biology and Toxicology*, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10565-017-9420-y>.

Kawataki, Tomoyuki, Tetsu Yamane, Hirofumi Naganuma, Patricia Rousselle, Ingegerd Andurén, Karl Tryggvason, and Manuel Patarroyo. 2007. “Laminin Isoforms and Their Integrin Receptors in Glioma Cell

- Migration and Invasiveness: Evidence for a Role of  $\alpha 5$ -Laminin(s) and  $\alpha 3\beta 1$  Integrin.” *Experimental Cell Research* 313 (18): 3819–31. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.07.038>.
- Kerstein, Patrick C., Robert H. Nichol IV, and Timothy M. Gomez. 2015. “Mechanochemical Regulation of Growth Cone Motility.” *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00244>.
- Kerstein, Patrick C, Robert H Nichol Iv, and Timothy M Gomez. 2015. “Mechanochemical Regulation of Growth Cone Motility.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9 (JULY): 244. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00244>.
- Kerstein, Patrick C, Kevin M Patel, and X Timothy M Gomez. 2017. “Calpain-Mediated Proteolysis of Talin and FAK Regulates Adhesion Dynamics Necessary for Axon Guidance” 37 (6): 1568–80. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2769-16.2016>.
- Kizuka, Yasuhiko, and Naoyuki Taniguchi. 2016. “Enzymes for N-Glycan Branching and Their Genetic and Nongenetic Regulation in Cancer.” *Biomolecules* 6 (2): 1–21. <https://doi.org/10.3390/biom6020025>.
- Kondo, Toru, Takao Setoguchi, and Tetsuya Taga. 2004. “Persistence of a Small Subpopulation of Cancer Stem-like Cells in the C6 Glioma Cell Line” 101 (3): 1–6.
- Koser, David E, Amelia J Thompson, Sarah K Foster, Asha Dwivedy, K Eva, Graham K Sheridan, Hanno Svoboda, Matheus Viana, and Luciano F Costa. 2017. “Mechanosensing Is Critical for Axon Growth in the Developing Brain” 19 (12): 1592–98. <https://doi.org/10.1038/nn.4394.Mechanosensing>.
- Krebs, Angela M, Julia Mitschke, María Lasierra Losada, Otto Schmalhofer, Melanie Boerries, Hauke Busch, Martin Boettcher, et al. 2017. “The EMT-Activator Zeb1 Is a Key Factor for Cell Plasticity and Promotes Metastasis in Pancreatic Cancer” 19 (5). <https://doi.org/10.1038/ncb3513>.
- Kubow E. Kristopher, Horwitz Alan Ric, Kristopher E. Kubow, Alan Rick Horwitz, and Horwitz Alan Ric Kubow E. Kristopher. 2011. “Reducing Background Fluorescence Reveals Adhesion in 3D Matrices.” *Nat Cell Biol* 13 (1): 3–7. <https://doi.org/10.1038/ncb0111-3.Reducing>.
- Kumar, Abhishek, Mingxing Ouyang, Koen Van den Dries, Ewan James McGhee, Keiichiro Tanaka, Marie D. Anderson, Alexander Groisman, Benjamin T. Goult, Kurt I. Anderson, and Martin A. Schwartz. 2016. “Talin Tension Sensor Reveals Novel Features of Focal Adhesion Force Transmission and Mechanosensitivity.” *Journal of Cell Biology* 213 (3): 371–83. <https://doi.org/10.1083/jcb.201510012>.
- Kurniawan, Nicholas A., Parthiv Kant Chaudhuri, and Chwee Teck Lim. 2016. “Mechanobiology of Cell Migration in the Context of Dynamic Two-Way Cell-Matrix Interactions.” *Journal of Biomechanics* 49 (8). Elsevier: 1355–68. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.12.023>.
- Lagana, Annick, Jacky G Goetz, Pam Cheung, James W Dennis, Ivan R Nabi, Annick Lagana, Jacky G Goetz, et al. 2006. “Glectin Binding to Mgat5-Modified N-Glycans Regulates Fibronectin Matrix Remodeling in

- Tumor Cells Galectin Binding to Mgat5-Modified N-Glycans Regulates Fibronectin Matrix Remodeling in Tumor Cells” 26 (8): 3181–93. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.8.3181>.
- Lajoie, Patrick, Jacky G. Goetz, James W. Dennis, and Ivan R. Nabi. 2009. “Lattices, Rafts, and Scaffolds: Domain Regulation of Receptor Signaling at the Plasma Membrane.” *Journal of Cell Biology* 185 (3): 381–85. <https://doi.org/10.1083/jcb.200811059>.
- Langhans, Sigrid A. 2018. “Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning.” *Frontiers in Pharmacology* 9 (JAN): 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>.
- Lathia, JD, and SC Mack. 2015. “Cancer Stem Cells in Glioblastoma.” *Genes & ...*, 1203–17. <https://doi.org/10.1101/gad.261982.115.tumors>.
- Lau, Ken S., and James W. Dennis. 2008. “N-Glycans in Cancer Progression.” *Glycobiology* 18 (10): 750–60. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn071>.
- Lauffenburger, Douglas A., and Alan F. Horwitz. 1996. “Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process.” *Cell* 84 (3): 359–69. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81280-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81280-5).
- Lee, Joo Ho, Jeong Eun Lee, Jee Ye Kahng, Se Hoon Kim, Jun Sung Park, Seon Jin Yoon, Ji-Yong Um, et al. 2018. “Human Glioblastoma Arises from Subventricular Zone Cells with Low-Level Driver Mutations.” *Nature*. Springer US. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0389-3>.
- Leight, J. L., M. a. Wozniak, S. Chen, M. L. Lynch, and C. S. Chen. 2012a. “Matrix Rigidity Regulates a Switch between TGF- 1-Induced Apoptosis and Epithelial-Mesenchymal Transition.” *Molecular Biology of the Cell* 23 (5): 781–91. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-06-0537>.
- Leight, J. L., M. A. Wozniak, S. Chen, M. L. Lynch, and C. S. Chen. 2012b. “Matrix Rigidity Regulates a Switch between TGF- 1-Induced Apoptosis and Epithelial-Mesenchymal Transition.” *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-06-0537>.
- Li, Wenyang, and Yibin Kang. 2017. “Probing the Fifty Shades of EMT in Metastasis” 2 (2): 65–67. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.01.001.Probing>.
- Li, Xiang, Xin Wang, Zengqi Tan, Si Chen, and Feng Guan. 2016. “Role of Glycans in Cancer Cells Undergoing Epithelial–Mesenchymal Transition.” *Frontiers in Oncology* 6 (February): 1–5. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00033>.
- Liewald, Daniel, Robert Miller, Nikos Logothetis, Hans Joachim Wagner, and Almut Schüz. 2014. “Distribution of Axon Diameters in Cortical White Matter: An Electron-Microscopic Study on Three Human Brains and a Macaque.” *Biological Cybernetics* 108 (5): 541–57. <https://doi.org/10.1007/s00422-014-0626-2>.

- Linte, Cristian A, Jon J Camp, Maryam E Rettmann, David R Holmes Iii, and A Richard. 2015. "Human Lung Cancer Cells Grown on Acellular Rat Lung Matrix Create Perfusable Tumor Nodules" 93 (4): 1–13. <https://doi.org/10.1117/12.2008529>. Image-based.
- Liu, Gentao, Xiangpeng Yuan, Zhaohui Zeng, Patrizia Tunici, Hiushan Ng, Iman R. Abdulkadir, Lizhi Lu, Dwain Irvin, Keith L. Black, and John S. Yu. 2006. "Analysis of Gene Expression and Chemoresistance of CD133+ Cancer Stem Cells in Glioblastoma." *Molecular Cancer* 5: 1–12. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-67>.
- Liu, Li-Jun, Jing Zhang, Zhi-Feng Xiao, Bin Dai, Mo-Yi Sun, Lei Chen, and Bing Chen. 2014. "Three-Dimensional Collagen Scaffold Enhances the Human Adenoid Cystic Carcinoma Cancer Stem Cell and Epithelial-Mesenchymal Transition Properties." *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 102 (4). Wiley-Blackwell: 772–80. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33058>.
- Liu, Yan Jun, Maël Le Berre, Franziska Lautenschlaeger, Paolo Maiuri, Andrew Callan-Jones, Mélina Heuzé, Tohru Takaki, Raphaël Voituriez, and Matthieu Piel. 2015. "Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells." *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.007>.
- Liu, Yuan, Bing Liu, Gu-qin Zhang, Jing-feng Zou, Meng-lin Zou, and Zhen-shun Cheng. 2018. "Calpain Inhibition Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis via Switching the Development of Epithelial-Mesenchymal Transition" 1. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*.
- Loss, Concomitant, O F Fibronectin, and Binding Actmty. 1994. "Functional Role of N-Glycosylation in a 5 P L Integrin Receptor."
- Lou, Junzhe, Ryan Stowers, Sungmin Nam, Yan Xia, and Ovijit Chaudhuri. 2018. "Stress Relaxing Hyaluronic Acid-Collagen Hydrogels Promote Cell Spreading, Fiber Remodeling, and Focal Adhesion Formation in 3D Cell Culture." *Biomaterials* 154. Elsevier Ltd: 213–22. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.004>.
- Louis, David N., Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Webster K. Cavenee, Peter C. Burger, Anne Jouvét, Bernd W. Scheithauer, and Paul Kleihues. 2007. "The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System." *Acta Neuropathologica* 114 (2): 97–109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>.
- Louis, David N., Arie Perry, Guido Reifenberger, Andreas von Deimling, Dominique Figarella-Branger, Webster K. Cavenee, Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Paul Kleihues, and David W. Ellison. 2016. "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary." *Acta Neuropathologica* 131 (6). Springer Berlin Heidelberg: 803–20. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- Lu, Jishun, Tomoya Isaji, Sanghun Im, Tomohiko Fukuda, Noritaka Hashii, Daisuke Takakura, Nana Kawasaki, and Jianguo Gu. 2014. "β-Galactoside α2,6-Sialyltransferase 1 Promotes Transforming Growth

- Factor- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition.” *Journal of Biological Chemistry* 289 (50): 34627–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.593392>.
- Lu, Jishun, Tomoya Isaji, Sanghun Im, Tomohiko Fukuda, Akihiko Kameyama, and Jianguo Gu. 2016. “Expression of N-Acetylglucosaminyltransferase III Suppresses  $\alpha$ 2,3-Sialylation, and Its Distinctive Functions in Cell Migration Are Attributed to  $\alpha$ 2,6-Sialylation Levels.” *Journal of Biological Chemistry* 291 (11): 5708–20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.712836>.
- Lu, Pengfei, Valerie M. Weaver, and Zena Werb. 2012. “The Extracellular Matrix: A Dynamic Niche in Cancer Progression.” *Journal of Cell Biology* 196 (4): 395–406. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102147>.
- Lyons, S. M., E. Alizadeh, J. Mannheimer, K. Schuamberg, J. Castle, B. Schroder, P. Turk, D. Thamm, and A. Prasad. 2016. “Changes in Cell Shape Are Correlated with Metastatic Potential in Murine and Human Osteosarcomas.” *Biology Open* 5 (3): 289–99. <https://doi.org/10.1242/bio.013409>.
- Macara, Ian G. 2004. “Par Proteins: Partners in Polarization.” *Current Biology* 14 (4): 160–62. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(04\)00078-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(04)00078-8).
- Mahesparan, Rupavathana, Tracy-Ann Read, Morten Lund-Johansen, Kai Ove Skaftnesmo, Rolf Bjerkvig, and Olav Engebraaten. 2003. “Expression of Extracellular Matrix Components in a Highly Infiltrative in Vivo Glioma Model.” *Acta Neuropathologica* 105 (1): 49–57. <https://doi.org/10.1007/s00401-002-0610-0>.
- Mahvash, Mehran, Heinz Herrmann Hugo, Homajoun Maslehaty, Hubertus Maximilian Mehdorn, and Andreas Martin Stark. 2011. “Glioblastoma Multiforme in Children: Report of 13 Cases and Review of the Literature.” *Pediatric Neurology* 45 (3): 178–80. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2011.05.004>.
- Mani, Sendurai A, Wenjun Guo, Mai-jing Liao, Elinor Ng Eaton, Alicia Y Zhou, Mary Brooks, Ferenc Reinhard, et al. 2009. “The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells” 133 (4): 704–15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>.The.
- Manini, Ivana, Federica Caponnetto, Anna Bartolini, Tamara Ius, Laura Mariuzzi, Carla Di Loreto, Antonio Paolo Beltrami, and Daniela Cesselli. 2018. “Role of Microenvironment in Glioma Invasion: What We Learned from in Vitro Models.” *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19010147>.
- Martin, Marta, Ouafa Benzina, Vivien Szabo, Attila-Gergely Vég, Olivier Lucas, Thierry Cloitre, Frédérique Scamps, and Csilla Gergely. 2013. “Morphology and Nanomechanics of Sensory Neurons Growth Cones Following Peripheral Nerve Injury.” *PLoS ONE* 8 (2): e56286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056286>.
- Martino, Fabiana, Ana R. Perestrelo, Vladimír Vinarský, Stefania Pagliari, and Giancarlo Forte. 2018. “Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function.” *Frontiers in Physiology* 9 (July): 1–21. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00824>.

- McIlvain, Grace, Hillary Schwarb, Neal J. Cohen, Eva H. Telzer, and Curtis L. Johnson. 2018. “Mechanical Properties of the in Vivo Adolescent Human Brain.” *Developmental Cognitive Neuroscience* 34 (May). Elsevier: 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2018.06.001>.
- McLendon, Roger, Allan Friedman, Darrell Bigner, Erwin G. Van Meir, Daniel J. Brat, Gena M. Mastrogiannis, Jeffrey J. Olson, et al. 2008. “Comprehensive Genomic Characterization Defines Human Glioblastoma Genes and Core Pathways.” *Nature* 455 (7216): 1061–68. <https://doi.org/10.1038/nature07385>.
- Meel, Michaël H., Sophie A. Schaper, Gertjan J. L. Kaspers, and Esther Hulleman. 2017. “Signaling Pathways and Mesenchymal Transition in Pediatric High-Grade Glioma.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 75 (5). Springer International Publishing: 871–87. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2714-7>.
- Melo, Fabiana H.M., Diego Butera, Mara Souza de Junqueira, Daniel K. Hsu, Ana Maria Moura da Silva, Fu Tong Liu, Marinilice F. Santos, and Roger Chammas. 2011. “The Promigratory Activity of the Matricellular Protein Galectin-3 Depends on the Activation of Pi-3 Kinase.” *PLoS ONE* 6 (12): 22–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029313>.
- Messica, Yonatan, Adi Laser-Azogui, Tova Volberg, Yair Elisha, Kseniia Lysakovskaia, Roland Eils, Evgeny Gladilin, Benjamin Geiger, and Roy Beck. 2017. “The Role of Vimentin in Regulating Cell Invasive Migration in Dense Cultures of Breast Carcinoma Cells.” *Nano Letters* 17 (11): 6941–48. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b03358>.
- Mikheeva, Svetlana A., Andrei M. Mikheev, Audrey Petit, Richard Beyer, Robert G. Oxford, Leila Khorasani, John Patrick Maxwell, et al. 2010. “TWIST1 Promotes Invasion through Mesenchymal Change in Human Glioblastoma.” *Molecular Cancer* 9: 1–18. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-194>.
- Mirzaei, Esmail, Jafar Ai, Somayeh Ebrahimi-Barough, Javad Verdi, Hossein Ghanbari, and Reza Faridi-Majidi. 2016. “The Differentiation of Human Endometrial Stem Cells into Neuron-Like Cells on Electrospun PAN-Derived Carbon Nanofibers with Random and Aligned Topographies.” *Molecular Neurobiology* 53 (7). Molecular Neurobiology: 4798–4808. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9410-0>.
- Mishra, Dhruva K., Jason H. Sakamoto, Michael J. Thrall, Brandi N. Baird, Shanda H. Blackmon, Mauro Ferrari, Jonathan M. Kurie, and Min P. Kim. 2012. “Human Lung Cancer Cells Grown in an Ex Vivo 3D Lung Model Produce Matrix Metalloproteinases Not Produced in 2D Culture.” *PLoS ONE* 7 (9): 3–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045308>.
- Mittal, Vivek. 2018. “Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis.” *Annual. Rev. Pathol. Mech. Dis* 13: 395–412. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117>.
- Mohammadi, Hamid, and Erik Sahai. 2018. “Mechanisms and Impact of Altered Tumour Mechanics.” *Nature Cell Biology* 20 (July). Springer US: 1. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0131-2>.

- Monzo, P., Y. K. Chong, C. Guetta-Terrier, A. Krishnasamy, S. R. Sathe, E. K. F. Yim, W. H. Ng, et al. 2016. “Mechanical Confinement Triggers Glioma Linear Migration Dependent on Formin FHOD3.” *Molecular Biology of the Cell* 27 (8): 1246–61. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-08-0565>.
- Monzo, Pascale, Yuk Kien Chong, Charlotte Guetta-Terrier, Anitha Krishnasamy, Sharvari R Sathe, Evelyn K F Yim, Wai Hoe Ng, et al. 2016. “Mechanical Confinement Triggers Glioma Linear Migration Dependent on Formin FHOD3.” *Molecular Biology of the Cell* 27 (8): 1246–61. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-08-0565>.
- Morelli, Sabrina, Antonella Piscioneri, Simona Salerno, Franco Tasselli, Anna Di Vito, Giuseppina Giusi, Marcello Canonaco, Enrico Drioli, and Loredana De Bartolo. 2012. “PAN Hollow Fiber Membranes Elicit Functional Hippocampal Neuronal Network.” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23 (1): 149–56. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4484-3>.
- Muldoon, Matthew F, Christopher M Ryan, Jeffrey K Yao, Sarah M Conklin, Stephen B Manuck, and Old Engineering Hall. 2016. “Magnetic Resonance Elastography Analysis of Glioma Stiffness and IDH1 Mutation Status” 179 (11 0): 95–105. <https://doi.org/10.7205/MILMED-D-14-00168.Long-chain>.
- Murphy, Matthew C., John Huston, Clifford R. Jack, Kevin J. Glaser, Matthew L. Senjem, Jun Chen, Armando Manduca, Joel P. Felmlee, and Richard L. Ehman. 2013. “Measuring the Characteristic Topography of Brain Stiffness with Magnetic Resonance Elastography.” *PLoS ONE* 8 (12): 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081668>.
- Nabi, I. R., J. Shankar, and J. W. Dennis. 2015. “The Galectin Lattice at a Glance.” *Journal of Cell Science* 128 (13): 2213–19. <https://doi.org/10.1242/jcs.151159>.
- Nagae, Masamichi, Suyong Re, Emiko Mihara, Terukazu Nogi, Yuji Sugita, and Junichi Takagi. 2012. “Crystal Structure of  $\alpha 5\beta 1$  Integrin Ectodomain: Atomic Details of the Fibronectin Receptor.” *Journal of Cell Biology* 197 (1): 131–40. <https://doi.org/10.1083/jcb.201111077>.
- Nakada, Mitsutoshi, Yasunori Okada, and Junkoh Yamashita. 2003. “The Role of Matrix Metalloproteinases in Glioma Invasion.” *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 8: e261–69. <https://doi.org/10.2741/1016>.
- Nakano, Ichiro. 2015. “Stem Cell Signature in Glioblastoma: Therapeutic Development for a Moving Target.” *Journal of Neurosurgery* 122 (2): 324–30. <https://doi.org/10.3171/2014.9.JNS132253>.
- Nam, Sungmin, Kenneth H. Hu, Manish J. Butte, and Ovijit Chaudhuri. 2016. “Strain-Enhanced Stress Relaxation Impacts Nonlinear Elasticity in Collagen Gels.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (20): 5492–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523906113>.
- Nataraj, S. K., K. S. Yang, and T. M. Aminabhavi. 2012. “Polyacrylonitrile-Based Nanofibers - A State-of-the-Art Review.” *Progress in Polymer Science (Oxford)* 37 (3). Elsevier Ltd: 487–513. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.07.001>.

- Naumann, Ulrike, Patrick N Harter, Jennifer Rubel, Elena Ilina, Anna-eva Blank, and Michel Mittelbronn. 2013. "GLIOMA CELL MIGRATION AND INVASION AS POTENTIAL TARGET FOR NOVEL TREATMENT" 4 (3): 314–29. <https://doi.org/10.2478/s13380-013-0126-1>.
- Nayal, Anjana, Donna J. Webb, and Alan F. Horwitz. 2004. "Talin: An Emerging Focal Point of Adhesion Dynamics." *Current Opinion in Cell Biology* 16 (1): 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.11.007>.
- Nelson, Mark Tyler, Aaron Short, Sara L. Cole, Amy C. Gross, Jessica Winter, Tim D. Eubank, and John J. Lannutti. 2014. "Preferential, Enhanced Breast Cancer Cell Migration on Biomimetic Electrospun Nanofiber 'Cell Highways.'" *BMC Cancer* 14 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-825>.
- Nevo, Ido, Kevin Woolard, Maggie Cam, Aiguo Li, Joshua D. Webster, Yuri Kotliarov, Hong Sug Kim, et al. 2014. "Identification of Molecular Pathways Facilitating Glioma Cell Invasion in Situ." *PLoS ONE* 9 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111783>.
- Noh, Myung-giun, Se-jeong Oh, Eun-jung Ahn, Yeong-jin Kim, Tae-young Jung, Shin Jung, Kyung-keun Kim, Jae-hyuk Lee, Kyung-hwa Lee, and Kyung-sub Moon. 2017. "Prognostic Significance of E-Cadherin and N-Cadherin Expression in Gliomas." *BMC Cancer*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3591-z>.
- Northey, Jason J., Laralynne Przybyla, and Valerie M. Weaver. 2017. "Tissue Force Programs Cell Fate and Tumor Aggression." *Cancer Discovery* 7 (11): 1224–37. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0733>.
- Nouri, R, A Bahlaoui, M Sammouda, and S Belhouideg. 2017. "Comportement Mecanique D'Un Composite Verre Epoxy Utilises Dans Les Pales Eoliennes : Comparaison De Modeles Theoriques." *13ème Congrès de Mécanique 2017*: 13–15.
- Nourse, Jamison L, and Medha M Pathak. 2017. "Title: How Cells Channel Their Stress: Interplay Between Piezo1 and the Cytoskeleton How Cells Channel Their Stress: Interplay Between Piezo1 and the Cytoskeleton." *Cell & Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.06.018>.
- Ohgaki, Hiroko, and Paul Kleihues. 2005. "Epidemiology and Etiology of Gliomas." *Acta Neuropathologica* 109 (1): 93–108. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-0991-y>.
- Osswald, Matthias, Erik Jung, Felix Sahm, Gergely Solecki, Varun Venkataramani, Jonas Blaes, Sophie Weil, et al. 2015a. "Brain Tumour Cells Interconnect to a Functional and Resistant Network." *Nature* 528 (7580). Nature Publishing Group: 93–98. <https://doi.org/10.1038/nature16071>.
- Ostrom, Quinn T., Luc Bauchet, Faith G. Davis, Isabelle Deltour, James L. Fisher, Chelsea Eastman Langer, Melike Pekmezci, et al. 2014. "The Epidemiology of Glioma in Adults: A State of the Science Review." *Neuro-Oncology* 16 (7): 896–913. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>.

- Overstreet, Michael G, Alison Gaylo, Bastian Angermann, Angela Hughson, Kris Lambert, Mridu Acharya, Alison C Billroth-maclurg, et al. 2014. "HHS Public Access" 14 (9): 949–58. <https://doi.org/10.1038/ni.2682>. Inflammation-induced.
- Padhiar, Arshad Ahmed, Jianhui Fan, Ying Tang, Juanhan Yu, Shujing Wang, Linhua Liu, Bachir Niang, et al. 2015. "Upregulated  $\beta$ 1-6 Branch N-Glycan Marks Early Gliomagenesis but Exhibited Biphasic Expression in the Progression of Astrocytic Glioma" 5 (3): 1101–16.
- Pala, Andrej, Georg Karpel-Massler, Christian Rainer, and Marc- Eric. 2013. "Epithelial to Mesenchymal Transition and Progression of Glioblastoma." *Clinical Management and Evolving Novel Therapeutic Strategies for Patients with Brain Tumors*. <https://doi.org/10.5772/53183>.
- Paluch, Ewa K., Irene M. Aspalter, and Michael Sixt. 2016a. "Focal Adhesion–Independent Cell Migration." *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125341>.
- Paluch, Ewa K, Irene M Aspalter, and Michael Sixt. 2016b. "Focal Adhesion–Independent Cell Migration." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 32 (July): 469–90. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125341>.
- Paňková, K., D. Rösel, M. Novotný, and Jan Brábek. 2010a. "The Molecular Mechanisms of Transition between Mesenchymal and Amoeboid Invasiveness in Tumor Cells." *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0132-1>.
- Paoli, Paolo, Elisa Giannoni, and Paola Chiarugi. 2013. "Anoikis Molecular Pathways and Its Role in Cancer Progression." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1833 (12). Elsevier B.V.: 3481–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.026>.
- Papageorgis, Panagiotis, and Triantafyllos Stylianopoulos. 2015. "Role of TGF $\beta$  in Regulation of the Tumor Microenvironment and Drug Delivery (Review)." *International Journal of Oncology* 46 (3): 933–43. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2816>.
- Partridge, E A. 2004. "Regulation of Cytokine Receptors by Golgi N-Glycan Processing and Endocytosis." *Science* 306 (5693): 120–24. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1102109%0Apapers3://publication/doi/10.1126/science.1102109>.
- Pascalis, Chiara De, and Sandrine Etienne-Manneville. 2017. "Single and Collective Cell Migration: The Mechanics of Adhesions." *Molecular Biology of the Cell* 28 (14): 1833–46. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-03-0134>.
- Paszek, Matthew J, Christopher C Dufort, Olivier Rossier, Russell Bainer, Janna K Mouw, Kamil Godula, Jason E Hudak, et al. 2015. "The Cancer Glycocalyx Mechanically Primes Integrin-Mediated Growth and Survival" 511 (7509): 319–25. <https://doi.org/10.1038/nature13535>.The.

- Patel, Anoop P, Itay Tirosh, John J Trombetta, Alex K Shalek, M Shawn, Hiroaki Wakimoto, Daniel P Cahill, et al. 2014. “NIH Public Access.” *Science* 344 (6190): 1396–1401. <https://doi.org/10.1126/science.1254257>.Single-cell.
- Patnaik, Santosh Kumar, Barry Potvin, Susanne Carlsson, David Sturm, Hakon Leffler, and Pamela Stanley. 2018. “Complex N -Glycans Are the Major Ligands for Galectin-1 , -3 , and -8 on Chinese Hamster Ovary Cells” 16 (4): 305–17. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj063>.
- Paul, Colin D., Panagiotis Mistriotis, and Konstantinos Konstantopoulos. 2017. “Cancer Cell Motility: Lessons from Migration in Confined Spaces.” *Nature Reviews Cancer* 17 (2): 131–40. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.123>.
- Paul, Indranil, Seemana Bhattacharya, Anirban Chatterjee, and Mrinal K. Ghosh. 2013. “Current Understanding on EGFR and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Glioma and Their Possible Crosstalk.” *Genes and Cancer* 4 (11–12): 427–46. <https://doi.org/10.1177/1947601913503341>.
- Petrie, Ryan J, Andrew D Doyle, and Kenneth M Yamada. 2010. “Random versus Directionally Persistent Cell Migration.” *Molecular Cell* 10 (8): 538–49. <https://doi.org/10.1038/nrm2729>.Random.
- Pinho, Salomé S., and Celso A. Reis. 2015. “Glycosylation in Cancer: Mechanisms and Clinical Implications.” *Nature Reviews Cancer* 15 (9). Nature Publishing Group: 540–55. <https://doi.org/10.1038/nrc3982>.
- Pinho, Salomé S., Raquel Seruca, Fátima Gärtner, Yoshiki Yamaguchi, Jianguo Gu, Naoyuki Taniguchi, and Celso A. Reis. 2011. “Modulation of E-Cadherin Function and Dysfunction by N-Glycosylation.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 68 (6): 1011–20. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0595-0>.
- Pogoda, Katarzyna, Likang Chin, Penelope C. Georges, Fitzroy J. Byfield, Robert Bucki, Richard Kim, Michael Weaver, Rebecca G. Wells, Cezary Marcinkiewicz, and Paul A. Janmey. 2014a. “Compression Stiffening of Brain and Its Effect on Mechanosensing by Glioma Cells.” *New Journal of Physics* 16. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/16/7/075002>.
- Pollard, Thomas D., and Gary G. Borisy. 2003. “Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments.” *Cell* 112 (4): 453–65. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00120-X).
- Portillo, Francisco. 2014. “Zeb1 and Snail1 Engage miR-200f Transcriptional and Epigenetic Regulation during EMT.” <https://doi.org/10.1002/ijc.29177>.
- Provenzano, Paolo P., David R. Inman, Kevin W. Eliceiri, Steven M. Trier, and Patricia J. Keely. 2008. “Contact Guidance Mediated Three-Dimensional Cell Migration Is Regulated by Rho/ROCK-Dependent Matrix Reorganization.” *Biophysical Journal* 95 (11): 5374–84. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.133116>.

- Przybyla, Laralynne, Jonathon M. Muncie, and Valerie M. Weaver. 2016. "Mechanical Control of Epithelial-to-Mesenchymal Transitions in Development and Cancer." *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125150>.
- Purchios, A F, Jonathan A Coopert, Amy M Brunners, Mario N Lioubins, Larry E Gentryll, Kristina S Kovacina, Richard A Roth, and Hans Marquardt. 1988. "Identification of Mannose 6-Phosphate in Two Asparagine-Linked Sugar Chains of Recombinant Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Precursor\*" 263 (28): 14211–15.
- Qinglei Hang, A, A Tomoya Isaji, A Sicong Hou, A Yuqin Wang, a, b Tomohiko Fukuda, and Jianguo Gua. 2017. "A Key Regulator of Cell Adhesion: Identification and Characterization of Important N-Glycosylation Sites on Integrin  $\alpha$ 5 for Cell Migration" 37 (9): 1–14.
- Radmacher, M, M Fritz, C M Kacher, J P Cleveland, and P K Hansma. 1996. "Measuring the Viscoelastic Properties of Human Platelets with the Atomic Force Microscope." *Biophysical Journal* 70 (1): 556–67. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79602-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79602-9).
- Rao, Jasti S. 2003. "Molecular Mechanisms of Glioma Invasiveness: The Role of Proteases." *Nature Reviews Cancer* 3 (7): 489–501. <https://doi.org/10.1038/nrc1121>.
- Reig, G., E. Pulgar, and M. L. Concha. 2014. "Cell Migration: From Tissue Culture to Embryos." *Development* 141 (10): 1999–2013. <https://doi.org/10.1242/dev.101451>.
- Rhim, Andrew D, Emily T Mirek, Nicole M Aiello, Anirban Maitra, M Jennifer, Florencia McCallister, Maximilian Reichert, et al. 2013. "EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation" 148: 349–61. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.025.EMT>.
- Rich, Jeremy N. 2007. "Cancer Stem Cells in Radiation Resistance." *Cancer Research* 67 (19): 8980–84. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0895>.
- Saha, Sharmistha, Xinrui Duan, Laying Wu, Pang-Kuo Lo, Hexin Chen, and Qian Wang. 2012. "Electrospun Fibrous Scaffolds Promote Breast Cancer Cell Alignment and Epithelial–Mesenchymal Transition." *Langmuir* 28 (4). American Chemical Society: 2028–34. <https://doi.org/10.1021/la203846w>.
- Saldova, Radka, Akram Asadi Shehni, Vilde D Haakensen, Israel Steinfeld, Mark Hilliard, Ilona Kifer, Åslaug Helland, Zohar Yakhini, and Pauline M Rudd. 2014. "Association of N - Glycosylation with Breast Carcinoma and Systemic Features Using High-Resolution Quantitative UPLC." <https://doi.org/10.1021/pr401092y>.
- Samuel, Michael S., Jose I. Lopez, Ewan J. McGhee, Daniel R. Croft, David Strachan, Paul Timpson, June Munro, et al. 2011. "Actomyosin-Mediated Cellular Tension Drives Increased Tissue Stiffness and  $\beta$ -Catenin Activation to Induce Epidermal Hyperplasia and Tumor Growth." *Cancer Cell* 19 (6): 776–91. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.05.008>.

- Sanai, Nader, Arturo Alvarez-buylla, and Mitchel S Berger. 2005. "Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas," 811–22.
- Sanai, Nader, Arturo Alvarez-Buylla, and Mitchel S. Berger. 2005. "Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas." *New England Journal of Medicine* 353 (8): 811–22. <https://doi.org/10.1056/NEJMra043666>.
- Sandberg, Cecilie Jonsgar, Gabriel Altschuler, Jieun Jeong, Kirsten Kierulf Strømme, Biljana Stangeland, Wayne Murrell, Unn Hilde Grasmø-Wendler, et al. 2013. "Comparison of Glioma Stem Cells to Neural Stem Cells from the Adult Human Brain Identifies Dysregulated Wnt- Signaling and a Fingerprint Associated with Clinical Outcome." *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.06.004>.
- Sarveswaran, K., V. Kurz, Z. Dong, T. Tanaka, S. Penny, and G. Timp. 2016. "Synthetic Capillaries to Control Microscopic Blood Flow." *Scientific Reports* 6 (September 2015). Nature Publishing Group: 1–18. <https://doi.org/10.1038/srep21885>.
- Saxena, Mayur, Rishita Chaugde, James Hone, Haguy Wolfenson, and Michael P. Sheetz. 2017. "Force-Induced Calpain Cleavage of Talin Is Critical for Growth, Adhesion Development, and Rigidity Sensing." *Nano Letters* 17 (12): 7242–51. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b02476>.
- Saxena, Neha, Pankaj Mogha, Silalipi Dash, Abhijit Majumder, Sameer Jadhav, and Shamik Sen. 2018. "Matrix Elasticity Regulates Mesenchymal Stem Cell Chemotaxis." *Journal of Cell Science*, jcs.211391. <https://doi.org/10.1242/jcs.211391>.
- Schachter, H. 1986. "Biosynthetic Controls That Determine the Branching and Microheterogeneity of Protein-Bound Oligosaccharides." *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*. <https://doi.org/10.1139/o86-026>.
- Scherer, H. J. 1938. "Structural Development in Gliomas." *American Journal of Cancer* 34 (3): 333–51. <https://doi.org/10.1158/ajc.1938.333>.
- Scherer, H. 1940. "A Critical Review: The Pathology of Cerebral Gliomas." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 3 (2): 147–77. <https://doi.org/10.1136/jnnp.3.2.147>.
- Scheurer, Michael E., E. Susan Amirian, Stacy L. Davlin, Terri Rice, Margaret Wrensch, and Melissa L. Bondy. 2011. "Effects of Antihistamine and Anti-Inflammatory Medication Use on Risk of Specific Glioma Histologies." *International Journal of Cancer* 129 (9): 2290–96. <https://doi.org/10.1002/ijc.25883>.
- Schwechheimer, Karl, Lepu Zhou, and Walter Birchmeier. 1998. "E-Cadherin in Human Brain Tumours: Loss of Immunoreactivity in Malignant Meningiomas." *Virchows Archiv* 432 (2): 163–67. <https://doi.org/10.1007/s004280050151>.

- Senner, Volker, Sabine Ratzinger, Sonja Mertsch, Susanne Grässel, and Werner Paulus. 2008. "Collagen XVI Expression Is Upregulated in Glioblastomas and Promotes Tumor Cell Adhesion." *FEBS Letters* 582 (23–24): 3293–3300. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.09.017>.
- Sergey V. Plotnikov<sup>1</sup>, Ana M. Pasapera<sup>1</sup>, Benedikt Sabass<sup>2</sup>, and Clare M. Waterman. 2013. "Force Fluctuations within Focal Adhesions Mediate ECM-Rigidity Sensing to Guide Directed Cell Migration" 151 (7). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.034>.Force.
- Serres, E., F. Debarbieux, F. Stanchi, L. Maggiorella, D. Grall, L. Turchi, F. Burel-Vandenbos, et al. 2014. "Fibronectin Expression in Glioblastomas Promotes Cell Cohesion, Collective Invasion of Basement Membrane in Vitro and Orthotopic Tumor Growth in Mice." *British Dental Journal* 217 (1). Nature Publishing Group: 3451–62. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.305>.
- Sethi, Manveen K., Morten Thaysen-Andersen, Joshua T. Smith, Mark S. Baker, Nicolle H. Packer, William S. Hancock, and Susan Fanayan. 2014. "Comparative N-Glycan Profiling of Colorectal Cancer Cell Lines Reveals Unique Bisecting GlcNAc and ??-2,3-Linked Sialic Acid Determinants Are Associated with Membrane Proteins of the More Metastatic/aggressive Cell Lines." *Journal of Proteome Research* 13 (1): 277–88. <https://doi.org/10.1021/pr400861m>.
- Shibue, Tsukasa, and Robert A Weinberg. 2018. "EMT, CSCs, and Drug Resistance: The Mechanistic Link and Clinical Implications" 14 (10): 611–29. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>.EMT.
- Shimizu, Akio, Hironao Nakayama, Priscilla Wang, Courtney König, Tomoshige Akino, Johanna Sandlund, Silvia Coma, et al. 2013. "Netrin-1 Promotes Glioblastoma Cell Invasiveness and Angiogenesis by Multiple Pathways Including Activation of RhoA , Cathepsin B , and cAMP-Response Element-Binding" 288 (4): 2210–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.397398>.
- Shologu, Naledi, Eva Szegezdi, Aoife Lowery, Michael Kerin, Abhay Pandit, and Dimitrios I. Zeugolis. 2016. "Recreating Complex Pathophysiologies in Vitro with Extracellular Matrix Surrogates for Anticancer Therapeutics Screening." *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.06.001>.
- Siebzehrubl, Florian A., Daniel J. Silver, Bugra Tugertimur, Loic P. Deleyrolle, Dorit Siebzehrubl, Matthew R. Sarkisian, Kelly G. Devers, et al. 2013a. "The ZEB1 Pathway Links Glioblastoma Initiation, Invasion and Chemoresistance." *EMBO Molecular Medicine* 5 (8): 1196–1212. <https://doi.org/10.1002/emmm.201302827>.
- Siebzehrubl, Florian A, Daniel J Silver, Bugra Tugertimur, Loic P Deleyrolle, Dorit Siebzehrubl, Matthew R Sarkisian, Kelly G Devers, et al. 2013b. "The ZEB1 Pathway Links Glioblastoma Initiation , Invasion and Chemoresistance," 1196–1212. <https://doi.org/10.1002/emmm.201302827>.

- Singh, Ankur, Ilana Brito, and Jan Lammerding. 2018. "Beyond Tissue Stiffness and Bioadhesivity: Advanced Biomaterials to Model Tumor Microenvironments and Drug Resistance." *Trends in Cancer* 4 (4). Elsevier Inc.: 281–91. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.01.008>.
- Smalley, Keiran S.M., Patricia Brafford, Nikolas K. Haass, Johanna M. Brandner, Eric Brown, and Meenhard Herlyn. 2005. "Up-Regulated Expression of Zonula Occludens Protein-1 in Human Melanoma Associates with N-Cadherin and Contributes to Invasion and Adhesion." *American Journal of Pathology* 166 (5): 1541–54. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62370-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62370-X).
- Sneddon, Ian N. 1965. "The Relation between Load and Penetration in the Axisymmetric Boussinesq Problem for a Punch of Arbitrary Profile." *International Journal of Engineering Science* 3 (1): 47–57. [https://doi.org/10.1016/0020-7225\(65\)90019-4](https://doi.org/10.1016/0020-7225(65)90019-4).
- Son, Duc, N T Le, Nicola Pannacciulli, Kewei Chen, Arline D Salbe, James O Hill, R Rena, Eric M Reiman, and Jonathan Krakoff. 2007. "NIH Public Access" 86 (3): 573–79. <https://doi.org/10.1109/TMI.2012.2196707.Separate>.
- Sontheime, Vedrana Montana and Harald. 2009. "Bradykinin Promotes the Chemo-Tactic Invasion of Primary Brain Tumors" 6 (13): 247–53. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x.Endothelial>.
- Spadaro, Domenica, Shimin Le, Thierry Laroche, Isabelle Mean, Lionel Jond, Jie Yan, and Sandra Citi. 2017. "Tension-Dependent Stretching Activates ZO-1 to Control the Junctional Localization of Its Interactors." *Current Biology* 27 (24). Elsevier Ltd.: 3783–3795.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.014>.
- Speranza, Maria Carmela, Michal O. Nowicki, Prajna Behera, Choi Fong Cho, E. Antonio Chiocca, and Sean E. Lawler. 2016. "BKM-120 (Buparlisib): A Phosphatidylinositol-3 Kinase Inhibitor with Anti-Invasive Properties in Glioblastoma." *Scientific Reports* 6 (December 2015): 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep20189>.
- Stiles, Charles D., and David H. Rowitch. 2008. "Glioma Stem Cells: A Midterm Exam." *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.031>.
- Stoyanov, George S., Deyan Dzhenev, Peter Ghenev, Bogomil Iliev, Yavor Enchev, and Anton B. Tonchev. 2018. "Cell Biology of Glioblastoma Multiforme: From Basic Science to Diagnosis and Treatment." *Medical Oncology* 35 (3). Springer US: 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12032-018-1083-x>.
- Stupp, Roger, Warren P. Mason, Martin J. van den Bent, Michael Weller, Barbara Fisher, Martin J.B. Taphoorn, Karl Belanger, et al. 2005. "Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma." *New England Journal of Medicine* 352 (10): 987–96. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>.
- Sun, Zhiqi, Hui-yuan Tseng, Steven Tan, Fabrice Senger, Laetitia Kurzawa, Naoko Mizuno, Anita A Wasik, Manuel Thery, Alexander R Dunn, and Reinhard Fässler. 2018. "Kank2 Activates Talin, Reduces Force Transduction across Integrins and Induces Central Adhesion Formation." 18 (9): 941–53. <https://doi.org/10.1038/ncb3402.Kank2>.

- Sundaray, Bibekananda, V. Subramanian, T. S. Natarajan, Rong-Zheng Xiang, Chia-Cheng Chang, and Wun-Shain Fann. 2004. "Electrospinning of Continuous Aligned Polymer Fibers." *Applied Physics Letters* 84 (7): 1222–24. <https://doi.org/10.1063/1.1647685>.
- Svaldo Lanero, Tiziana, Ornella Cavalleri, Silke Krol, Ranieri Rolandi, and Alessandra Gliozzi. 2006. "Mechanical Properties of Single Living Cells Encapsulated in Polyelectrolyte Matrixes." *Journal of Biotechnology* 124 (4): 723–31. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.02.016>.
- Swaminathan, V., R. S. Fischer, and C. M. Waterman. 2016. "The FAK-Arp2/3 Interaction Promotes Leading Edge Advance and Haptosensing by Coupling Nascent Adhesions to Lamellipodia Actin." *Molecular Biology of the Cell* 27 (7): 1085–1100. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-08-0590>.
- Takahashi, Motoko, Yasuhiko Kizuka, Kazuaki Ohtsubo, Jianguo Gu, and Naoyuki Taniguchi. 2016a. "Disease-Associated Glycans on Cell Surface Proteins." *Molecular Aspects of Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.04.008>.
- Taniguchi, Naoyuki, and Yasuhiko Kizuka. 2015a. "Glycans and Cancer: Role of N-Glycans in Cancer Biomarker, Progression and Metastasis, and Therapeutics." *Advances in Cancer Research*. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2014.11.001>.
- Tee, Shang You, Jianping Fu, Christopher S. Chen, and Paul A. Janmey. 2011. "Cell Shape and Substrate Rigidity Both Regulate Cell Stiffness." *Biophysical Journal* 100 (5). Biophysical Society: L25–27. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.12.3744>.
- Terao, Mika, Akiko Ishikawa, Susumu Nakahara, Akihiro Kimura, Arisa Kato, Kenta Moriwaki, Yoshihiro Kamada, et al. 2011. "Enhanced Epithelial-Mesenchymal Transition-like Phenotype in N-Acetylglucosaminyltransferase V Transgenic Mouse Skin Promotes Wound Healing." *Journal of Biological Chemistry* 286 (32): 28303–11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.220376>.
- Thiery, Jean Paul, Hervé Acloque, Ruby Y.J. Huang, and M. Angela Nieto. 2009. "Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease." *Cell* 139 (5): 871–90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>.
- Thorne, Robert G, and Charles Nicholson. 2006. "In Vivo Diffusion Analysis with Quantum Dots and Dextran Predicts the Width of Brain Extracellular Space." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (14): 5567–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509425103>.
- Tim, Lämmermann, Bernhard L Bader, Susan J Monkley, Tim Worbs, Roland Wedlich-so, Karin Hirsch, et al. 2008. "Rapid Leukocyte Migration by Integrin- Independent Flowing and Squeezing" 453 (May). <https://doi.org/10.1038/nature06887>.
- Tomakidi, Pascal, Simon Schulz, Susanne Proksch, Wilfried Weber, and Thorsten Steinberg. 2014. "Focal Adhesion Kinase (FAK) Perspectives in Mechanobiology: Implications for Cell Behaviour." *Cell and Tissue Research* 357 (3): 515–26. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1945-2>.

- Torre, Lindsey A., Freddie Bray, Rebecca L. Siegel, Jacques Ferlay, Joannie Lortet-tieulent, and Ahmedin Jemal. 2015. "Global Cancer Statistics, 2012." *CA: A Cancer Journal of Clinicians*. 65 (2): 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- Turner, Scott G., Thomas Gergel, Hueizhi Wu, Michel Lacroix, and Steven A. Toms. 2014. "The Effect of Field Strength on Glioblastoma Multiforme Response in Patients Treated with the NovoTTF-100A System." *World Journal of Surgical Oncology* 12 (1): 1–5. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-12-162>.
- Ulrich, Theresa A., Elena M. De Juan Pardo, and Sanjay Kumar. 2009a. "The Mechanical Rigidity of the Extracellular Matrix Regulates the Structure, Motility, and Proliferation of Glioma Cells." *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4859>.
- Umesh, Vaibhavi, Andrew D. Rape, Theresa A. Ulrich, and Sanjay Kumar. 2014a. "Microenvironmental Stiffness Enhances Glioma Cell Proliferation by Stimulating Epidermal Growth Factor Receptor Signaling." *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101771>.
- Urbanska, Kaja, Justyna Sokolowska, Maciej Szmidt, and Pawel Sysa. 2014. "Glioblastoma Multiforme - An Overview." *Wspolczesna Onkologia* 18 (5): 307–12. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.40559>.
- Vakili, A, Z. Yue, and Y. Fei. 2008. "Low Cost Carbon Fiber Technology Development for Carbon Fiber Composite Applications." *Usdot*, no. 11.
- Vasconcelos-dos-santos, Andréia, Isadora A Oliveira, Miguel Clodomiro Lucena, and Adriane Regina Todeschini. 2015. "Biosynthetic Machinery Involved in Aberrant Glycosylation: Promising Targets for Developing of Drugs against Cancer" 5 (June): 1–23. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00138>.
- Vehlow, Anne, and Nils Cordes. 2013. "Invasion as Target for Therapy of Glioblastoma Multiforme." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1836 (2). Elsevier B.V.: 236–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.07.001>.
- Velpula, Kiran Kumar, Venkata Ramesh Dasari, Andrew J. Tsung, Dzung H. Dinh, and Jasti S. Rao. 2011a. "Cord Blood Stem Cells Revert Glioma Stem Cell EMT by down Regulating Transcriptional Activation of Sox2 and Twist1." *Oncotarget* 2 (12): 1028–42. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.367>.
- Vicente-Manzanares, M. 2005. "Cell Migration at a Glance." *Journal of Cell Science* 118 (21): 4917–19. <https://doi.org/10.1242/jcs.02662>.
- Vicente-Manzanares, M., X. Ma, R.S. Adelstein, and a.R. Horwitz. 2009. "Non-Muscle Myosin II Takes Centre Stage in Cell Adhesion and Migration." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (11): 778–790. <https://doi.org/10.1038/nrm2786.Non-muscle>.
- Vinckier, a, and G Semenza. 1998. "Measuring Elasticity of Biological Materials by Atomic Force Microscopy. [Review] [62 Refs]." *FEBS Letters*. 430 (1–2): 12–16.

- Voutouri, Chrysovalantis, Fotios Mpekris, Panagiotis Papageorgis, Andreani D. Odysseos, and Triantafyllos Stylianopoulos. 2014. "Role of Constitutive Behavior and Tumor-Host Mechanical Interactions in the State of Stress and Growth of Solid Tumors." *PLoS ONE* 9 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104717>.
- Wade, Anna, Aaron E. Robinson, Jane R. Engler, Claudia Petritsch, C. David James, and Joanna J. Phillips. 2013. "Proteoglycans and Their Roles in Brain Cancer." *FEBS Journal* 280 (10): 2399–2417. <https://doi.org/10.1111/febs.12109>.
- Wang, Qin, Xu Li, Yu Zhu, and Ping Yang. 2014. "MicroRNA-16 Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition-Related Gene Expression in Human Glioma." *Molecular Medicine Reports* 10 (6): 3310–14. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2583>.
- Warburg, Otto. 1956. "Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells" 123 (3191).
- Watanabe, Takashi, Jun Noritake, and Kozo Kaibuchi. 2005. "Regulation of Microtubules in Cell Migration." *Trends in Cell Biology* 15 (2): 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.12.006>.
- Watkins, Stacey, and Harald Sontheimer. 2012. "Hydrodynamic Cellular Volume Changes Enable Glioma Cell Invasion." 31 (47): 17250–59. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3938-11.2011.Hydrodynamic>.
- Webb, Donna J., Karen Donais, Leanna A. Whitmore, Sheila M. Thomas, Christopher E. Turner, J. Thomas Parsons, and Alan F. Horwitz. 2004. "FAK-Src Signalling through Paxillin, ERK and MLCK Regulates Adhesion Disassembly." *Nature Cell Biology* 6 (2): 154–61. <https://doi.org/10.1038/ncb1094>.
- Wehrle-Haller, Bernhard. 2012. "Structure and Function of Focal Adhesions." *Current Opinion in Cell Biology* 24 (1). Elsevier Ltd: 116–24. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.11.001>.
- Wei, Chaoliang, Xianhua Wang, Ming Zheng, and Heping Cheng. 2012. "Calcium Gradients Underlying Cell Migration." *Current Opinion in Cell Biology* 24 (2). Elsevier Ltd: 254–61. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.12.002>.
- Wei, Spencer C, Laurent Fattet, Jeff H Tsai, Yurong Guo, Vincent H Pai, Hannah E Majeski, Albert C Chen, Robert L Sah, Susan S Taylor, and J Adam. 2015. "Matrix Stiffness Drives Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumour Metastasis through a TWIST1-G3BP2 Mechanotransduction Pathway" 17 (5): 678–88. <https://doi.org/10.1038/ncb3157.Matrix>.
- Wellner, Ulrich, Otto Schmalhofer, Elizabeth Vincan, Simone Spaderna, Ulrike Burk, and Thomas Brabletz. 2008. "A Reciprocal Repression between ZEB1 and Members of the miR-200 Family Promotes EMT and Invasion in Cancer Cells" 9 (6). <https://doi.org/10.1038/embor.2008.74>.
- Wu, Congying, Sreeja B Asokan, Matthew E Berginski, Elizabeth M Haynes, Norman E Sharpless, Jack D Griffith, Shawn M Gomez, and James E Bear. 2013. "Arp2/3 Complex Is Critical for Lamellipodia and

- Organization of Cell-Matrix Adhesion but Dispensable for Fibroblast Chemotaxis” 148 (5): 973–87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.034.Arp2/3>.
- Wyckoff, Jeffrey B., Sophie E. Pinner, Steve Gschmeissner, John S. Condeelis, and Erik Sahai. 2006. “ROCK- and Myosin-Dependent Matrix Deformation Enables Protease-Independent Tumor-Cell Invasion In Vivo.” *Current Biology* 16 (15): 1515–23. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.065>.
- Xin, Ming, Xin-Wen Dong, and Xiu-Li Guo. 2015. “Role of the Interaction between Galectin-3 and Cell Adhesion Molecules in Cancer Metastasis.” *Biomedicine & Pharmacotherapy* 69 (February). Elsevier Masson: 179–85. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2014.11.024>.
- Xing Fana, b, Leila Khakic, Thant S. Zhua, Mary E. Soulesa, Caroline E. Talsmaa, Naheed Gulc, Cheryl Kohc, Jiangyang Zhangd, Yue-Ming Lih, Jarek Maciaczyki, Guido Nikkhahi, and F Francesco DiMecog, j, Sara Piccirillok, Angelo L. Vescovik, and Charles G. Eberhartc, e. 2010. “NOTCH Pathway Blockade Depletes CD133-Positive Glioblastoma Cells and Inhibits Growth of Tumor Neurospheres and Xenografts” 28 (1): 5–16. <https://doi.org/10.1002/stem.254.NOTCH>.
- Xiwei Zheng, Cong Bi, Marissa Brooks, and David S. Hage. 2015a. “BIOMECHANICAL and BIOCHEMICAL REMODELING of STROMAL EXTRACELLULAR MATRIX IN CANCER.” *Anal Chem.* 25 (4): 368–79. <https://doi.org/10.1016/j.cogdev.2010.08.003.Personal>.
- . 2015b. “HHS Public Access.” *Anal Chem.* 25 (4): 368–79. <https://doi.org/10.1016/j.cogdev.2010.08.003.Personal>.
- Xu, Qingsong, Tomoya Isaji, Yingying Lu, Wei Gu, Madoka Kondo, Tomohiko Fukuda, Yuguang Du, and Jianguo Gu. 2012. “Roles of N-Acetylglucosaminyltransferase III in Epithelial-to-Mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in Epithelial Cell Lines.” *The Journal of Biological Chemistry* 287 (20). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 16563–74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.262154>.
- Xu, Wenwei, Roman Mezencev, Byungkyu Kim, Lijuan Wang, John McDonald, and Todd Sulchek. 2012. “Cell Stiffness Is a Biomarker of the Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells.” *PLoS ONE* 7 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046609>.
- Yamaguchi, Yoshie, Dawei Deng, Yoshinori Sato, Yung-Te Hou, Rie Watanabe, Kohei Sasaki, Masaaki Kawabe, Eiichi Hirano, and Tetsuo Morinaga. 2013. “Silicate Fiber-Based 3D Cell Culture System for Anticancer Drug Screening.” *Anticancer Research* 33 (12): 5301–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24324063>.
- Yang, Esther H., Julia Rode, Md Amran Howlader, Marina Eckermann, Jobette T. Santos, Daniel Hernandez Armada, Ruixiang Zheng, Chunxia Zou, and Christopher W. Cairo. 2017. “Galectin-3 Alters the Lateral

- Mobility and Clustering of  $\beta$ 1-Integrin Receptors.” *PLoS ONE* 12 (10): 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184378>.
- Ye, X.-z., S.-l. Xu, Y.-h. Xin, S.-c. Yu, Y.-f. Ping, L. Chen, H.-l. Xiao, et al. 2012. “Tumor-Associated Microglia/Macrophages Enhance the Invasion of Glioma Stem-like Cells via TGF- 1 Signaling Pathway.” *The Journal of Immunology* 189 (1): 444–53. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103248>.
- Yilmaz, Mahmut, and Gerhard Christofori. 2009. “EMT, the Cytoskeleton, and Cancer Cell Invasion.” *Cancer and Metastasis Reviews* 28 (1–2): 15–33. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9169-0>.
- Yoo, Seung Hyun, Chun Kee Chung, Sung-hye Park, Sun Ha Paek, and Eun Joo Roh. 2010. “Inhibition of the  $Ca^{2+}$  Release Channel, IP3 R Subtype 3 by Caffeine Slows Glioblastoma Invasion and Migration and Extends Survival.” *Cancer Research* 70 (3): 1173–83. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2886>.Inhibition.
- Yordanova, Y N, and H Duffau. 2017. “Supratotal Resection of Diffuse Gliomas - an Overview of Its Multifaceted Implications.” *Neuro-Chirurgie* 63 (3): 243–49. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2016.09.006>.
- Yu, Cheng Han, Nisha Bte Mohd Rafiq, Fakun Cao, Yuhuan Zhou, Anitha Krishnasamy, Kabir Hassan Biswas, Andrea Ravasio, et al. 2015. “Integrin-beta3 Clusters Recruit Clathrin-Mediated Endocytic Machinery in the Absence of Traction Force.” *Nature Communications* 6. Nature Publishing Group: 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms9672>.
- Zhang, Can, Bei Xie, Yujian Zou, Dan Zhu, Lei Lei, Dapeng Zhao, and Hemin Nie. 2018. “Zero-Dimensional, One-Dimensional, Two-Dimensional and Three-Dimensional Biomaterials for Cell Fate Regulation.” *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.020>.
- Zhang, Wenjun, Xiuxia Qu, Biyi Chen, Marylynn Snyder, Baiyan Li, Yue Tang, Hanying Chen, et al. 2017. “Forcing through Tumor Metastasis: The Interplay between Tissue Rigidity and Epithelial-Mesenchymal Transition Spencer” 133 (1): 48–61. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017472>.Critical.
- Zhou, Pengcheng, Sonia Erfani, Zeyi Liu, Changhe Jia, Yecang Chen, Bingwei Xu, Xinyu Deng, et al. n.d. “CD151-  $\alpha$   $\beta$ 1 Integrin Complexes Are Prognostic Markers of Glioblastoma and Cooperate with EGFR to Drive Tumor Cell Motility and Invasion” 6 (30).
- Zhu, Dan, Chunye Xu, Norie Nakura, and Masaru Matsuo. 2002. “Study of Carbon Films from PAN/VGCF Composites by Gelation/crystallization from Solution.” *Carbon* 40 (3): 363–73. [https://doi.org/10.1016/S0008-6223\(01\)00116-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6223(01)00116-6).
- Zigmond, Sally H. 2004. “Beginning and Ending an Actin Filament: Control at the Barbed End.” *Current Topics in Developmental Biology* 63 (1): 145–88. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(04\)63005-5](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(04)63005-5).







**Résumé :** Les cellules souches de glioblastomes (GSC) sont sensibles aux propriétés mécaniques de leur microenvironnement et utilisent la rigidité pour favoriser leur invasion.

Dans ce contexte, nous avons développé une matrice 3D fibrillaire artificielle permettant de récapituler *in vitro* les comportements migratoires observés *in vivo*. Cette matrice étant hautement plastique, nous avons pu moduler la rigidité, la chimie de surface ou encore l'alignement des fibres.

Dans un premier temps nous avons modifié leur chimie de surface grâce à l'ajout de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) puis déposé des neurosphères (NS) de GSC sur ce tissu artificiel. L'ajout de laminine nous a permis d'observer le passage d'un comportement migratoire collectif à individuel.

Dans un deuxième temps nous avons modulé la rigidité des fibres. Après cinq jours de migration des GSC dans différentes conditions de rigidités, nous avons constaté une augmentation de la vitesse de migration à la rigidité intermédiaire de 166kPa par rapport à la condition plus souple de 3,2 kPa et à la condition plus rigides de 1260kPa. Cette capacité migratoire maximale dans nos conditions est associée à des changements de morphologie des GSC, à une augmentation de l'expression des protéines associée à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et à une modification de la régulation des protéines des adhérences focales.

La surexpression de la Mannoside acétylglucosaminyl transférase 5 (MGAT5) est associée aux tumeurs malignes et est impliquée dans la formation de regroupement de protéines membranaires grâce à la formation d'un treillis. Elle favorise également la maturation des adhérences focales, la migration cellulaire, l'invasion et l'EMT, entraînant ainsi des avantages fonctionnels pour les cellules tumorales. Au vu des résultats précédents sur l'expression des protéines EMT et des modifications de la régulation des protéines des adhérences focales, nous avons généré des GSC n'exprimant plus la MGAT5 grâce à la technique CRISPR Cas9 et les avons placées en NS sur les matrices 3D présentant différentes rigidités. Nous avons alors observé une diminution de la vitesse de migration à 166kPa par rapport aux GSC contrôles, associée à une diminution de l'EMT et de la maturation des adhérences focales. Par conséquent, cette étude démontre l'implication de la glycosylation et plus particulièrement de la glycosylation médiée par la MGAT5 sur la mécanotransduction des GSC.

**Mots Clés :** Glioblastome, Matrice 3D, Mécanotransduction, Rigidité, MGAT5, Migration

**Abstract :** Glioblastoma stem cells (CSC) have been reported to be sensitive to the mechanical properties of the surrounding tissue/microenvironment and to use the microenvironment stiffness to enhance invasion.

In this context, we developed a 3D artificial fibrillary tissue which can allow *in vitro* recapitulation of the migration behavior observed *in vivo*. This 3D matrix is highly plastic which allows for modulation of stiffness, surface chemistry and fibers alignment.

On the first hand, we functionalized the fibers with extracellular matrix proteins and then we plated GSCs neurospheres (NS) on the developed 3D artificial tissue. The addition of laminin modulates the migration behaviour from single cell to collective mode.

On the second hand we have modified stiffness of the fibers. After five days of GSCs NS migration on 3D electrospun fibers of different stiffnesses, we have seen an increase in migration velocity for an intermediate stiffness of 166kPa in comparison with our softest 3.2 kPa and stiffest stiffnesses (1260 kPa). This maximum migration rate is associated with changes in cell shape, increase of EMT proteins expressions and modifications of focal adhesion proteins regulation.

Mannoside acetyl glucosaminyltransferase 5 (MGAT5) overexpression is associated with malignant tumors and it is implicated in the clustering of membrane proteins through lattice formation, focal adhesions, cell migration, invasion, and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), resulting in functional advantages for tumor cells.

In light of previous results about of EMT proteins expressions and modifications of focal adhesion proteins regulation, we generated MGAT5 CRISPR Cas9 GSCs and placed it on 3D matrix with different stiffnesses. We observe a decrease in migration velocity at the intermediate stiffness in comparison with GSCs WT associated with a decrease in focal adhesion maturation and EMT. This study demonstrates the implication of glycosylation and more particularly MGAT5-mediated glycosylation on GSCs mechanotransduction.

**Key Words:** Glioblastoma, 3D Matrix, Mechanotransduction, Stiffness, MGAT5, Migration