



HAL
open science

Impact de la matrice extracellulaire sur la migration des cellules souches de glioblastome : un modèle tridimensionnel de culture et une nouvelle stratégie thérapeutique

Ali Saleh

► To cite this version:

Ali Saleh. Impact de la matrice extracellulaire sur la migration des cellules souches de glioblastome : un modèle tridimensionnel de culture et une nouvelle stratégie thérapeutique. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT006 . tel-02118022

HAL Id: tel-02118022

<https://theses.hal.science/tel-02118022>

Submitted on 2 May 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

Délivré par l'Université de Montpellier

Préparée au sein de l'école doctorale
Sciences Biologiques et Chimiques pour la Santé (ED168)

Et de l'unité de recherche **INSERM U1051**

Spécialité : **Biologie Cellulaire**

Présentée par **Ali Saleh**

**IMPACT DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE SUR LA
MIGRATION DES CELLULES SOUCHES DE
GLIOBLASTOME : UN MODELE TRIDIMENSIONNEL
DE CULTURE ET UNE NOUVELLE STRATEGIE
THERAPEUTIQUE**

Soutenue le 20 Juin 2017 devant le jury composé de

Mme May Morris, DR, CNRS, Montpellier	Présidente du jury
M. Fabrice Lalloué, PU, Univ. Limoges, Limoges	Rapporteur
M. Bruno Constantin, DR, CNRS, Poitiers	Rapporteur
M. David Cornu, PU, ENSCM, Montpellier	Examineur
M. Guy Lenaers, DR, INSERM, Angers	Co-directeur de thèse
M. Norbert Bakalara, PU, ENSCM, Montpellier	Directeur de thèse



A mes parents Zeinab, Hikmat

Et mon frère Mohamed

« Ignorer qu'on ignore, c'est ne pas savoir du tout. Mais savoir qu'on ignore, c'est vraiment savoir, car cela suppose de savoir tout ce qui est déjà su et d'être capable de détecter ce qui fait trou dans la connaissance. C'est croire savoir sans vraiment savoir qui constitue la vraie pathologie du savoir. C'est pourquoi, au fond, l'ignorance est la grande affaire des savants »

Extrait du monde selon Etienne Klein- Etienne Klein - Flammarion - 2015

Remerciements

« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries. »

Marcel PROUST

En premier lieu, je tiens à remercier les membres du jury : Mme. May MORRIS, Mr. Bruno CONSTANTIN, Mr. Fabrice LALLOUE et Mr David CORNU d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mon directeur de thèse Norbert BAKALARA, qui sans lui, ce travail n'aurait jamais vu le jour. Je lui remercie pour ses conseils. Sa compétence et sa rigueur scientifique m'ont beaucoup appris tout au long de mes années de thèse et me serviront pour le reste de ma carrière.

Je remercie mon co-directeur de thèse Guy LENAERS pour ses conseils et ses critiques qui m'ont aidé à améliorer mon travail.

Je présente ma gratitude et mes remerciements à tous les membres de l'Association pour la Spécification et l'Orientation Scientifique. Je remercie l'Association pour son soutien financier au cours de ma thèse.

Je remercie également Mr. Jean-Marc BRONDELLO et Mr. Olivier COUX pour le suivi de l'avancement de mes travaux de thèse et leurs conseils durant les comités de thèse.

Je remercie la famille INM, chercheurs, ingénieurs, étudiants et gestionnaires pour la très belle ambiance qu'ils ont créée et qu'ils continuent à créer au sein de l'Institut. Je pense spécialement aux journées de fête de Noël et de l'été ainsi qu'à la retraite à Banyuls-sur-Mer.

Je remercie tous les membres de l'équipe 4 sous la direction de Jean-Philippe HUGNOT.

Je remercie aussi tous les stagiaires qui sont passés dans l'équipe et qui m'ont aidé énormément. Je pense particulièrement à Jenny. Je la remercie de sa gentillesse. Je remercie aussi : Jim, Caroline et May-Carmen.

Je remercie Jacques pour sa bonne humeur, ses critiques et surtout de son soutien pendant les moments difficiles.

Je remercie Marisa de m'avoir aidé dès mon arrivée à l'Institut. Je te remercie pour ta gentillesse avec moi, tes conseils et tes propositions très pertinentes.

Je remercie Nicolas pour son grand cœur. Je te remercie pour ton soutien, pour tous les moments qu'on a passés ensemble et pour tout ce que tu m'as appris.

Je remercie Christine pour sa gentillesse, son humanité, sa présence, sa bonne humeur et ses conseils. Je te remercie d'avoir été à mes côtés tout le temps, de m'avoir aidé et de m'avoir encouragé. Je te remercie pour ton aide avant l'envoi du manuscrit.

A Zahra, qui m'a accueilli dès mon arrivée à l'Institut et qui m'a aidé à s'intégrer à la vie du labo, merci pour tout. Je te remercie pour tous les conseils que tu m'as donnés, pour tout ce que tu m'as appris. Je te remercie pour ton écoute et pour ton aide ces derniers mois. Zahra, ma grande sœur, ta présence m'a aidé énormément tout au long de ma thèse. Merci.

Je remercie également Emilie et Sarah pour leur gentillesse et pour tous les bons moments passés ensemble au labo. Emilie, merci pour ton aide.

Je remercie tous mes voisins du bureau paysager : Antoine, Emilie et tous les autres.

Je remercie Sophie et Isabelle pour tous les bons moments passés ensemble au Resto U, toutes les bonnes soirées et sorties inoubliables. Sophie, ma beauté, je te remercie pour ton aide à la mise en forme de ce travail.

Salim, mon ami, merci pour tous les bons moments, toutes les soirées en horaires décalés à l'INM, tous les plats partagés ensemble. Merci pour ton bon esprit et ton grand cœur amigo.

Soumaya et Hussein, ma famille à l'INM, je vous remercie pour tout. Les beaux moments qu'on a passés ensemble sont innombrables et inoubliables. Je n'aurais jamais pu finir ce travail sans votre présence à mes côtés, sans votre soutien moral. Je suis profondément reconnaissant envers vous pour tout ce que vous m'avez donné.

Pour mes amis d'enfance à Montpellier, Hachem et Allaw, merci d'avoir contribué indirectement au succès de ce travail. Merci pour tous les Week-ends passés ensemble et pour toute l'énergie que vous m'avez donné.

A la fin, je remercie les personnes que j'aime le plus au monde, mes parents et mon frère et à qui je dédie ce travail. Je vous remercie pour tous les sacrifices, tout l'amour, toute la vie. Ce travail accompli aujourd'hui n'est pas le mien, c'est le vôtre. Ma joie est la vôtre et inversement. Je n'aurais pas le temps pour vous dire MERCI.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	9
Liste des abréviations	12
Liste des Figures	16
Liste des Tableaux	17
Avant-propos.....	19
Introduction.....	25
Chapitre 1	27
Les tumeurs gliales	27
1- La nature du cancer.....	27
2- Les tumeurs du système nerveux central	28
2.1- Généralités	28
2.2- Les gliomes	29
2.2.1- Définition.....	29
2.2.2- La classification des gliomes.....	29
3- Les glioblastomes multiformes	32
3.1- Définition.....	32
3.2- La classification des glioblastomes.....	33
3.3- Epidémiologie.....	34
3.4- Les Causes	35
3.5- Symptômes et diagnostic	35
3.6- Le Traitement	36
3.7- Les altérations moléculaires associées aux Glioblastomes.....	37
3.8- Les cellules souches cancéreuses du glioblastome.....	40
3.8.1- Isolation et identification	40
3.8.2- Origine des cellules souches de glioblastome.....	42
Chapitre 2	47
La migration des Glioblastomes	47
1- L'invasivité des gliomes.....	47
1.1- L'invasivité intracérébrale et l'absence de métastases	47
1.2- La récurrence tumorale.....	48
1.3- L'hypoxie: moteur de l'invasion des glioblastomes	49
1.4- Les routes utilisées par les cellules de GBM pour envahir le cerveau	50

2- Les mécanismes de la migration des glioblastomes	52
2.1- Le profil d'expression génique des cellules migratrices et stationnaires	52
2.2- Les migrations individuelle et collective	53
2.2.1- Généralités sur la migration individuelle	53
2.2.2- Généralités sur la migration collective.....	55
2.2.3- Le mode migratoire des cellules de glioblastomes	59
2.3- La migration amiboïde et mésenchymateuse des glioblastomes	61
Chapitre 3	65
La matrice extracellulaire et son rôle dans la progression des glioblastomes.....	65
1- La matrice extracellulaire/le matrisome	65
1.1- Définition.....	65
1.2- Composition biochimique de la matrice extracellulaire	66
1.3- Les aspects physiques et spatiaux de la matrice extracellulaire.....	71
1.4- La matrice extracellulaire du cerveau	75
1.4.1- Composition biochimique	75
1.4.2- Propriétés physiques.....	76
2- L'adhésome	77
2.1- Définition.....	77
2.2- La composition moléculaire de l'adhésome	77
2.3- Les intégrines	79
2.3.1- Généralités	79
2.3.2- La signalisation bidirectionnelle des intégrines	80
2.3.2.1- La signalisation « inside-out »	80
2.3.2.2- La signalisation « outside-in »	82
2.4- Les autres récepteurs de la matrice extracellulaire	85
2.5- La dynamique des plaques d'adhésion focale.....	86
2.5.1- Composition des plaques d'adhésion focale et rôle du couple taline-vinculine	86
2.5.2- Désassemblage des plaques d'adhésion focale	87
2.5.3- La dynamique des plaques d'adhésion focale au cours de la migration dans des environnements bi- ou tri-dimensionnels.....	88
2.5.4- Dynamique des adhésions focales et rôle de taline et calpaine-2 dans les glioblastomes	90
3- Rôle de la matrice extracellulaire et des intégrines dans la progression du cancer	92
3.1- La matrice extracellulaire influence la progression tumorale	92
3.2- Les intégrines influencent la progression tumorale.....	94

4- Rôle de la matrice extracellulaire et des intégrines dans le développement des glioblastomes	101
4.1- Rôle de la composition biochimique de la matrice extracellulaire dans le développement des glioblastomes.....	101
4.2- Rôle de la mécanotransduction dans le développement des glioblastomes.....	104
4.3- Rôle des intégrines dans le développement des glioblastomes	106
5- Rôle de la glycosylation dans la progression du cancer	108
Objectifs	111
Résultats.....	119
Partie I	121
La Phostine PST3.1a modifie le profil de Glycosylation et inhibe l’Invasion et la Prolifération des Cellules Souches de Glioblastome.....	121
Introduction.....	123
Publication 1.....	129
Phostine PST3.1a targets MGAT5 and inhibits invasiveness and proliferation of Glioblastoma Initiating Cells	129
Partie II	173
Developpement d’une Matrice Tridimensionnelle de Nanofibres pour étudier le rôle de la Matrice Extracellulaire dans la Migration des Cellules Souches de Glioblastome	173
Introduction.....	175
Publication 2.....	177
Laminin regulates migration rate and N-cadherin-mediated cell-cell adhesion promotes collective migration of Glioblastoma in a three dimension matrix.....	177
Discussion et perspectives	221
Conclusion générale	241
Bibliographie	245
Communication scientifique sur le projet.....	263

Liste des abréviations

2D : Bidimensionnel(le)

3D : Tridimensionnel(le)

ABCC3 : ATP-binding Cassette (ABC)-type Protein 3

ADCC : Antibody-dependent-cell-mediated Cytotoxicity

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AF : Adhésions Focales

AH : Acide Hyaluronique

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor

APC : Antigen-presenting Cells

Asn : Asparagine

BAD : Bcl-2-associated Death Promoter (BAD) Protein

Bax : Bcl-2-associated X Protein

Bcl-2 : B-cell Lymphoma 2

BCNU : Bis-chloroethylnitrosourea / Carmustine

BEHAB : Brain Enriched Hyaluronan Binding

BTSC : Brain Tumor Stem Cells

CAI : Complexe Associé aux Intégrines

CD : Clusters of Differentiation

CDC42 : Cell Division Control Protein 42 Homolog

CDK : Cyclin-dependent Kinase

CDKN2A : Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

CS : Chondroïtine Sulfate

CSG : Cellules Souches de Glioblastome

CSPG : Chondroïtine Sulfate Protéoglycane

CTC : Cellules Tumorales Circulantes

CXCR : C-X-C Motif Chemokine Receptor

DDR : Discoidin Domain Receptor

DLGG : Diffuse Low Grade Glioma

DOCK : Deducator of Cytokinesis

DS : Dermatané Sulfate

EFNB3 : Ephrin B3

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EGFRvIII : Epidermal Growth Factor Receptor Variant III

EMAP2 : Microtubule-associated Protein Like Echinoderm EMAP

EMT : Epithelial-mesenchymal Transition

ENU : N-ethyl-N-nitrosouree

ERK : Extracellular Signal-regulated Kinase

EYA2 : Eyes Absent Homolog 2

FAK : Focal Adhesion Kinase

FAT : Focal Adhesion Targeting

FDA : Food and Drug Administration

FERM : Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin

FGF : Fibroblast Growth Factor

FN : Fibronectine

Fuc : Fucose

GABRA1 : Gamma-amino Butyric Acid A Receptor, Alpha1

GAG : Glycosaminoglycanes

Gal : Galactose

Glc : Glucose

GlcNac : N-acétylglucosamine

GlcT : Glucose Transférase

Gli1 : Human Glioma-associated Oncogene Homolog 1

Grb7 : Growth Factor Receptor Bound Protein 7

GSK3 : Glycogen synthase kinase 3

HA : Hyaluronic Acid

HGFR : Hepatocyte Growth Factor Receptor

HIF : Hypoxia-Inducible Factors

HPV : Human Papilloma Virus

HS : Héparane Sulfate

IDH : Isocitrate Déshydrogénase

Ig : Immunoglobuline

ILK : Integrin-linked Protein Kinase

INA : Internexin Neuronal Intermediate Filament

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

IκB : Inhibitor of Nuclear-Factor Kappa B

Kif1C : Kinesin-like Protein 1C

KLF4 : Kruppel-like Factor 4

K-Ras : V-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog

KS : Kératane Sulfate

LamG : Laminine G

GalC : Galactocerebrosidase

GBM : Glioblastomes Multiformes

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

GIC : Glioblastoma Initiating Cells

LCC : Laminin Coiled Coil

LIF : Leukemia Inhibitory Factor

LN : Laminine

LOX : Lysyl Oxidase

Man : Mannose

MAP : Microtubule-associated Protein

MAPK : Mitogen-activated Protein Kinases

MEC : Matrice Extracellulaire

MELK : Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase

MGAT : Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase

MGMT : 6-O-Méthylguanine-ADN Méthyltransférase

MiR : microRNA

MIT : Massachusetts Institute of Technology

MLC : Myosin-Light Chain

MMP : Matrix Metalloproteinase

MRCK : Serine/threonine-protein kinase

MT1-MMP : Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase

MTOC : Microtubule Organizing Center

mTOR : Mammalian Target of Rapamycin

NEFL : Neuronal Caliber Maintaining Neurofilament Light Polypeptide

NF : Nanofibres

NF1 : Neurofibromin 1

NFKB : Nuclear Factor-Kappa B

NG2 : Neural/Glial Antigen 2

NKCC1 : Electroneutral Na(+)-K(+)-Cl(-) Cotransporter 1

NSC : Neural Stem Cells

OCT4 : Octamer-binding Transcription Factor 4

OLIG2 : Oligodendrocyte Lineage Transcription Factor 2

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPC : Oligodendrocyte Precursor Cells

Oxphos : Oxydative Phosphorylation

PAK : serine/threonine protein kinase

PAN : Poly-acrylonitrile

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PDGFR : Platelet Derived Growth Factor Receptor

PG : Protéoglycanes

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PINCH : Cys-His-rich protein

PIP : Phosphatidylinositol Phosphate

PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate

PKC ζ : Protein Kinase C ζ

PSP : Phosphoserine Phosphatase

PST : Phostine

PTB : Phosphotyrosine-binding Domain

PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog

PVR : Poliovirus Receptor

Rac1 : Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1

Rap1 : Ras-related protein 1

Rb : Retinoblastoma Protein

RE : Réticulum Endoplasmique

RHAMM : Receptor for HA Mediated Motility

RIAM : Rap1-GTP-interacting Adaptor Molecule

SCID : Severe Combined Immunodeficiency

SH2 : Src Homology 2

Shh : Sonic Hedgehog

ShRNA : Short Hairpin RNA

Sia : Acide Sialique

SLC12A5 : Solute Carrier Family 12 Member 5

SL-IC : SCID Leukemia-initiating Cell

SLRPs : Small Leucin Rich Proteoglycans

SOX2 : Sex determining region Y-box 2

SP : Support Planaire

SPARC : Secreted Protein, Acidic, Cysteine-rich

STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3

SYT1 : Synaptotagmin1

TCA : Tricarboxylic Acid Cycle

TERT : Telomerase Reverse Transcriptase

TGFB : Transforming Growth Factor Beta

TIMP1 : Tissue Inhibitors of Metalloproteinase-1

TNF : Tumor Necrosis Factor

TP53 : Tumor Protein 53

TSPN : Thrombospondine

uPA : Serine Protease Urokinase-type
Plasminogen Activator

uPAR : Urokinase Plasminogen Activator
Receptor

VASP : Vasodilator-stimulated
Phosphoprotein

VCAM1 : Vascular Cell Adhesion Protein
1

VEGF : Vascular Endothelial Growth
Factor

VEGFR : Vascular Endothelial Growth
Factor Receptor

VWA : Von Willebrand Factor Type A

WASP : Wiskott–Aldrich Syndrome
Protein

ZEB1 : Zinc Finger E-box-binding
Homeobox 1

ZNF258 : Zinc Finger Protein 258

Liste des Figures

Figure 1. Le glioblastome évoque « les lapins tueurs » du Moyen Age	33
Figure 2. L'invasivité des gliomes	48
Figure 3. L'IRM d'un glioblastome.....	49
Figure 4. Les structures secondaires de Scherer.	51
Figure 5. Les routes utilisées par les gliomes pour envahir le cerveau	52
Figure 6. Les différents types de modes migratoires adoptés par les cellules cancéreuses.....	56
Figure 7. Le maintien de la cohésion intercellulaire au cours de la migration collective	57
Figure 8. La répartition hiérarchique au cours de la migration collective	58
Figure 9. Le modèle en cinq étapes de la migration mésenchymateuse	64
Figure 10. Représentation Schématique des matrices extracellulaires	66
Figure 11. La classification des protéoglycanes.	69
Figure 12. La structure de la laminine-111.....	70
Figure 13. Les aspects physiques, spatiaux et biochimiques de la matrice extracellulaire	74
Figure 14. Interactions signalétiques entre les différents composants du méta-adhésome.....	78
Figure 15. La structure tertiaire des intégrines	80
Figure 16. Le modèle structural de la taline.....	82
Figure 17. La structure de la kinase FAK.....	83
Figure 18. La régulation de la migration cellulaire par la protéine FAK.....	84
Figure 19. La MEC module la progression tumorale	93
Figure 20. Les intégrines $\beta 1$ modulent la progression tumorale	96
Figure 21. Les modifications de la composition de la MEC des glioblastomes	101
Figure 22. Représentation schématique de la biosynthèse des N-glycanes.....	110
Figure 23. L'invasion du corps calleux par les cellules de glioblastome.....	117
Figure 24. Structure ORTEP du composé 3.1a.....	125

Liste des Tableaux

Tableau 1. Classification OMS 2016 des tumeurs gliales du système nerveux central.....	31
Tableau 2. Les caractéristiques des migrations amiboïde et mésoenchymateuse	62
Tableau 3. Rôles des intégrines dans la modulation du cancer	100
Tableau 4. Effet anti migratoire des composés « 3.2a » et « 5.3d ».....	126

Avant-propos

Le cancer est une cause majeure de mortalité dans le monde. Cette pathologie était à l'origine de 8.8 millions de décès en 2015 selon les chiffres de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Plutôt que d'envahir l'organisme de l'extérieur, le cancer dérive directement à partir de tissus sains. La perte de contrôle de la division d'une ou de plusieurs cellule(s) « primordiale(s) » n'obéissant plus à la loi naturelle de l'homéostasie aboutit à l'apparition d'une masse tumorale. Ceci survient à la suite de l'accumulation d'un certain nombre de mutations génétiques au sein du génome d'une cellule normale, altérant plusieurs mécanismes physiologiques clés tels que la prolifération, la mort cellulaire et l'invasion.

Certes, « *Les racines du cancer sont dans nos gènes.* », comme affirmait le célèbre professeur Robert Weinberg du Massachusetts Institute of Technology (MIT) des Etats-Unis, mais, ses branches sont exposées aux changements de l'environnement. Le déraillement d'une cellule saine vers la malignité se manifeste à la suite du dysfonctionnement de la machinerie intracellulaire en présence d'un entourage extracellulaire favorable. En effet, les données scientifiques de cette dernière décennie ont attribué un rôle prépondérant aux différentes cellules saines du stroma avoisinant les cellules tumorales, ainsi qu'à la matrice extracellulaire (MEC) dans la transformation maline. La MEC comprend l'ensemble des macromolécules situées en dehors des cellules ; et qui dans le cas du cancer, sont synthétisées conjointement par les cellules tumorales et les cellules normales. Elle est riche principalement en glycoprotéines et protéoglycanes. Les modifications de la composition biochimique et des propriétés mécaniques de la MEC modulent l'ensemble des anomalies acquises par les cellules tumorales au cours de la progression du cancer, telles que l'immortalité répliquative, la résistance aux inhibiteurs de la croissance cellulaire, la résistance à la mort cellulaire, l'angiogenèse, l'invasion et les métastases.

Les signaux aberrants issus de la MEC sont intégrés à l'intérieur des cellules tumorales *via* une batterie de récepteurs membranaires dont les plus étudiés sont les intégrines. Les variations de l'expression et de l'activité de ces protéines transmembranaires sont impliquées dans le développement du cancer.

La glycosylation des protéines et lipides membranaires joue un rôle important dans leur activité et la spécificité de leur interactions avec les différents composants intra-

et extracellulaires. Les changements de leur profil de glycosylation affectent les interactions cellule-cellule et cellule-MEC et participent à l'invasion tumorale et aux métastases.

Les glioblastomes multiformes (GBM) sont les tumeurs cérébrales les plus communes et les plus agressives. La grande capacité invasive d'une sous-population de cellules souches de glioblastome (CSG) est responsable de la récurrence tumorale. Le remaniement de la MEC du cerveau au cours de la tumorigenèse favorise l'invasion des cellules de GBM. L'altération des motifs de glycosylation exprimés à la surface de ces cellules régule leur interaction avec la MEC et augmente leur migration. Mes travaux de thèse se focalisent sur l'identification des mécanismes régulant l'interaction des CSG avec la MEC et la détermination de leurs rôles dans la migration et l'invasion de ces cellules tumorales.

Afin d'illustrer mon propos, l'introduction sera répartie sur les trois chapitres suivants :

Dans le premier chapitre, je présenterai une synthèse de l'ensemble des connaissances acquises sur les tumeurs gliales et plus particulièrement les glioblastomes. Etant donné que l'ensemble de mes travaux ont été accomplis en utilisant des cultures primaires de tumeurs humaines enrichies en CSG et parce que ces cellules sont impliquées dans l'invasion des GBM, j'expliquerai en détails leur isolation, identification et les différentes théories formulées sur leur origine.

Dans le deuxième chapitre, j'exposerai les mécanismes de la migration et de l'invasivité des glioblastomes. Je présenterai les routes utilisées par les cellules de GBM pour envahir le cerveau. Je montrerai également les différents modes de migration adoptés par ces cellules *in vitro* et *in vivo* ; et comment ces modes sont régulés par la MEC.

Dans le troisième chapitre, je décrirai les différentes macromolécules extracellulaires et les propriétés physiques de la MEC en général et celle du cerveau en particulier. J'évoquerai aussi la composition moléculaire et la dynamique de régénération du complexe associé aux intégrines ou adhésome, comprenant les différentes protéines signalétiques membranaires et intracellulaires impliquées dans l'interaction avec la MEC. La dernière partie de cet exposé sera consacrée à la mise en évidence des

rôles de la composition biochimique et des propriétés mécaniques de la MEC dans la croissance et l'invasion du cancer en général et des glioblastomes en particulier. Je développerai aussi l'implication de la glycosylation dans la modulation des interactions cellule-cellule et cellule-MEC et sa contribution à l'invasion tumorale.

Introduction

Chapitre 1

Les tumeurs gliales

1- La nature du cancer

L'apparition de la multicellularité est un événement majeur au cours de l'évolution biologique des métazoaires. Cette émergence a commencé il y a environ 2 milliards d'années et a permis la transition progressive de la vie d'une forme bactérienne, unicellulaire et rudimentaire à une forme plus développée regroupant une variété de cellules spécialisées dans différents tissus et organes. Les ensembles de cellules et de leurs sécrétions ont formé des microenvironnements différents répartis dans tous les tissus. Puis une hiérarchie est apparue au sein de ces microenvironnements, nécessaire pour la mise en place d'une certaine forme d'organisation « sociale », et une hétérogénéité s'est rapidement mise en place. Dans les bas échelons de cette hiérarchie se trouvent différentes populations de cellules ayant chacune des fonctions bien spécialisées et déterminées à vie. Au sommet de cette pyramide, est apparue une population peu nombreuse de cellules non spécialisées ressemblant aux cellules de l'embryon en début de sa vie. Ce sont les cellules souches qui possèdent une plasticité et une potentialité leur permettant de se différencier et de se spécialiser pour remplacer les cellules mortes et assurer la pérennité des fonctions et maintenir l'homéostasie de l'organisme. Mais, en même temps que cette évolution majestueuse, des pathologies qui n'existaient pas auparavant chez les formes de vie rudimentaires évoluaient et se diversifiaient à leur tour. L'organisation et la régulation de cette hiérarchie cellulaire ont abouti à des dysfonctionnements engendrant des états pathologiques. Le cancer en est une illustration.

Concrètement, ce sont les travaux de recherche scientifique, d'une grande partie du vingtième siècle, et plus particulièrement les données histopathologiques qui ont démontré que les tumeurs sont créées par des cellules qui ont perdu la capacité de s'organiser et de fonctionner normalement (Weinberg, May 14, 2013). De ce fait, le

cancer n'est plus perçu comme un corps étranger qui envahit l'organisme et le rend malade, mais, comme un mal fonctionnement de cellules normales à l'intérieur d'un tissu sain (Weinberg, May 14, 2013).

De plus, c'est en observant les tissus tumoraux au cours du dix-neuvième siècle que les chercheurs ont remarqué une similarité avec les tissus embryonnaires, ce qui a permis de suggérer que les tumeurs se forment à partir de cellules semblables aux cellules embryonnaires (Sell, 2004). Ce sont ensuite Cohnheim et Durante, durant la deuxième moitié du dix-neuvième siècle, qui ont formalisé ce concept (Sell, 2004), qui a évolué plus tard pour donner naissance à la théorie du développement du cancer à partir des cellules souches adultes.

Les travaux de cette thèse concernent une classe particulière de tumeurs, celles affectant les cellules de soutien du système nerveux central, connues sous le terme de gliomes et plus précisément les gliomes de grade IV ou glioblastomes multiformes.

2- Les tumeurs du système nerveux central

2.1- Généralités

Les tumeurs sont classées en fonction de l'organe et du tissu d'origine. Les tumeurs les plus fréquentes sont d'origine épithéliale et sont responsables de 80% de la mortalité liée au cancer dans le monde occidental (Weinberg, May 14, 2013). Ces tumeurs sont nommées carcinomes. Le reste des tumeurs provient de tissus non épithéliaux et dont les plus fréquentes sont appelées des sarcomes. Ces tumeurs ont pour origine le tissu conjonctif ou stroma. Une autre catégorie de tumeurs non épithéliales est celle des tumeurs qui surviennent à partir des tissus hématopoïétiques. Parmi ces cancers, les lymphomes et les leucémies sont les plus documentés. La troisième classe de tumeurs non épithéliales constitue les tumeurs qui se développent à partir du système nerveux central et périphérique. Ce sont les tumeurs neuroectodermiques provenant du neuroectoderme lors du développement embryonnaire : gliomes, glioblastomes, schwannomes, méningiomes, rétinoblastomes, neuroblastomes et médulloblastomes. Alors que ces tumeurs ne

représentent que 1.3% des cancers diagnostiqués, elles sont responsables de 2.5% de la mortalité liée au cancer (Weinberg, May 14, 2013).

2.2- Les gliomes

2.2.1- Définition

Les gliomes représentent un groupe de tumeurs de bas grade (I/pilocytique et II/diffus) et haut grade (III/anaplasique et IV/glioblastome) ayant leur origine au niveau des cellules de soutien du système nerveux ou glie. Le mot glie trouve ses origines dans la langue grecque et veut dire «glue» (Van Meir et al., 2010). Les cellules gliales sont les astrocytes, oligodendrocytes et épendymocytes au niveau du système nerveux central ou les cellules de Schwann et les cellules satellites au niveau du système nerveux périphérique. Les fonctions traditionnelles associées à ces cellules sont de fournir un support aux neurones en ce qui concerne l'approvisionnement en nutriments, oxygène et élimination des déchets ainsi qu'une surveillance immunitaire. Récemment, de nouvelles fonctions ont été découvertes comme l'activation de différentes voies de signalisation chez les neurones et la neurotransmission (Van Meir et al., 2010).

2.2.2- La classification des gliomes

La classification de 2007 et les classifications précédentes des tumeurs du système nerveux central par l'organisation mondiale de la santé (OMS) ont été basées principalement sur des données histologiques. En d'autres termes, sur des marquages hématoxyline-éosine, sur l'expression des marqueurs de lignage cellulaire ainsi que sur l'observation de certaines ultrastructures histologiques par les anapathologistes (Louis et al., 2016). Le principal inconvénient de se baser exclusivement sur l'histologie pour classer les tumeurs est la difficulté d'établir une observation objective et reproductible.

L'ensemble des études génétiques et moléculaires menées durant ces dernières décennies ont clarifié les mécanismes de la tumorigenèse en général et des cancers du cerveau en particulier. Cela a ouvert la voie vers une nouvelle classification de ces tumeurs (Louis et al., 2016). Le but est de classer tous ces variants et entités

d'une façon plus précise et homogène ce qui améliorera le diagnostic, la prise en charge des patients, le pronostic et la réponse au traitement (Louis et al., 2016).

Lors de la réunion qui a eu lieu à Haarlem aux Pays-Bas en 2014, sous les auspices de la Société Internationale de Neuropathologie, une feuille de route a été mise en place pour incorporer les données moléculaires dans le diagnostic des tumeurs du cerveau permettant la révision de la classification de 2007 (Louis et al., 2016).

La nouvelle classification OMS des tumeurs du système nerveux central a été publiée en 2016. Elle prend en compte pour la première fois des données moléculaires pour classer ces tumeurs. Ainsi, la nouvelle nomenclature inclut d'abord le nom histopathologique suivi par les traits génétiques en forme d'adjectifs et séparés par une virgule, comme par exemple Astrocytome diffus, IDH-muté (Louis et al., 2016).

La classification de 2016 a ajouté de nouveaux néoplasmes et a vu disparaître d'autres entités et variants qui n'ont plus aucune pertinence au niveau biologique. Par exemple dans la nouvelle classification, les oligoastrocytomes, un groupe de tumeurs ayant une composante astrocytaire et une autre oligodendrogliale ont été remplacés par la désignation NOS (*not otherwise specified*). En fait, le diagnostic de ces tumeurs était toujours sujet à des controverses avec des composantes génotypiques et phénotypiques soit astrocytaires soit oligodendrogiales mais très rarement les deux (Louis et al., 2016). Le récapitulatif de la nouvelle classification OMS des gliomes est présenté dans le tableau 1.

Tableau 1. Classification OMS 2016 des tumeurs gliales du système nerveux central (Louis et al., 2016).

Tumeur	Grade
Tumeurs diffuses astrocytaires et oligodendrogiales	
Astrocytome diffus, IDH-mutant	II
Astrocytome diffus, IDH-wildtype	
Astrocytome diffus, NOS	
Astrocytome anaplasique, IDH-mutant	III
Astrocytome anaplasique, IDH-wildtype	
Astrocytome anaplasique, NOS	
Glioblastome, IDH-wildtype	IV
Glioblastome à cellules géantes	
Gliosarcome	
Glioblastome épithélioïde	
Glioblastome, IDH-mutant	IV
Glioblastome, NOS	
Gliome de la ligne médiane diffus, H3 K27-mutant	IV
Oligodendrogliome, IDH-muté et 1p/19q-codeleted	II
Oligodendrogliome, NOS	
Oligodendrogliome anaplasique, IDH-muté et 1p/19q-codeleted	III
Oligodendrogliome anaplasique, NOS	
Oligoastrocytome, NOS	
Oligoastrocytome anaplasique, NOS	
Autres tumeurs astrocytaires	
Astrocytome pilocytique	I
Astrocytome sous épendymaire à cellules géantes	I
Xanthoastrocytome pléomorphe	II
Xanthoastrocytome pléomorphe anaplasique	III
Tumeurs épendymaires	
Tumeurs sous-épendymaires	I
Ependymome myxopapillaire	I
Ependymome	II
Ependymome, RELA fusion-positive	II or III
Ependymome anaplasique	III
Autres gliomes	
Gliome choroïde du troisième ventricule	II
Gliome angiocentrique	I
Astroblastome	

* Not Otherwise Specified

3- Les glioblastomes multiformes

3.1- Définition

Le terme Glioblastome Multiforme (GBM) a été introduit pour la première fois dans la littérature scientifique par Cushing durant la deuxième moitié du dix-neuvième siècle. La première opération menée sur un patient souffrant de ce type de tumeur a eu lieu à Vienne en 1904 (Urbanska et al., 2014).

Les glioblastomes multiformes sont des néoplasies primaires du cerveau correspondant à un groupe de tumeurs génétiquement et phénotypiquement hétérogènes (Urbanska et al., 2014). Selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé, les glioblastomes sont considérés comme des gliomes de grade IV (Louis et al., 2016), les plus malins et mortels de tous les gliomes.

Pour illustrer l'agressivité et la malignité de cette maladie, Massoud, T et Kalnins. A ont publié dans une étude de cas clinique, l'IRM du cerveau d'un patient atteint d'un glioblastome au niveau du lobe occipital droit. Étonnamment, son glioblastome adoptait la forme d'un lapin sur l'IRM T1 pondérée (Fig. 1). Les auteurs ont fait le rapprochement avec les dessins décoratifs et artistiques qui apparaissaient dans les notes marginales des manuscrits enluminés du Moyen Age en Europe et qui représentaient des « lapins tueurs » dans des positions anormales en décapitant des humains (The Smithfield Decretals, The British Library) (Fig. 1, de Smithfield Decretals). Cet article a été publié pour rappeler la fatalité de cette maladie et le besoin pressant de nouvelles solutions thérapeutiques (Massoud and Kalnins, 2016).

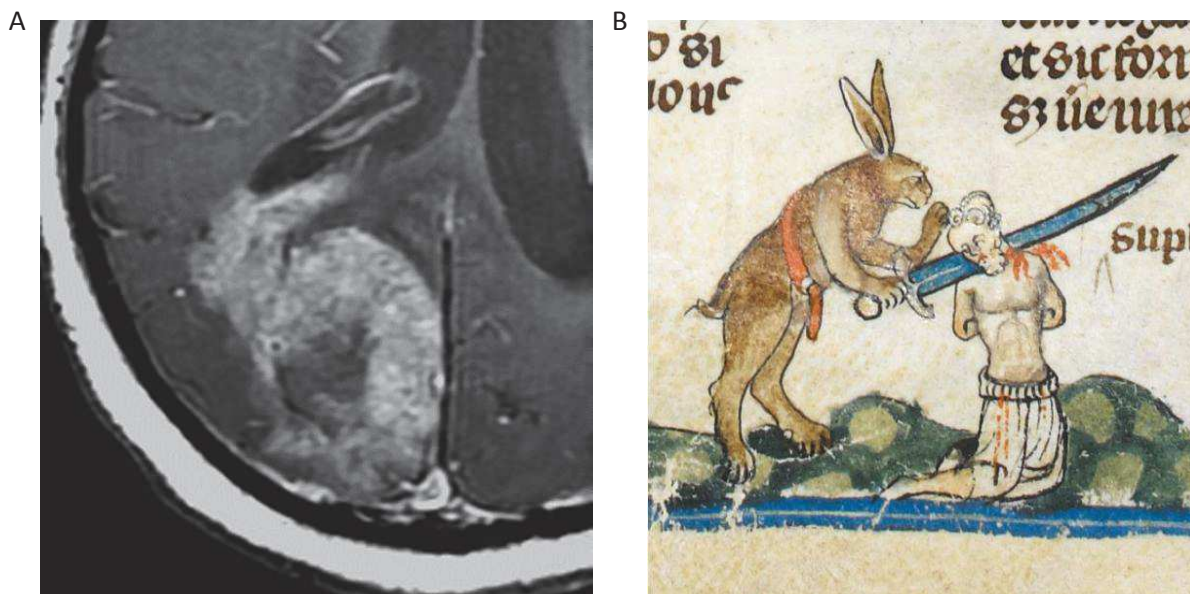


Figure 1. Le glioblastome évoque « les lapins tueurs » du Moyen Age. (A) IRM d'un glioblastome occipital droit ressemblant à un lapin (Massoud and Kalnins, 2016). (B) Dessin décoratif d'un manuscrit enluminé du Moyen Age représentant un lapin anthropomorphe « tueur » décapitant un prisonnier (The Smithfield Decretals).

3.2- La classification des glioblastomes

En 2010, Roel Verhaak *et al* ont défini quatre sous-types de glioblastomes en se basant sur le profil génomique des tumeurs : neural, proneural, classique et mésenchymateux (Verhaak et al., 2010). Cette classification portait une importance significative vis-à-vis de l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

- Sous-type Classique : Les caractéristiques génétiques du sous-type classique sont l'amplification du chromosome 7, la perte du chromosome 10 et l'amplification du gène de l'EGFR sans altérations des gènes TP53, NF1, PDGFRA et IDH 1. Une augmentation de l'expression du marqueur de cellules souches Nestin est aussi à noter.
- Sous-type Mésenchymateux : Le sous-type mésenchymateux se caractérise principalement par une augmentation de la fréquence de mutation et de délétion du gène NF1 et une diminution de son expression en général avec celle du gène suppresseur de tumeur PTEN. Ce sous-type présente aussi une augmentation de la nécrose et de l'inflammation et une expression élevée des gènes de la superfamille TNF et la voie NFkB.

- Sous-type Proneural : La classe proneurale montre une amplification focale du gène PDGFRA et des mutations ponctuelles de IDH1 ainsi que des mutations du gène TP53 et une perte de l'homozygotie. Une expression des gènes du développement oligodendrocytaire tels que SOX2 et OLIG2 est observée.
- Sous-type Neural : Le sous-type neuronal exprime des marqueurs neuronaux tels que NEFL, GABRA1, SYT1 et SLC12A5.

Dans la classification 2016 de l'Organisation Mondiale de la Santé des tumeurs du système nerveux central, les glioblastomes sont répartis en trois catégories (Louis et al., 2016). Le glioblastome, IDH-wildtype (90%) qui correspond à ce qui est cliniquement défini comme glioblastome primaire ou *de novo* sans historique clinique de tumeurs de bas grade diagnostiquées chez les patients. Ces tumeurs croissent pendant seulement 3 mois et sont de mauvais pronostic (Urbanska et al., 2014). Le glioblastome, IDH-mutant (10%) ou secondaire se développent à partir d'astrocytomes diffus ou anaplasiques de bas grade sur une période variable de quatre à cinq ans (Urbanska et al., 2014). Ces tumeurs évoluent lentement et sont de meilleur pronostic (Urbanska et al., 2014). Les glioblastomes multiformes secondaires sont diagnostiqués principalement chez des patients jeunes avec une moyenne d'âge de 45 ans alors que les tumeurs primaires touchent des personnes plus âgées avec une moyenne d'âge de 62 ans (Adamson et al., 2009). Enfin, le glioblastome, NOS, pour les tumeurs où une évaluation complète du profil IDH ne peut pas être réalisée (Louis et al., 2016).

3.3- Epidémiologie

Les glioblastomes multiformes sont les tumeurs les plus communes du système nerveux central aux États-Unis et dans les pays européens avec trois nouveaux cas diagnostiqués pour cent mille habitants chaque année, ce qui compte pour plus de 51% de tous les gliomes (Adamson et al., 2009). Le taux d'incidence chez les hommes en comparaison avec les femmes est de 1.26/1 (Urbanska et al., 2014). Des glioblastomes chez les enfants et les nouveaux nés ont été signalés aussi avec un taux d'incidence allant de 1.1 à 3.6 pour 100 000 enfants (Urbanska et al., 2014).

Malgré les normes de soins actuelles, incluant l'exérèse tumorale suivie par des traitements chimio et radiothérapeutiques concomitants, la durée de vie des patients

atteints de glioblastome est d'environ 14 mois après le diagnostic (Van Meir et al., 2010). De plus, des études ont montré que le taux de survie des patients atteints de GBM est compris entre 17 et 30% à un an et seulement 3 à 5% à deux ans (Adamson et al., 2009). Ce taux de survie dépend de l'âge. Seulement 1% des patients dépassant 75 ans survivent 5 ans contre 13% pour les patients âgés entre 15 et 45 ans (Adamson et al., 2009).

3.4- Les Causes

L'étiologie des glioblastomes et les facteurs de prédisposition restent largement inconnus (Adamson et al., 2009). Le seul facteur de risque environnemental prouvé pour les gliomes est l'exposition aux radiations ionisantes comme chez les enfants lors de l'irradiation au cours du traitement des leucémies (Adamson et al., 2009). D'autres facteurs ont été suggérés tels que l'exposition à des carcinogènes chimiques comme dans la fabrication du caoutchouc, la production du pétrole ou du chlorure de vinyle, de pesticides, de produits de nettoyage et l'exposition passive à la fumée de cigarette. Cependant, aucune de ces causes n'a été bien établie (Adamson et al., 2009).

De plus, une étude a montré une relation entre un niveau socioéconomique haut et le risque de développer un gliome (Adamson et al., 2009). De même, une augmentation du risque de développer un gliome ipsilatéral a été observée dans une méta-analyse étudiant les effets de l'utilisation d'un téléphone portable pour une période au delà de 10 ans (Adamson et al., 2009).

L'incidence des GBM est plus élevée dans les populations caucasiennes surtout celles vivant dans des régions industrialisées (Urbanska et al., 2014).

Du côté héréditaire, seulement 5% des gliomes présentent une composante familiale observée dans certaines maladies comme la maladie de Cowden, le syndrome de Li-Fraumeni et la Neurofibromatose (Adamson et al., 2009).

3.5- Symptômes et diagnostic

En fonction de la localisation de la tumeur et de la pression intracrânienne, qui elles-mêmes dépendent de la phase clinique, les différents symptômes comprennent des maux de tête, une ataxie, des vertiges, une perturbation de la vision (vision troublée,

diplopie) et des syncopes fréquentes (perte brève de la conscience liée à une diminution de la perfusion cérébrale) (Urbanska et al., 2014). D'autres symptômes incluent aussi des nausées et vomissements, une perte de la mémoire, des crises d'épilepsie, une somnolence, des faiblesses affectant un seul côté du corps, un changement de la personnalité et de la capacité à se concentrer et des perturbations de la parole (Urbanska et al., 2014).

Le diagnostic du glioblastome se fait par une imagerie MRI de type T1 pondéré avec ou sans gadolinium ou T2. La tumeur apparaît hypointense à isointense par rapport au tissu sain en utilisant l'imagerie T1 pondéré avec gadolinium alors qu'elle apparaît hyperintense en T2 (Adamson et al., 2009). Les glioblastomes peuvent être focaux, multifocaux ou diffus (gliomatosis cerebri) (Adamson, 2009 #292) et la plus grande majorité des tumeurs se trouvent au niveau des lobes frontaux dans les compartiments supratentoriaux, mais aussi dans toutes les parties du cortex, dans le cervelet, le tronc cérébral et la moelle épinière (Adamson et al., 2009). La plupart des cellules tumorales sont localisées au niveau du lit tumoral et dans un diamètre de 2 cm à partir de la bordure mais certaines migrent loin de la tumeur et arrivent parfois au niveau de l'hémisphère controlatéral (Adamson et al., 2009).

Concernant le diagnostic histopathologique, deux traits distinguent les glioblastomes des tumeurs de bas grade : les foyers de nécrose entourés par des pseudopalissades cellulaires et l'hyperplasie microvasculaire ou prolifération endothéliale des nouveaux vaisseaux sanguins au cours de l'angiogenèse (Brat, 2012).

3.6- Le Traitement

Dans le cas des glioblastomes, la chirurgie est souvent impuissante en raison de la profondeur des lésions et de leur dispersion dans le cerveau. Les tumeurs frontales s'opèrent le mieux, souvent complètement, suivies des pariétales, des temporales et des occipitales.

Dans son protocole de traitement des GBM publié en 2005, Roger Stupp a réparti ses patients en deux groupes. L'un recevait une radiothérapie fractionnée seule après exérèse tumorale ; l'autre groupe était traité avec du temozolomide, un agent alkylant, concomitant et adjuvant à la radiothérapie (après exérèse). Après traitement

au temozolomide, la médiane de survie des patients est passée de 12.1 mois à 14.6 mois et le taux de survie à deux ans de 10.4% à 26.5% (Stupp et al., 2005). Depuis, ce protocole est devenu le traitement de référence pour les glioblastomes nouvellement diagnostiqués.

De plus, des méta-analyses ont montré une augmentation de deux mois de la survie des patients traités par certaines nitrosourées comme la carmustine ou le BCNU (Adamson et al., 2009). Le même bénéfice est obtenu en administrant des tranches de Gliadel® imprégnées de carmustine directement dans la cavité au moment de la chirurgie (Adamson et al., 2009). Cette procédure permet de surmonter les problèmes liés au passage de la barrière hématoencéphalique et la biodisponibilité des médicaments.

D'autres modalités de traitement existent aussi, comme l'anticorps anti-VEGF ou bevacizumab qui neutralise l'activité biologique du VEGF (Urbanska et al., 2014) et induit donc une inhibition de l'angiogenèse. Il a également une activité anti-tumorale sur les cellules de GBM exprimant VEGFR et perturbe la niche périvasculaire des cellules souches de glioblastome (Urbanska et al., 2014).

L'immunothérapie et l'hormonothérapie existent aussi pour le traitement des glioblastomes (Urbanska et al., 2014). Néanmoins, les essais cliniques associés à ces thérapies restent anecdotiques.

3.7- Les altérations moléculaires associées aux Glioblastomes

En se référant à l'histopathologie, les glioblastomes sont constitués d'astrocytes néoplasiques indifférenciés, d'atypies cellulaires et nucléaires, d'une haute activité mitotique, une résistance à la mort apoptotique, une angiogenèse, une thrombose vasculaire et une nécrose pseudopalisadique (Adamson et al., 2009). L'hyperprolifération vasculaire et la nécrose sont les deux principales caractéristiques histologiques qui distinguent les GBM des gliomes de bas grade.

Malgré l'homogénéité apparente au niveau clinique et histologique, les glioblastomes se sont avérés être des tumeurs remarquablement hétérogènes au niveau génétique. Les dernières avancées dans ce domaine ont démontré l'inefficacité de

cibler un seul événement cellulaire ou une seule modification génétique chez tous les patients. Au contraire, l'individualisation des thérapies en fonction du profil génomique et protéomique des patients est devenue une nécessité (Adamson et al., 2009).

Des données génomiques récentes ont confirmé la dispersion des altérations génétiques et chromosomiques à l'échelle du génome (Adamson et al., 2009). Les principaux segments chromosomiques perdus sont 1p, 6q, 9p, 10p, 10q, 13q, 14q, 15q, 17p, 18q, 19q, 22q et Y, y compris des gènes suppresseurs de tumeur (Adamson. C et al, Expert Opin. Investig. Drugs, 2009). L'altération génétique la plus fréquente dans les GBM est la perte de l'hétérozygotie sur le chromosome 10, ce qui est le cas dans 60 à 80% des tumeurs (Adamson et al., 2009). Cette perte affecte le gène suppresseur de tumeur PTEN ou phosphatase tensin homolog.

D'autre part, le gain de l'expression génique a été détecté sous forme de duplications de chromosomes entiers, d'amplification intrachromosomique ou extrachromosomique et des mutations activant l'expression de certains gènes (Adamson et al., 2009). Toutefois, l'activation oncogénique est moins fréquente que la perte des gènes suppresseurs de tumeur. Nettement, l'activation oncogénique la plus commune est l'amplification du gène de l'EGFR sur le chromosome 7 (Adamson et al., 2009). Cette amplification se rencontre dans environ 40% des GBM et 10% des astrocytomes anaplasiques (Brat, 2012). Sept variants mutés du gène EGFR ont été identifiés, le plus commun étant EGFRvIII présent dans 20 à 50% des GBM (Adamson et al., 2009). Dans cette forme mutée, les exons 2 et 7 sont absents, ce qui résulte en une protéine EGFR tronquée possédant une activité tyrosine kinase constitutive à la surface des cellules cancéreuses. Ainsi, cette aberration de la voie EGFR et d'autres tyrosine kinases est responsable de la prolifération, migration et vascularisation des tumeurs (Adamson et al., 2009).

En outre, la genèse des gliomes résulte aussi de l'accumulation des erreurs au cours de la réplication de l'ADN et de la ségrégation des chromosomes impliquant principalement le système de réparation de l'ADN (Adamson et al., 2009). Il existe au moins quatre voies de réparation de l'ADN qui sont altérées dans les glioblastomes dont la réparation par excision des nucléotides, la réparation par excision des bases, la réparation des mésappariements et le renversement direct des lésions par

recombinaison (Adamson et al., 2009). L'exemple le plus étudié est celui de l'enzyme MGMT ou O⁶-Méthylguanine-ADN Méthyltransférase dont une augmentation d'expression a été démontrée dans certaines tumeurs y compris les gliomes (Ranjit et al., 2015). En effet, cette enzyme retire les groupements alkyls pro-mutagènes de la position O⁶ de la guanine et O⁴ de la thymine suite aux traitements chimiothérapeutiques empêchant la mise en place de l'apoptose. La méthylation des ilots CpG du promoteur de *MGMT*, diminuant son expression, diminue donc la résistance des cellules de GBM à l'agent alkylant temozolomide (Thomas et al., 2017). La méthylation du promoteur de *MGMT* sert donc de biomarqueur prédictif de la résistance à la chimiothérapie. De nouvelles techniques de pyroséquençage ont montré une sensibilité importante et une facilité d'usage pour quantifier la méthylation de *MGMT* chez les patients (Ludwig and Kornblum, 2017).

D'autres mutations génétiques sont récurrentes dans les glioblastomes et sont référencés par Ranjit *et al* (Ranjit et al., 2015). Le gène *TP53* qui est fréquemment muté dans le cancer est un gène suppresseur de tumeur contrôlant le cycle cellulaire au niveau de la phase G1 pour empêcher la réplication de l'ADN endommagé, induisant une sénescence ou une entrée en apoptose. La mutation de *TP53* résulte donc en une croissance continue des cellules endommagées (Ranjit et al., 2015). Ces mutations sont observées principalement dans les astrocytomes de bas grade et les glioblastomes secondaires. De même, le gène *CDKN2A (p16INK4A)*, localisé sur le chromosome 9p21, a été démontré comme étant aberrant dans les astrocytomes anaplasiques et les glioblastomes. La protéine p16INK4A est aussi un régulateur de la transition G1-S du cycle cellulaire, inhibant l'activité des kinases dépendantes des cyclines CDK4 et CDK6. La délétion homozygote ou l'hyperméthylation des ilots CpG du promoteur de *p16INK4A* sont responsables de la diminution de son expression dans les néoplasies humaines.

Une autre mutation très étudiée dans les gliomes est celle de l'enzyme IDH ou isocytate déshydrogénase présentant les deux isoformes IDH1 et IDH2. Les mutations de *IDH1* sont fréquentes dans les astrocytomes de grades II et III, les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes ainsi que dans les GBM qui progressent à partir de ces lésions de bas grade (les glioblastomes secondaires) (Parsons et al., 2008). Celles de *IDH2* ont été notées aussi dans les mêmes néoplasies mais à une fréquence moins importante. Dans tous les types histologiques et les grades de

gliomes, la présence de la mutation *IDH* est associée à une meilleure survie (Brat, 2012). Remarquablement, 90% des mutations dans *IDH1* ont lieu au niveau d'un site spécifique et sont caractérisées par l'échange d'une guanine par une adénine dans le codon 132 résultant dans le remplacement de l'acide aminé arginine par une histidine (R132H). Ceci a permis le développement d'un anticorps monoclonal (mIDH1R132H) pour détecter la protéine altérée au niveau des coupes histologiques au cours du diagnostic (Brat, 2012).

Finalement, un événement majeur au cours de la transformation maligne est celui de la préservation continue des télomères lors de la division cellulaire, permettant aux cellules tumorales de proliférer indéfiniment et de ne plus rentrer en sénescence. Ceci est dû à l'activité de l'enzyme télomérase TERT, qui est une transcriptase inverse, et qui ajoute des motifs répétitifs d'ADN (hexamères) du côté 3' des chromosomes (Greider and Blackburn, 1989; Pestana et al., 2017). Des mutations au niveau du promoteur du gène *TERT*, au lieu de celles présentes dans la séquence codante, ont été récemment décrites dans les gliomes (Killela et al., 2013). Les plus communes sont C228T et C250T, induisant une augmentation d'environ quatre fois de l'activité transcriptionnelle (Killela et al., 2013). L'activation de la télomérase a été notée dans les oligodendrogliomes de grade II et III et dans les glioblastomes primaires mais pas dans les astrocytomes de grade II et III ni les glioblastomes secondaires, ce qui donne la possibilité de différencier les GBM en fonction des mutations du promoteur du gène *TERT* (Killela et al., 2013).

3.8- Les cellules souches cancéreuses du glioblastome

3.8.1- Isolation et identification

En 1997 et pour la première fois, les travaux de Dominique Bonnet et John Dick ont permis d'identifier une population de cellules souches cancéreuses dans la leucémie myéloïde chronique. En effet, sur un modèle de souris SCID, les auteurs ont isolé une population de cellules CD34⁺⁺ CD38⁻ capables de prolifération, différenciation et auto-renouvellement et ils leur ont donné le nom de cellules initiatrices de leucémie SCID ou SL-IC (Bonnet and Dick, 1997).

La recherche des cellules souches a continué et en 2000, Uchida. N *et al* (Uchida et al., 2000) ont isolé des cellules souches du système nerveux central à partir de

cerveaux de fœtus humains. Ces cellules, qui sont phénotypiquement CD133(+) CD34(-) CD45(-) sont clonogéniques, capables de former des neurosphères *in vitro*, se différencier en neurones et cellules gliales et une fois transplantées dans le cerveau de souris immunodéficientes, elles sont capables de proliférer, migrer et se différencier en neurones (Uchida et al., 2000). Ce travail a ensuite ouvert la voie pour la recherche de cellules souches cancéreuses dans les tumeurs du système nerveux central et évidemment les gliomes.

Ainsi, deux ans plus tard, Ignatova, T. N. *et al* ont démontré que des cellules d'astrocytomes anaplasiques et de glioblastomes récurrents sont capables de former des clones dans des conditions de culture en suspension, en présence des facteurs de croissance EGF et FGF2, d'une façon semblable aux cellules souches neurales « saines » isolées à partir de la zone sous-épendymaire des ventricules latéraux et de l'hippocampe. De plus, ils ont démontré que ces cellules expriment nestin, un marqueur des cellules souches neurales et d'autres marqueurs des lignages neuronaux et gliaux (Ignatova et al., 2002).

En 2003, Hemmati, H. D. *et al* ont identifié des progéniteurs tumoraux dans les médulloblastomes et les gliomes pédiatriques. Ces progéniteurs forment des neurosphères *in vitro*, s'autorenouvellent et expriment des gènes de cellules souches neurales comme *CD133* ou prominin-1, *musashi (msi1)*, *sox2*, *bmi-1* (polycomb), *melk* et *PSP*. Après xénotransplantation dans le cerveau de rats, ces progéniteurs étaient capables de migrer, se différencier en neurone ou glie et continuaient à proliférer (Hemmati et al., 2003).

Durant la même année, Singh, S. K. *et al*, ont démontré la présence de cellules souches tumorales de cerveau ou BTSC (Brain Tumor Stem Cells) dans les médulloblastomes et les gliomes de bas grade chez les adultes. Ces cellules sont capables aussi de croître en neurosphères en absence de sérum mais en présence de EGF et bFGF en conditions non-adhérentes. Elles expriment notamment *CD133*, s'autorenouvellent et présentent un caryotype anormal (Singh et al., 2003).

L'histoire de l'isolation de cellules souches cancéreuses à partir des tumeurs gliales continue. En 2004, les travaux de Rossella Galli *et al* (Galli et al., 2004) ont démontré que les glioblastomes multiformes contiennent des précurseurs neuronaux possédant tous les traits des cellules souches neurales. Ils ont montré que ces

précurseurs sont multipotents *in vitro*, maintenus en culture à long terme avec plus de 80 passages et un temps de dédoublement de 3 à 4 jours et ont été donc caractérisés comme étant des cellules souches neurales tumorales. Ces cellules sont capables de se différencier, en absence des facteurs mitogènes et en présence de LIF pour générer des astrocytes exprimant la GFAP, des oligodendrocytes exprimant GalC et des neurones immunoréactifs à Tuj1, MAP2, MAP5, neurofilament, glutamate et acide γ -aminobutyrique. En injectant ces cellules dans des souris immunodéficientes, en sous-cutané et intracrânien, elles ont formé des tumeurs avec une efficacité successivement de 50% et 100% en comparaison avec des cellules souches neurales issues de fœtus humains. Les analyses histopathologiques des tumeurs sous-cutanées ont montré une ressemblance sans précédent avec les tissus tumoraux de glioblastomes présentant des zones de nécrose avec des pseudopalissades, une prolifération vasculaire élevée, une immunoréactivité à la GFAP et une activité mitotique. Quand ces cellules souches tumorales étaient injectées orthotopiquement, elles ont développées des tumeurs avec une grande activité proliférative, une migration et une infiltration exacerbées (Galli et al., 2004; Lathia et al., 2015).

3.8.2- Origine des cellules souches de glioblastome

Bien que les travaux d'Ignatova, Hemmati, Singh, Galli et autres, aient démontré la présence de cellules souches cancéreuses dans les gliomes, auxquelles ils ont donné des nominations différentes, cela ne donnait aucune information sur l'origine de ces cellules. Jusque là, l'idée traditionnelle était que ces tumeurs proviennent suite à la transformation maligne des cellules gliales différenciées du système nerveux central, notamment les astrocytes et oligodendrocytes (Chesler et al., 2012). Mais suite à la découverte de cellules souches multipotentes et des progéniteurs dans le cerveau postnatal des mammifères et l'identification de cellules souches dans les tumeurs primaires du cerveau y compris les glioblastomes, la théorie de la cellule souche cancéreuse à l'origine des gliomes s'est renforcée. Selon cette théorie, ce n'est plus la dé-différenciation des cellules gliales matures qui est à l'origine des gliomes mais c'est la transformation maligne des cellules souches neurales ou progéniteurs du cerveau qui en est la cause (Chesler et al., 2012).

Actuellement, plusieurs théories circulent dans la littérature scientifique pour expliquer l'origine des gliomes. La première, est la théorie de la dé-différentiation selon laquelle la tumorigenèse est vue comme un processus multi-étapes d'accumulations des modifications génétiques amenant à la transformation d'une cellule mature normale en une cellule maligne. Récemment, il a été démontré que l'activation de certains oncogènes (*K-Ras* et *Akt*) en même temps que la perte de gènes suppresseurs de tumeurs (*INK4A/ARF*) dans les astrocytes corticaux matures aboutit au développement d'un glioblastome (Goffart et al., 2013). Au contraire, une autre étude a montré que la délétion des gènes suppresseurs de tumeurs *Rb*, *P53* et *PTEN* dans les astrocytes de la zone sous-ventriculaire résulte en tumeurs de différents phénotypes alors que la suppression de ces gènes dans les astrocytes corticaux matures n'aboutit pas à l'apparition d'une tumeur (Siebzehnruhl et al., 2011). Ainsi, il semble que la perte de gènes suppresseurs de tumeurs associée à l'activation d'oncogènes, sont deux événements obligatoires pour initier la formation d'un glioblastome à partir d'astrocytes matures corticaux. Alors que, par exemple, seule l'activation des oncogènes *Ras* et *Akt* est suffisante pour induire le développement d'un GBM à partir de cellules progénitrices exprimant la nestine (Goffart et al., 2013).

La deuxième, est la théorie des cellules souches cancéreuses de glioblastomes. Selon cette théorie, les GBM pourraient provenir de la transformation maligne des cellules souches neurales (NSC) présentes dans les régions neurogéniques du cerveau adulte. Ces cellules souches ainsi que des progéniteurs plus différenciés sont présentes dans la zone sous-ventriculaire délimitant les ventricules latéraux, la zone sous-granulaire du gyrus denté dans l'hippocampe et la matière blanche sous-corticale (Chesler et al., 2012). Dans la zone sous-épendymaire tapissant les ventricules latéraux du cerveau, se trouvent des cellules souches neurales (NSC) quiescentes dites les cellules B, qui génèrent des cellules à activité proliférative transitoire élevée, appelées les cellules C, capables à leur tour de donner naissance à des neuroblastes (Type A) qui prennent le courant de migration rostrale vers le bulbe olfactif où ils se différencient en interneurones. Les cellules quiescentes B génèrent aussi des oligodendrocytes *via* des progéniteurs intermédiaires OPC (Jin, 2016) au niveau de la région du corps calleux. Contrairement aux astrocytes et aux neurones du système nerveux central, les cellules souches et les progéniteurs

restent hautement prolifératives ce qui les rend plus susceptibles à la transformation maligne. En effet, suite à l'exposition au N-ethyl-N-nitrosourée (ENU) ou au sarcome aviaire, des tumeurs sont formées préférentiellement au niveau de la zone sous-ventriculaire des cerveaux de chiens et de rongeurs, plutôt que dans des régions moins prolifératives (Chesler et al., 2012). Ce sont les cellules exprimant nestin et qui ont été répertoriées dans les gliomes qui sont particulièrement sensibles au N-ethyl-N-nitrosourée renforçant donc le lien entre les populations de cellules souches et la formation des gliomes (Chesler et al., 2012).

Des études ont démontré que les cellules initiatrices du glioblastome proviennent des cellules quiescentes B localisées au niveau de la zone sous-ventriculaire (Goffart et al., 2013). En fait, les mutations génétiques s'entassent principalement dans le génome de ces cellules dans des modèles murins transgéniques hGFAP-Cre/p53flox/flox. De plus, une étude a montré que suite à l'injection de PDGF à l'intérieur du ventricule, les cellules B exprimant PDGFR prolifèrent et forment des hyperplasies ressemblant au GBM (Goffart et al., 2013). En 2009, un garçon atteint d'ataxie télangiectasie a été traité par une injection intracrânienne de cellules souches neurales. Malheureusement, quatre ans plus tard, il a développé un cancer du cerveau multifocal. Les études moléculaires et cytogénétiques ont montré que la tumeur est issue d'au moins deux donneurs, ce qui montre l'implication des NSC dans le développement des gliomes (Goffart et al., 2013).

Les cellules souches neurales et les progéniteurs de la zone sous-ventriculaire d'un côté et les populations de cellules souches de glioblastome de l'autre côté, partagent l'expression de marqueurs de surface, de facteurs de transcription, de gènes suppresseurs de tumeurs, de facteurs de croissance et leurs récepteurs. Par exemple, les cellules initiatrices de GBM expriment des gènes de développement impliqués dans la prolifération, l'autorenouvellement et le maintien des cellules souches dans la zone sous-ventriculaire. C'est le cas lors de la dérégulation de la voie Shh induisant l'expression du facteur de transcription Gli1 dans les gliomes de haut et bas grade permettant le maintien des cellules souches tumorales (Chesler et al., 2012). A cela il faut ajouter l'omniprésence des cellules initiatrices de GBM dans des niches hautement vascularisées appelées niches périvasculaires, contenant des molécules de la matrice extracellulaire et des facteurs de croissance rappelant les microenvironnements des cellules souches neurales du cerveau des mammifères

(Chesler et al., 2012). Une étude a montré que les cellules souches de gliome exprimant la nestine et CD133 sont fortement associées aux capillaires sanguins et cellules endothéliales dont le nombre dans les xénogreffes orthotopiques augmente la fraction de cellules capables d'autorenouvellement (Chesler et al., 2012).

Bien que la zone sous-ventriculaire soit considérée comme le principal compartiment de cellules souches à l'origine des gliomes, d'autres régions germinales du cerveau pourraient être à l'origine de la tumorigenèse cérébrale comme le troisième et le quatrième ventricule (Goffart et al., 2013). Par exemple, il a été démontré que les gliomes pédiatriques proviennent le plus souvent des cellules souches neurales localisées au niveau du troisième ventricule (Goffart et al., 2013).

Enfin, certains articles font référence à une théorie intermédiaire qui propose que les gliomes malins sont issus de précurseurs et de cellules non-souches. Dans ce contexte, ils ont démontré que les cellules progénitrices C, suite à l'accumulation des altérations génétiques, initient des tumeurs et que leurs descendantes Olig-2 – positives sont impliquées dans la genèse des gliomes (Goffart et al., 2013). Ces précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) exprimant NG2+, Olig2 et PDGFR ont une capacité proliférative élevée et sont largement répartis au niveau de la matière blanche et la matière grise du cerveau. Ces OPCs sont donc considérés comme des suspects dans la genèse des gliomes (Goffart et al., 2013). Ces cellules ont été reprogrammées *in vitro* pour acquérir une multipotentialité leur permettant de se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Goffart et al., 2013). Dans une autre étude, les auteurs ont utilisé des biopuces d'ADN pour comparer le niveau de l'expression des gènes entre une population enrichie en cellules souches de glioblastome (CSG) et une autre population de cellules différenciées. Parmi tous les gènes testés, ils ont déterminé que le niveau de l'expression du gène *OLIG2* varie le plus entre les deux populations et ont donc déduit que Olig2 est le marqueur le plus spécifique des CSG (Trepant et al., 2015).

Chapitre 2

La migration des Glioblastomes

1- L'invasivité des gliomes

1.1- L'invasivité intracérébrale et l'absence de métastases

Les gliomes sont des tumeurs hautement invasives (Fig. 2), capables d'envahir le tissu cérébral local et distant, mais font rarement de métastases extraneuronales. En 1961, Matsukado *et al* montraient déjà que 50% des tumeurs cérébrales non traitées atteignent l'hémisphère controlatéral. Cette invasivité présente un obstacle majeur à la résection tumorale, de telle sorte que le neurochirurgien Walter Dandy procédait en 1928 à l'enlèvement total de l'hémisphère droit de ses patients atteints de tumeurs cérébrales sans observer de détérioration mentale apparente (Dandy, 1928).

Récemment, une nouvelle pratique chirurgicale des gliomes de bas grade diffus (DLGG) a été introduite par le professeur Hugues Duffau à l'hôpital Gui de Chauliac à Montpellier. En se référant à la cartographie cérébrale fonctionnelle par stimulation électrique directe per-opératoire, le neurochirurgien retire en plus de la masse tumorale visible une marge de 2 cm aux alentours. Cette exérèse dite « supratotale » permet d'enlever jusqu'à 98% des cellules tumorales. En comparant les résultats entre des patients ayant subi une exérèse complète ou totale et d'autres une exérèse supratotale, le professeur Duffau montre que cette dernière empêche la transformation anaplasique et le besoin de traitement adjuvant chez les patients (Duffau, 2013).

Malgré cette grande capacité invasive, les gliomes sont des tumeurs qui métastasent très peu vers d'autres organes en dehors du système nerveux central. Seulement 0.4 à 2 % des gliomes forment des métastases extra crâniennes, détectées le plus souvent au niveau des ganglions lymphatiques locaux, des poumons et de la cavité

pleurale, et occasionnellement dans les os ou le foie (Beauchesne, 2011). Plusieurs théories ont été posées pour expliquer la rareté des phénomènes métastatiques. Selon la première, ce serait l'absence d'un système lymphatique qui draine le cerveau et la présence d'une barrière hémato-encéphalique imperméable qui limitent la sortie des GBM du cerveau. Selon une autre théorie, le cerveau, contrairement à tous les autres organes, possède très peu de tissu conjonctif ou stroma et ne confère donc pas d'avantage sélectif aux clones capables d'envahir les tissus extra crâniens (Subramanian et al., 2002).

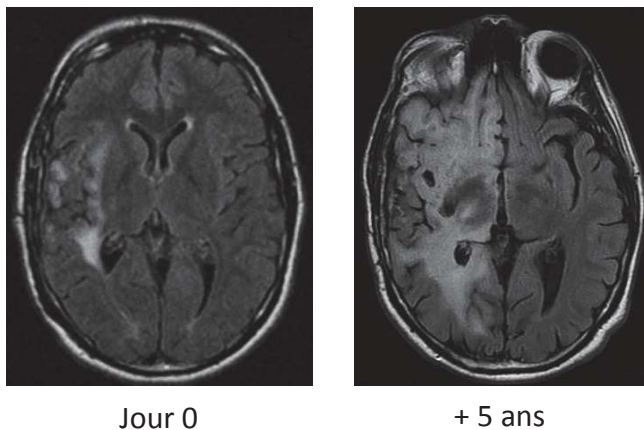


Figure 2. L'invasivité des gliomes (d'après Yordanova et Duffau (Yordanova and Duffau, 2017)).

1.2- La récurrence tumorale

A cause de cette aptitude invasive des gliomes, la récurrence tumorale après la chirurgie et les traitements concomitants radio et chimiothérapeutiques, est malheureusement la règle. Dans une étude de cas particulier, une patiente de 39 ans, avait développé un glioblastome au niveau du lobe pariétal gauche. Après une chirurgie subtotale suivie de radiothérapie, de chimiothérapie à base de témozolomide et d'un traitement par application de champ électrique de fréquence intermédiaire (NovoTTF-100A) sur le cerveau, une récurrence locale en plus d'une lésion bifrontale réapparaissent 9 mois plus tard (Fig. 3) (Turner et al., 2014). Ainsi, à partir d'une tumeur initiale du lobe pariétal gauche, une récurrence apparaît au niveau bifrontal quelque temps après. Ceci montre que les cellules tumorales sont capables d'envahir le parenchyme cérébral à longue distance.

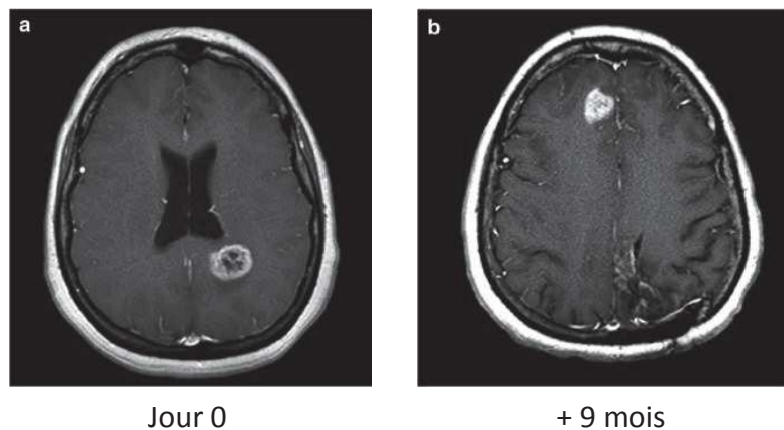


Figure 3. L'IRM d'un glioblastome. (a) Un glioblastome initial au niveau du lobe pariétal gauche et (b) une récurrence bifrontale (d'après Turner. SG *et al.*, (Turner et al., 2014)).

1.3- L'hypoxie: moteur de l'invasion des glioblastomes

Une des modifications histologiques qui distingue les glioblastomes des tumeurs de bas grade est l'apparition de zones nécrotiques appauvries en oxygène. Une succession d'événements transforment ces zones en réservoirs de cellules hautement invasives. Premièrement, une vaso-occlusion est associée à une thrombose intravasculaire. Ceci engendre une hypoxie autour des vaisseaux touchés. Pour fuir ce manque en oxygène, des vagues de cellules tumorales hypoxiques migrent loin vers d'autres vaisseaux fonctionnels, ce qui résulte en une dispersion des cellules cancéreuses dans le cerveau. Ces vagues de migration collective portent le nom de pseudopalissades (Brat, 2012). A l'intérieur de ces pseudopalissades, les cellules expriment les facteurs HIF qui jouent le rôle de facteurs de transcription et orchestrent au sein du génome l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la survie, le métabolisme, l'angiogenèse et l'invasion (Hambardzumyan and Bergers, 2015). Ainsi, il a été démontré que l'hypoxie *via* HIF1 α et HIF2 α induit l'expression du facteur de transcription ZEB1 résultant en une transition mésenchymateuse et l'acquisition par les cellules de GBM d'un phénotype invasif (Joseph et al., 2015) associé à la production des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire MMP2 et uPAR (Brat, 2012). Par conséquent, l'hypoxie s'avère être un acteur central dans l'invasion des glioblastomes. Cependant, les glioblastomes ne migrent pas seulement sous l'effet de l'hypoxie, notamment au niveau de la zone périvasculaire fortement approvisionnée en oxygène et qui constitue une voie principale de diffusion des GBM.

En plus de la niche sous-ventriculaire, qui a été bien caractérisée, une nouvelle niche de cellules souches de glioblastomes a été identifiée entre les zones nécrotiques centrales et les vaisseaux sanguins fonctionnels les plus proches et a été nommée la niche hypoxique. Ici, l'hypoxie *via* les protéines HIF maintient le caractère souche de ces cellules tumorales et augmente l'expression des marqueurs CD133, SOX2, OCT4, Nestin et KLF4 (Hambardzumyan et al, 2015). De même, Ishii. A *et al* ont détecté sur des tissus tumoraux humains des populations de cellules souches de glioblastomes quiescentes exprimant SOX2 et NANOG autour des zones nécrotiques (Ishii et al., 2016). Ces conditions hypoxiques permettent donc de préserver des populations de cellules souches de glioblastomes et favorisent leur migration vers de nouveaux sites aboutissant à un cycle vicieux et à une diffusion illimitée de la tumeur.

1.4- Les routes utilisées par les cellules de GBM pour envahir le cerveau

Les cellules cancéreuses du glioblastome utilisent les mêmes routes que les neurones immatures et les cellules progénitrices pour se propager dans le cerveau. En 1938, en sectionnant les cerveaux de 100 de ses patients, le neuropathologiste Hans Joachim Scherer a conclu que les gliomes migrent suivants des structures cérébrales préexistantes qu'il nomma des « structures secondaires ». Elles définissent l'interaction des cellules malines avec le microenvironnement neuronal. Plus tard, elles ont porté son nom et sont devenues les « structures de Scherer ». Selon Scherer, les gliomes migrent (a) à l'intérieur du parenchyme cérébral en contactant les corps cellulaires et les prolongements neuronaux, (b) le long des vaisseaux sanguins, (c) en suivant les trajets fibreux de la matière blanche (dans le corps calleux) et (d) dans l'espace subarachnoïde en continuité avec les ventricules (Fig. 4) (Cuddapah et al., 2014).

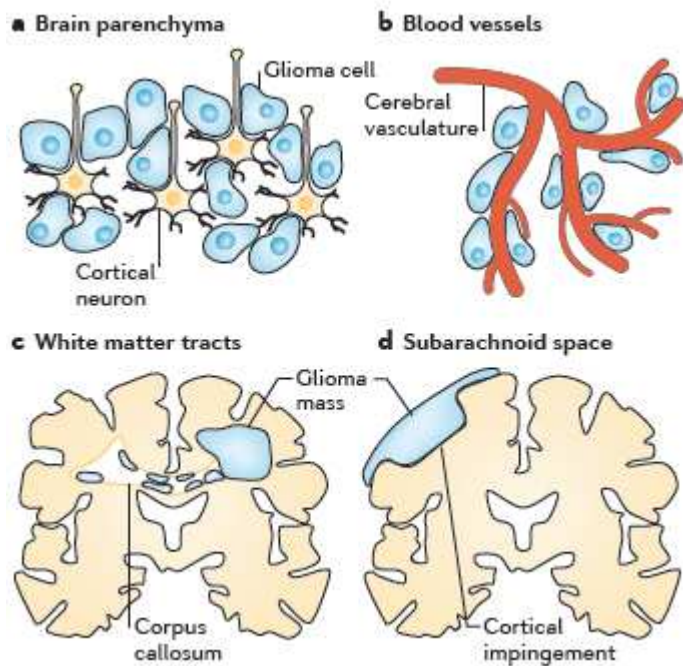


Figure 4. Les structures secondaires de Scherer (d'après Cuddapah. VA et al, Nature Neuroscience Reviews, 2014).

Actuellement, ces interactions ont été étudiées avec plus de détails au niveau anatomique et moléculaire. Du point de vue anatomique, selon Gritsenko *et al*, les gliomes sont guidés par les vaisseaux sanguins ou les voies neuronales. Au niveau des vaisseaux sanguins, les cellules cancéreuses déplacent les prolongements astrocytaires de la glia limitans et utilisent la membrane basale externe comme substrat pour la migration (Fig. 5 A et B). Certaines cellules traversent cette membrane basale et accèdent à l'espace périvasculaire entourant les vaisseaux sanguins et migrent le long de la membrane basale interne de la barrière hémato encéphalique (Fig. 5 A et C). Cette région, remplie de liquide cébrospinal, n'exerce aucune entrave limitant la migration cellulaire. Les gliomes se déplacent aussi en suivant les fibres myélinisées (Fig. 5 A et D). La myéline englobant les prolongements axoniques constitue un signal non permissif pour la migration cellulaire. Cependant, les cellules de GBM sécrètent des métalloprotéinases (MT1-MMP, MMP2 et MMP14) pour éliminer ces signaux inhibiteurs et créer un environnement favorable. De même, en sécrétant ces protéases et en déformant leur noyau, ces cellules pénètrent entre des fibres de matière blanche espacées de moins de 1 μ M (Gritsenko et al., 2012).

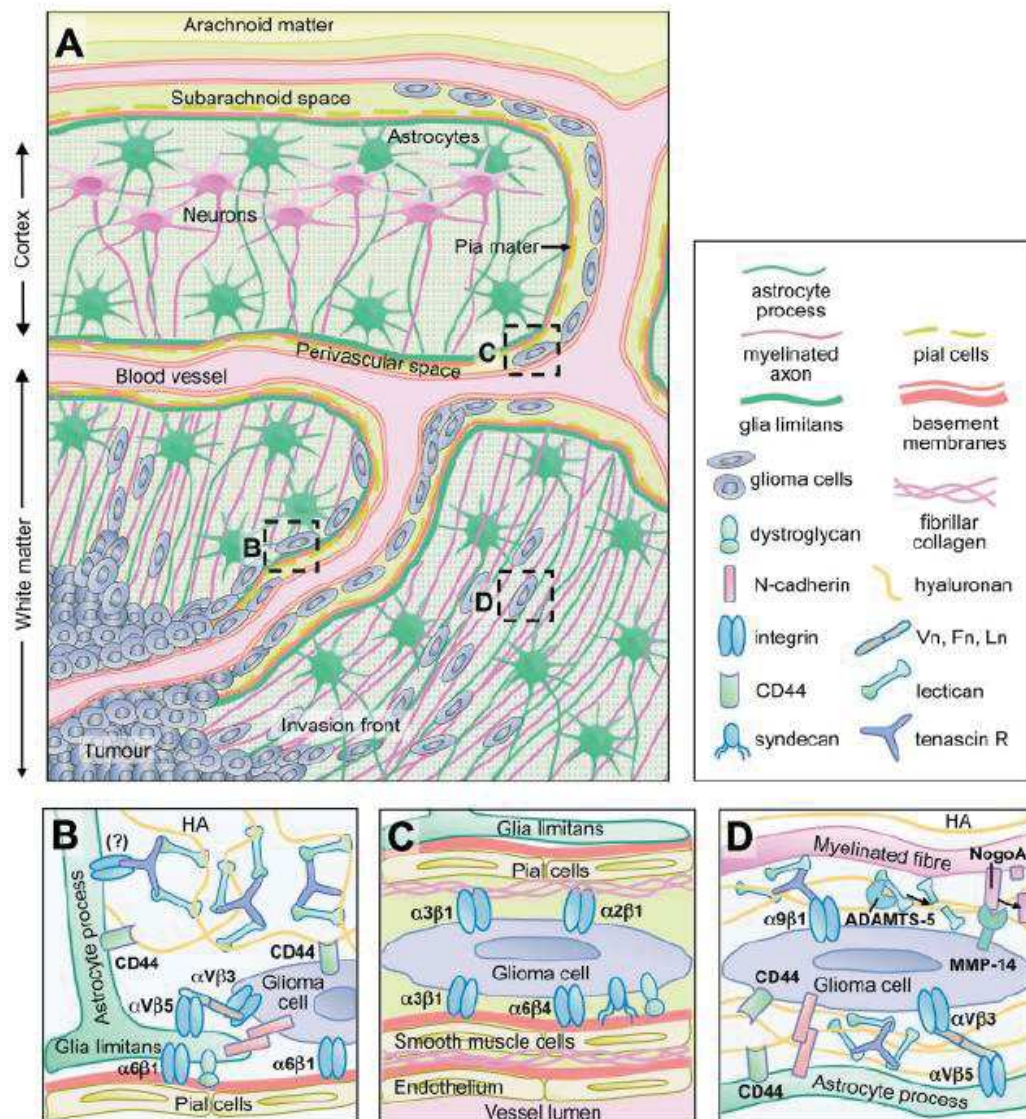


Figure 5. Les routes utilisées par les gliomes pour envahir le cerveau. (A) La migration des gliomes le long des prolongements astrocytaires de la glia limitans, à l'intérieur de l'espace périvasculaire et en suivant les fibres myélinisées du cerveau. (B) Le guidage extravasculaire des cellules de gliomes au niveau de l'interface vaisseau-stroma. (C) La migration dans l'espace périvasculaire. (D) Le déplacement le long des fibres myélinisées de la matière blanche (d'après Gritsenko. PG *et al* (Gritsenko et al., 2012)).

2- Les mécanismes de la migration des glioblastomes

2.1- Le profil d'expression génique des cellules migratrices et stationnaires

In vitro, en utilisant un test de migration radiale, Demuth, T. *et al* ont défini une population de cellules tumorales stationnaires et à l'opposé une autre population de cellules invasives. Leur étude a montré un enrichissement des voies de signalisation

de TGFB, le récepteur de l'ephrin, et la voie Wnt/ β -catenin dans les cellules migratrices. De l'autre côté, la signature stationnaire se caractérisait par une surreprésentation des gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés (Demuth et al., 2008). Une étude *in vivo* a été effectuée sur des GBM humains obtenus après exérèse totale ou subtotale, sur lesquelles la masse tumorale centrale et le front migratoire ont été séparés par microdissection laser. Selon cette étude, les cellules invasives expriment plus de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire (*SPOCK* ou *sparc/osteonectin*), la transduction des signaux extracellulaires (*EFNB3/ephrin B3*, *EGFR*, *FGFR3...*) et le réarrangement du cytosquelette (*INA*, *EMAP2* etc.). De l'autre côté, les cellules prolifératrices de la masse tumorale expriment fortement des facteurs de transcription liés à la croissance cellulaire (*ZNF258*, *EYA2* ...) ainsi que des gènes impliqués dans l'angiogenèse (*VEGF*, *VCAM1*). Elles expriment aussi des gènes liés à la résistance aux médicaments (*ABCC3*) (Hoelzinger et al., 2005).

De même, la doublecortine et les micro-ARNs ont été associés à l'invasion des glioblastomes. La doublecortine permet la polymérisation et la stabilisation des microtubules au cours de la migration et les micro-ARNs comme MiR-10b facilitent le remodelage de la matrice extracellulaire *via* l'augmentation de l'expression des métalloprotéinases (Ortensi et al., 2013).

En somme, ces études montrent que les cellules invasives de glioblastomes présentent un profil d'expression génique et des mécanismes moléculaires différents de ceux des cellules stationnaires. Ces mécanismes permettent aux cellules invasives d'interagir plus avec la matrice extracellulaire au cours de la migration.

2.2- Les migrations individuelle et collective

2.2.1- Généralités sur la migration individuelle

La migration cellulaire est un processus fondamental nécessaire pour l'organisation tissulaire et l'homéostasie. Plusieurs types de mouvements individuels sont adoptés par les différentes cellules comme celui dit « amibe-like » connu chez les leucocytes ou le déplacement par glissement rencontré chez d'autres types cellulaires. Néanmoins, un modèle classique de mouvement cellulaire est celui de la migration individuelle des fibroblastes dans un environnement bidimensionnel. Les modèles de

la migration individuelle ont servi de base pour l'élaboration du paradigme actuel décrivant les mécanismes de la migration cellulaire.

La migration individuelle a lieu en absence de cohésion intercellulaire et de jonctions cellule-cellule stables. Au cours de la migration, la cellule présente une polarité correspondant à une asymétrie entre son front et son arrière. Au cours du déplacement, le front pointe vers la direction de la migration ; la polymérisation du cytosquelette d'actine guide les projections membranaires et la formation des plaques d'adhésion focale les attachent à la matrice extracellulaire (MEC). De façon concomitante, la dépolymérisation des microfilaments d'actine accompagnée du détachement des plaques d'adhésion focale à l'arrière de la cellule permettent sa rétraction et l'avancement du corps cellulaire.

Au niveau moléculaire, une vaste littérature décrit les mécanismes de la migration cellulaire individuelle. Premièrement, le contrôle spatio-temporel de la polymérisation/dépolymérisation de l'actine, nécessaire à la formation des lamellipodes et filopodes et à la rétraction de l'arrière de la cellule, est médié par les GTPases Rac et CDC42. Rac1 et CDC42 activent d'une part les formines, et d'autre part le complexe Arp2/3, régulant ainsi la nucléation et la polymérisation des filaments d'actine (Sit and Manser, 2011). De même, la contraction acto-myosine est sous le contrôle des GTPases Rac, CDC42 et RhoA. RhoA active Rho-Kinase qui phosphoryle et inactive la phosphatase, qui déphosphoryle MLC augmentant ainsi la contractilité. CDC42 agit similairement mais en activant MRCK. Au contraire, Rac active PAK qui à son tour phosphoryle et inactive la kinase MLC aboutissant à une diminution de la contractilité tout en favorisant l'adhésion (Vicente-Manzanares et al., 2005).

La dynamique d'assemblage/désassemblage des adhésions focales et l'interaction avec la MEC jouent un rôle clé dans la migration cellulaire. Cette thématique sera détaillée dans le chapitre suivant.

D'un autre côté, le contrôle de la persistance directionnelle au cours de la migration est essentiel aussi bien dans des conditions physiologiques que physiopathologiques. La polarité cellulaire est déterminée par le positionnement du noyau et la réorientation de l'appareil de Golgi et du centre d'organisation des microtubules (MTOC) vers le front migratoire. A ce niveau aussi, CDC42 intervient en

régulant le positionnement du MTOC via les protéines Par et PKC ζ (Vicente-Manzanares et al., 2005). Il a été montré que l'interaction avec la MEC au niveau du front cellulaire *via* les intégrines permet le recrutement polarisé de CDC42 et son activation, aboutissant par la suite à l'activation du complexe mPar6/PKC ζ . Cette activation localisée est nécessaire pour l'induction de la polarité par l'intermédiaire de la protéine motrice associée aux microtubules appelée la dynéine (Etienne-Manneville and Hall, 2001). La protéine Kif1C joue un rôle important dans la maturation des plaques d'adhésion focale au niveau de l'arrière cellulaire permettant une résistance à la rétraction et augmentant la stabilité directionnelle des cellules migratrices. Ceci se déroule *via* le transport des intégrines $\alpha 5\beta 1$ par Kif1C le long des microtubules afin de renforcer l'adhésion à la MEC (Theisen et al., 2012). De plus, le positionnement polarisé des mitochondries entre le noyau et le front migratoire est corrélé à l'invasion et à l'augmentation de la persistance directionnelle des cellules cancéreuses épithéliales (Desai et al., 2013).

2.2.2- Généralités sur la migration collective

Ces dernières années, d'autres formes de migration cellulaire ont été décrites et caractérisées. Peter Friedl, un des pionniers dans ce domaine, a parfaitement classifié ces modes de migration. Ainsi, en plus de la migration cellulaire individuelle classique, quatre types différents de modes migratoires ont été définis: la diffusion multicellulaire, la migration collective, le repliement tissulaire et la croissance expansive (Fig. 6) (Friedl et al., 2012). Notre travail portera principalement sur la migration collective.

Les mécanismes impliqués dans la migration collective commencent à être dévoilés. Certains aspects sont similaires à ceux rencontrés au cours de la migration individuelle, mais d'autres sont exclusifs à la migration collective. La plupart des notions mécanistiques ont été obtenues en étudiant la migration collective des cellules folliculaires au cours de l'oogenèse de la drosophile *D. melanogaster* et des cellules de la ligne latérale chez le poisson zèbre *D. rerio*. Cependant, ces mécanismes restent largement inconnus au cours de l'invasion tumorale. L'évidence indirecte de l'invasion collective des cellules tumorales est apparente sur les lames histopathologiques analysées aux laboratoires. Les progrès dans les techniques

d'imagerie *in vivo* et en temps réel devraient permettre d'examiner directement ces événements dans un futur prochain (Friedl and Gilmour, 2009).

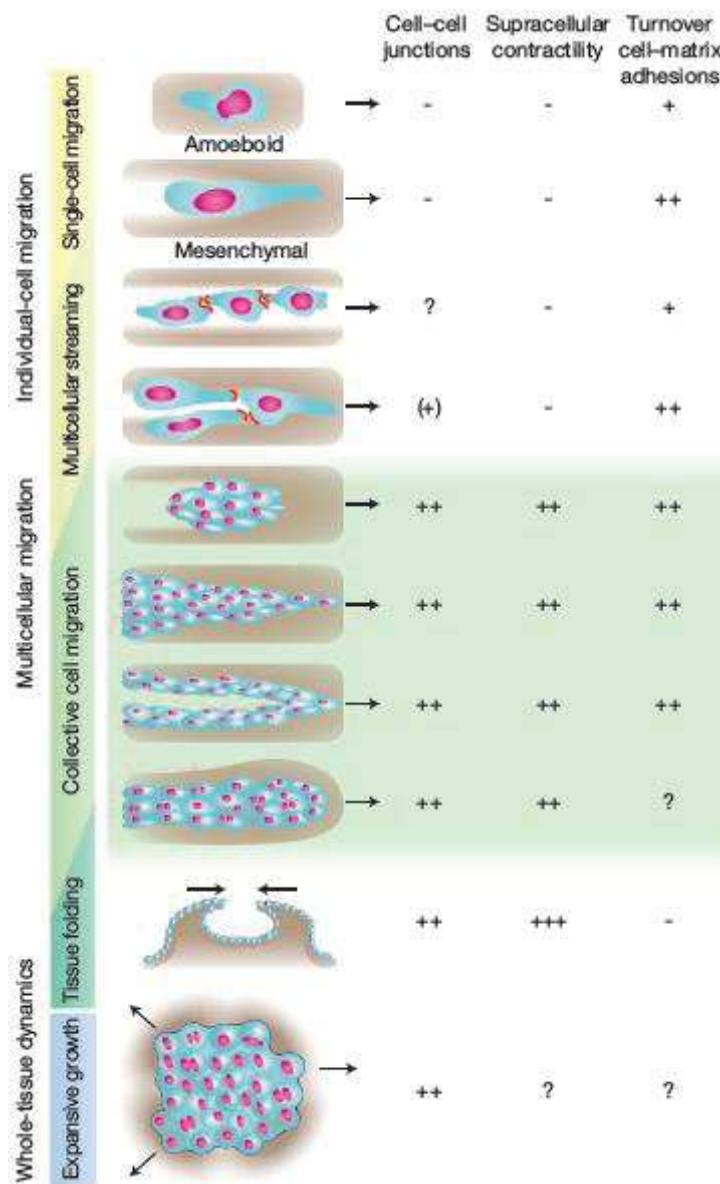


Figure 6. Les différents types de modes migratoires adoptés par les cellules cancéreuses. Ces modes incluent: la migration individuelle, la diffusion multicellulaire, la migration collective, le repliement tissulaire et la croissance expansive (d'après Friedl. P (Friedl et al., 2012).

La migration collective se caractérise par trois marques distinctives : (1) une cohésion intercellulaire maintenue au cours de la migration par l'intermédiaire des jonctions cellule-cellule. (2) la mise en place d'une polarité avant-arrière et l'organisation « supracellulaire » du cytosquelette d'actine permettant aux différentes cellules de former une seule entité coordonnée lors de la migration. (3) la

modification structurale du tissu le long du trajet migratoire (Friedl and Gilmour, 2009).

1- La cohésion intercellulaire au cours de la migration collective est assurée par plusieurs types de jonctions. Ces jonctions peuvent être des jonctions adhérentes comprenant principalement les cadhérines, des desmosomes, des jonctions gap, des jonctions serrées et des jonctions formées par les intégrines (Fig. 7) (Ilina and Friedl, 2009). Nous décrivons principalement les jonctions adhérentes dans ce travail.

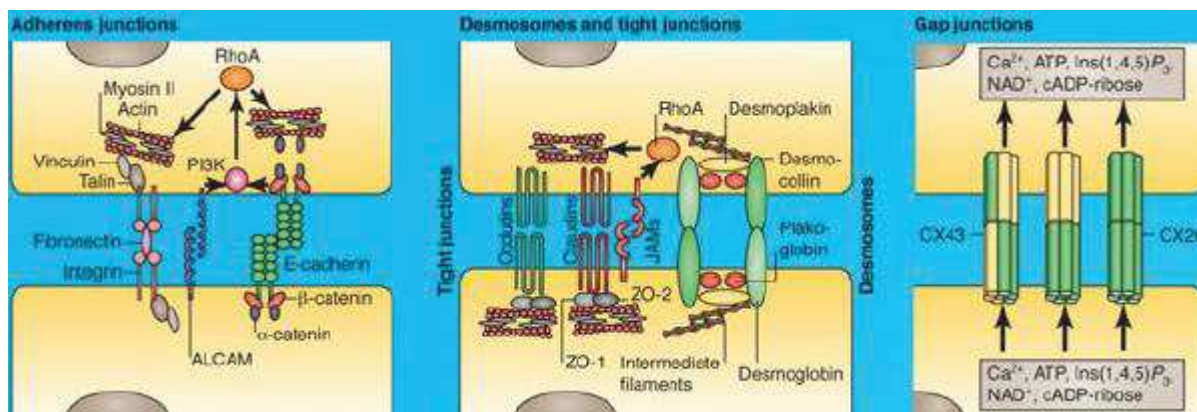


Figure 7. Le maintien de la cohésion intercellulaire au cours de la migration collective. Ces interactions cellule-cellule sont médiées par des jonctions adhérentes, des desmosomes, des jonctions serrées, des jonctions gap et par des intégrines (d'après Ilina, O et Friedl, P, (Ilina and Friedl, 2009)).

Les jonctions adhérentes de type cadhérine-caténine sont homophiliques. A l'intérieur de la cellule, la partie cytoplasmique de la cadhérine interagit directement avec la β -caténine et la caténine p120 et indirectement avec la α -caténine (Fig. 7). Cette dernière établit le lien physique avec le cytosquelette d'actine (Niessen, 2007). L'adhésion cellule-cellule et le couplage avec le cytosquelette d'actine au cours de la migration collective sont médiés selon le type cellulaire par différentes cadhérines telles que la E-cadhérine épithéliale, la N-cadhérine neurale et la VE-cadhérine endothéliale (Friedl and Gilmour, 2009). Il a été démontré récemment sur des astrocytes primaires de rats en migration collective, que les jonctions adhérentes de type N-cadhérine subissent un mouvement ressemblant à celui d'un tapis roulant le long des cotés latéraux des cellules adjacentes. Ce mouvement rétrograde est dépendant de l'actine et est dû à un recyclage polarisé des jonctions N-cadhérine à l'arrière des cellules contrôlé par la caténine p120 et la kinase GSK3 (Hirata et al., 2014; Peglion et al., 2014).

2- En plus de la cohésion intercellulaire, les jonctions cellule-cellule jouent un rôle prépondérant dans la formation de la structure « supracellulaire » et l'acquisition de la polarité au sein de la migration collective. Cette polarité avant-arrière correspond à une répartition hiérarchique des cellules. Les cellules dites « leaders » se situent à l'avant et exercent une force de traction qui permet de tirer les cellules qui leur font suite et qui sont dites « followers » (Fig. 8) (Reffay et al., 2014). En étant du côté frontal, les cellules « leaders » reçoivent les signaux extracellulaires et guident la migration. Elles ont une morphologie mésenchymateuse avec des lamellipodes et des filopodes tandis que les cellules « followers » sont rondes et en rosettes (Fig. 8). Cette asymétrie résulte probablement d'une expression différente des récepteurs de chimiokines CXCR4 et CXCR7 (Friedl and Gilmour, 2009). De plus, dans une étude élégante, Yamaguchi, N. *et al* ont démontré sur les cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney) que l'intégrine $\beta 1$, Rac et PI3K sont localisés exclusivement au niveau de la partie frontale des cellules « leaders » et pas dans les cellules « followers ». En effet, l'intégrine $\beta 1$ et PI3K régulent l'activité de Rac indépendamment au niveau des cellules « leaders » et jouent un rôle clé dans l'établissement de la migration collective (Yamaguchi et al., 2015).

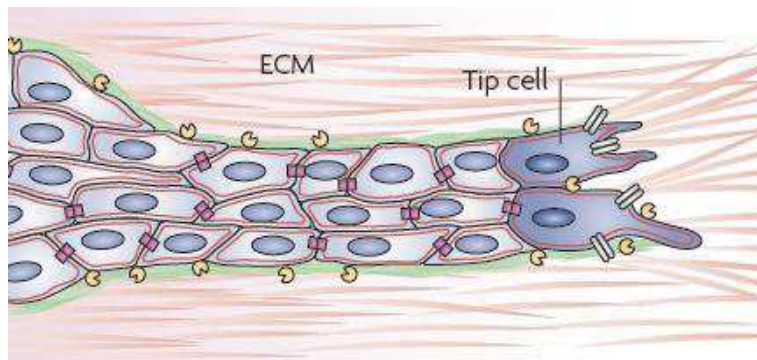


Figure 8. La répartition hiérarchique au cours de la migration collective. Les cellules leaders (Tip cell) et cellules followers lors de l'invasion collective des cellules cancéreuses (d'après Friedl, P et Gilmour, D, (Friedl and Gilmour, 2009)).

3- Finalement, la progression spatiale de la migration collective nécessite un remodelage de la MEC. Dans des microenvironnements *in vivo* et *in vitro* riches en fibronectine, laminine, acide hyaluronique ou collagène, les cellules produisent et sécrètent des métalloprotéinases pour créer des passages de moindre résistance. Alternativement, ces groupes cellulaires avancent le long de certaines structures

anatomiques n'exerçant pas d'entrave physique comme au niveau de la membrane basale entourant les vaisseaux sanguins (Friedl and Gilmour, 2009).

2.2.3- Le mode migratoire des cellules de glioblastomes

Malgré le rôle connu de l'invasion tumorale dans la récurrence et la malignité des glioblastomes, les études examinant le type de migration des cellules invasives sont remarquablement rares. La migration des cellules de glioblastomes a été initialement décrite comme une migration mésenchymateuse et individuelle (Friedl and Wolf, 2003). Conjointement, Lefranc, L. *et al* ont montré dans leurs travaux que les cellules tumorales de gliomes migrent individuellement au cours de l'invasion du tissu cérébral tout en développant des mécanismes leur permettant de résister à l'apoptose (Lefranc et al., 2005).

Toutefois, suite aux avancements des travaux caractérisant les mécanismes de la migration collective, ce mode de migration devint de plus en plus étudié dans les glioblastomes. Ainsi, Serres, E. *et al* (Serrels et al., 2007) ont démontré que les interactions cellule-MEC régulent le mode migratoire des glioblastomes. En utilisant les lignées cellulaires de GBM U-87, U-118 et U-138, les auteurs ont montré que les cellules migrent collectivement dans le matrigel et sécrètent d'une façon autocrine de la fibronectine. La fibronectine extracellulaire augmente la cohésion intercellulaire et favorise donc la migration collective des cellules invasives quittant les sphéroïdes. Par contre, les cellules dans lesquelles l'expression de la fibronectine a été réduite *via* des ARNs interférents continuaient à migrer mais se détachaient des autres cellules adjacentes et migraient individuellement. De façon remarquable, ces cellules individuelles migrent d'une façon plus efficace que les cellules contrôles sur des cultures 2D et l'inhibition de l'interaction entre la fibronectine et son récepteur cellulaire $\alpha 5\beta 1$ augmente leur migration à partir de sphères (Serrels et al., 2007). De même, une autre étude *in vitro* a mis en évidence le rôle de la fibronectine extracellulaire dans la cohésion des cellules de glioblastomes. En effet, les auteurs ont montré que le ralentissement de la vitesse de migration des cellules U-87 induit par l'ajout du dexaméthasone est dû à l'augmentation de la cohésion intercellulaire médiée par la fibronectine (Foty, 2013). Ces études montrent donc que l'expression de la fibronectine au sein de la MEC favorise la migration collective des cellules de glioblastomes.

Dans ce même contexte, Herrera-Perez *et al* ont démontré que le mode migratoire des cellules souches de glioblastome dépend des caractéristiques biochimiques et mécaniques de la MEC. En effet, sur une matrice composée de 75 % ou 100 % de matrigel, les cellules se déplacent selon une migration multicellulaire par croissance expansive. Par contre, sur des matrices constituées de collagène de type I ou d'un mélange de collagène et d'acide hyaluronique, les cellules souches de glioblastome migrent individuellement. Afin de tester l'importance de la topographie sur le mode migratoire des glioblastomes, les auteurs ont utilisé des microfibrilles revêtues de matrigel, d'acide hyaluronique et de collagène. Leurs résultats montrent que les cellules souches de glioblastome migrent collectivement sur les microfibrilles tout en conservant la cohésion intercellulaire médiée par les N-cadhérines (Herrera-Perez et al., 2015).

En plus des interactions cellule-MEC, les interactions cellule-cellule jouent un rôle important dans la migration collective des glioblastomes. Ainsi, il a été démontré que la connexine 43 constituant les jonctions gap joue un rôle prépondérant dans la migration collective des cellules U-118 de GBM. En effet, les auteurs ont montré sur un modèle tridimensionnel de neurosphères en migration sur de la fibronectine, qu'en inhibant la connexine 43, les cellules U-118 changent leur mode migratoire et passent d'une migration collective à une migration individuelle. De même, l'inhibition de la connexine 43 active la migration en diminuant les interactions des cellules avec la matrice extracellulaire (Aftab et al., 2015).

Martinez-Gonzalez, A. *et al* ont développé un modèle pour simuler *in vitro* la formation des migrations collectives que l'on retrouve au sein des pseudopalissades hypoxiques. Dans ce modèle, les auteurs ont analysé la migration des cellules de GBM entre un vaisseau sanguin thrombotique oblitéré et un autre fonctionnel. En conséquence, les cellules migrent de la région appauvrie en oxygène vers la région mieux approvisionnée en formant des vagues de migration collective rappelant les pseudopalissades observés autour des zones nécrotiques dans les tumeurs humaines. Cette simulation a permis de déterminer une corrélation entre la taille des palissades, leur temps de vie et la taille de la zone nécrotique. Les auteurs ont également signalé que ces pseudopalissades avaient une vitesse d'invasion plus importante que d'autres mouvements plus aléatoires indiquant ainsi leur implication dans la progression rapide des glioblastomes (Martinez-Gonzalez et al., 2012).

Bien que la capacité des cellules de glioblastomes à migrer collectivement *in vitro* ait été démontrée, peu de données sont disponibles sur l'existence de ce mode migratoire *in vivo*. Néanmoins, les nouveaux travaux de Peter Friedl basés principalement sur de l'imagerie vitale à haute résolution ont mis en évidence la migration collective des glioblastomes à l'intérieur du cerveau. En effet, au cours de l'invasion, les cellules de GBM restent connectées les unes aux autres et forment un réseau dit « neuronal-like » ou filamenteux (Friedl and Mayor, 2017). A l'évidence, le mode migratoire des glioblastomes dépend de l'environnement dans lequel les cellules migrent. Ainsi, la migration filamenteuse est observée au sein du parenchyme cérébral où les espacements de la matrice extracellulaire sont étroits et où il y a une impossibilité de former des agrégats cellulaires larges. Dans ces conditions, les cellules « s'embrassent » sans former des jonctions fortes dites « épithéliales ». Au contraire, dans l'espace périvasculaire, les cellules de glioblastomes s'associent par l'intermédiaire de jonctions ressemblant aux jonctions épithéliales et se déplacent collectivement en formant des agrégats (Travail non publié, présenté par Peter Friedl lors du sixième congrès « integrated mechano-chemical signals in invasion, 2015).

2.3- La migration amiboïde et mésenchymateuse des glioblastomes

Les cellules de glioblastomes migrent *in vivo* en utilisant un mode de migration de type mésenchymateux. Ce mode migratoire a également été décrit sur des matrices 3D constituées de collagène et sur des cultures organotypiques (Friedl and Wolf, 2003). En revanche, la migration amiboïde n'a été décrite que dans des conditions *in vitro* (Friedl and Wolf, 2003; Weeks et al., 2012). Ce type de mouvement ne nécessite pas une adhésion forte à la MEC et est indépendant des intégrines (Tableau 2). Le mouvement est généré principalement par les filaments d'actine corticaux alors que les contacts focaux et l'activité protéolytique sont absents (Tableau 2). Au contraire, la migration mésenchymateuse nécessite l'adhésion des intégrines à la MEC et dépend des forces de traction générées au sein des cellules (Tableau 2) (Friedl and Wolf, 2003).

Tableau 2. Les caractéristiques des migrations amiboïde et mésenchymateuse (d'après Friedl. P et Wolf. K, (Friedl and Wolf, 2003)).

Characteristic	Mesenchymal	Amoeboid
Cell shape	Elongated, fibroblast-like (length 50–200 μm)	Roundish/elliptoid (length 10–30 μm)
Growth in culture	Adhesive	Growth in suspension
Migration velocity	Low (0.1–1 $\mu\text{m}/\text{min}$)	Low to high (0.1–20 $\mu\text{m}/\text{min}$)
Cell-matrix interactions	Integrins and proteases focalize	Integrins and proteases are non-focalized
Structure of actin cytoskeleton	Cortical and stress fibres	Cortical
Adhesion force generated	High, fibre pulling and bundling	Low, minor fibre bending
Proteolytic extracellular-matrix remodelling	Present to extensive	Not present
Cellular migration mechanism	Traction dependent	Propulsive, cytoplasmic streaming
Mechanism overcoming matrix barriers	Path generation, formation of proteolytic ECM defects	Path finding, propulsion and cytoplasmic forward flow ('streaming'); squeezing through narrow regions (constriction ring)
Prototypic non-neoplastic cell	Fibroblast, smooth-muscle cell	Lymphocyte, neutrophil
Neoplastic cells, carcinoma	Fibrosarcoma, glioblastoma, dedifferentiated epithelial cancer	Lymphoma, small-cell lung carcinoma, small-cell prostate cancer

Au cours de la migration mésenchymateuse dans un environnement tridimensionnel, les cellules de GBM forment des extensions fines et larges appelées lamellipodes desquelles partent des protrusions d'une taille allant jusqu'à 50 μm dites filopodes. La migration mésenchymateuse se déroule en cinq étapes (Fig. 9). 1- Une protrusion se forme au niveau frontal et se prolonge à la suite de la polymérisation des microfilaments d'actine. Des protéines adaptatrices comme ARP2/3 et WASP facilitent la polymérisation de l'actine et l'attachent à la face interne de la membrane cytoplasmique *via* les phosphoinositides PIPs. A leur tour, les PIPs régulent l'activité des GTPases RAC et CDC42 induisant la formation des filopodes et des pseudopodes. 2- La deuxième étape correspond à la formation de plaques d'adhésion focale après l'interaction des intégrines membranaires avec la matrice extracellulaire. Du côté cytoplasmique, les intégrines interagissent avec des protéines telles que FAK, talin, α -actinin et tensin. Talin recrute vinculin et d'autres protéines liant les microfilaments d'actine et instaure un lien entre le cytosquelette et les points d'adhésion focale. 3- L'étape suivante se caractérise par la production et la sécrétion des protéases qui clivent les composants de la matrice extracellulaire. Les plus connus sont les métalloprotéinases MMP2 et 9. 4- Ensuite, la kinase myosine light-chain MLCK phosphoryle et active la myosine II qui se fixe sur l'actine et génère des contractions permettant au corps cellulaire d'avancer. 5- Enfin, la protéase calpaine clive certains composants des plaques d'adhésion focale comme talin et la

queue cytoplasmique de l'intégrine $\beta 1$ à l'arrière de la cellule. En même temps, gelsoline et cofiline induisent la cassure des filaments d'actine ce qui induit la rétraction de l'arrière cellulaire (Friedl and Wolf, 2003).

Le mode de migration des glioblastomes dans le cerveau dépend remarquablement de l'environnement dans lequel les cellules migrent. Par exemple, à l'intérieur de l'espace périvasculaire et le long des fibres de la matière blanche (corps calleux), les cellules ne rencontrent pas de résistance à leur avancement imposée par l'espacement et la taille des pores de la matrice extracellulaire. Dans ces environnements, les cellules de GBM forment des lamellipodes et ont une migration mésenchymateuse de type fibroblastique au cours de laquelle le noyau avance constamment sans aucun obstacle. En revanche, au sein du parenchyme cérébral (neuropil) composé de corps cellulaires neuronaux et de leur ramifications dendritiques et axoniques en association avec les cellules gliales, les espacements de la matrice extracellulaire sont de l'ordre du sous-micromètre. Dans ces conditions, les cellules de GBM ne peuvent plus utiliser le mode fibroblastique caractérisé par la formation d'un lamellipode large et passent à un mode de migration semblable à celui des progéniteurs neuronaux. Elles se contractent *via* la myosine II, permettant au noyau de s'insinuer et d'avancer selon un mode saltatoire dans des pores de diamètre plus faible (Beadle et al., 2008).

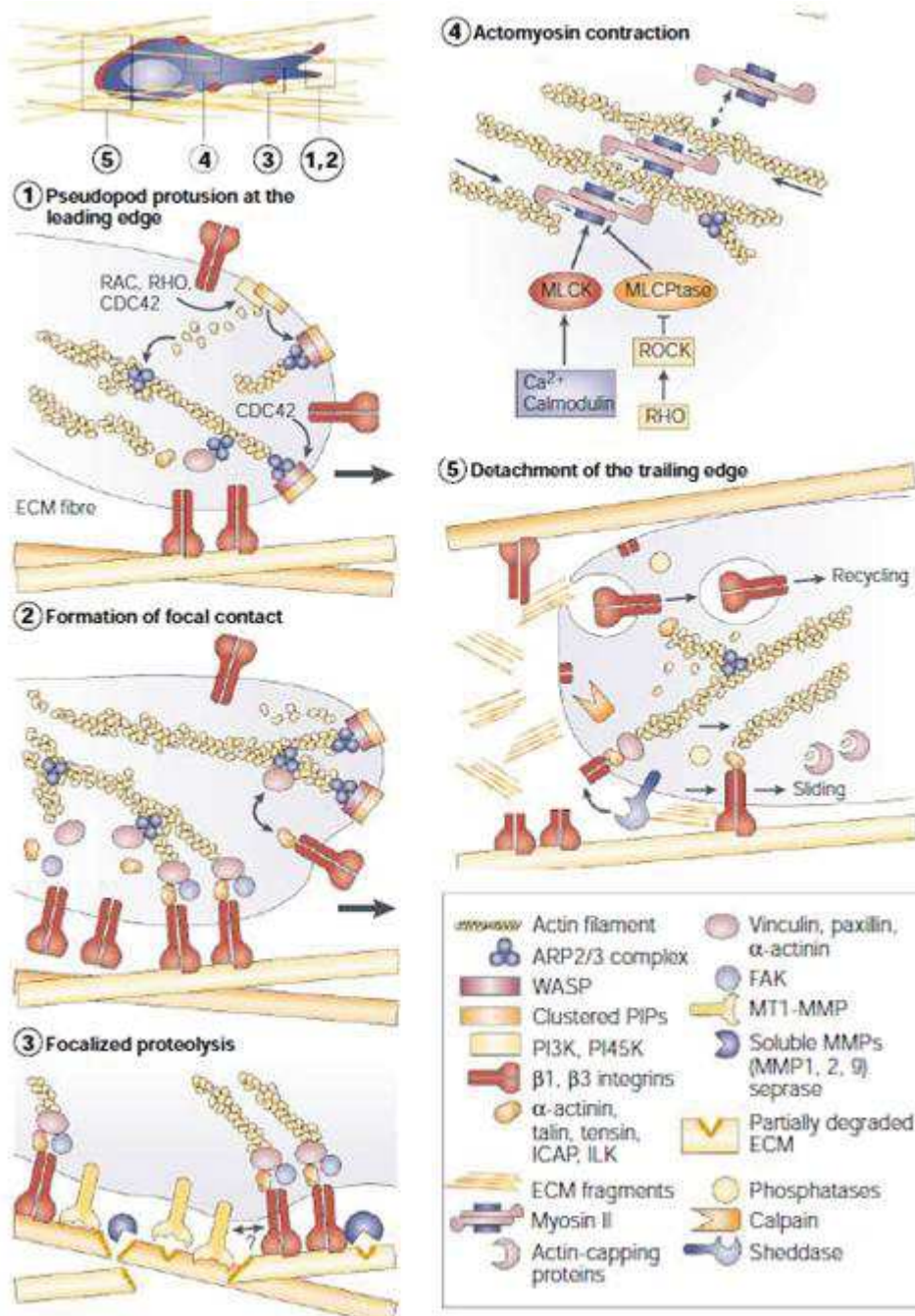


Figure 9. Le modèle en cinq étapes de la migration mésenchymateuse. (1) Formation des pseudopodes au niveau du front de la cellule migratoire. (2) Formation des plaques d'adhésion focale. (3) Dégradation protéolytique de la MEC. (4) Génération de la force de contraction actomyosine. (5) Détachement de l'arrière de la cellule migratrice (d'après Friedl. P et Wolf. K, (Friedl and Wolf, 2003)).

Chapitre 3

La matrice extracellulaire et son rôle dans la progression des glioblastomes

1- La matrice extracellulaire/le matrisome

1.1- Définition

La matrice extracellulaire (MEC) englobe l'ensemble des macromolécules synthétisées par les cellules et sécrétées dans leur environnement. Ces macromolécules s'assemblent, se réticulent et se polymérisent afin d'établir une structure organisée et indispensable au développement des tissus et organes des organismes multicellulaires (Zent and Pozzi, 2010). La MEC se présente sous deux types majeurs : péricellulaire en contact proche et étroit avec les cellules, telle que les membranes basales ; ou interstitielle entourant les cellules. La membrane basale est présente dans tous les organes et sépare le parenchyme du tissu conjonctif sous-jacent. Elle constitue une couche permettant l'ancrage des cellules parenchymateuses et maintient donc l'intégrité du tissu. Elle est composée de collagène de type IV, laminine, nidogène 1 et 2, fibuline, dystroglycane et des protéoglycanes perlécane, agrine et collagène type XV et XVIII (Fig. 10). La matrice interstitielle se trouve dans les tissus conjonctifs et est constituée d'une variété de collagènes, élastines, fibronectine, ténaescines, protéoglycanes et acide hyaluronique (Fig. 10) (Karamanos, 2012).

La MEC a longtemps été considérée comme un support mécanique soutenant les tissus et les organes. Cependant, durant les dernières décennies, elle a été reconnue comme une structure dynamique régulant le comportement cellulaire en fournissant des signaux biochimiques et mécaniques. Ces signaux sont reçus et

intégrés par la cellule *via* un ensemble de récepteurs membranaires comprenant des intégrines, des protéoglycanes, CD44 (récepteur à l'acide hyaluronique), récepteurs à domaine discoïdine et autres. La MEC est aussi un réservoir de facteurs de croissance et cytokines qui sont distribués aux cellules de manière spatio-temporelle. L'ensemble de ces signaux régulent et affectent l'expression génique, la prolifération, l'adhésion, la migration, la survie et la différenciation des cellules (Karamanos, 2012).

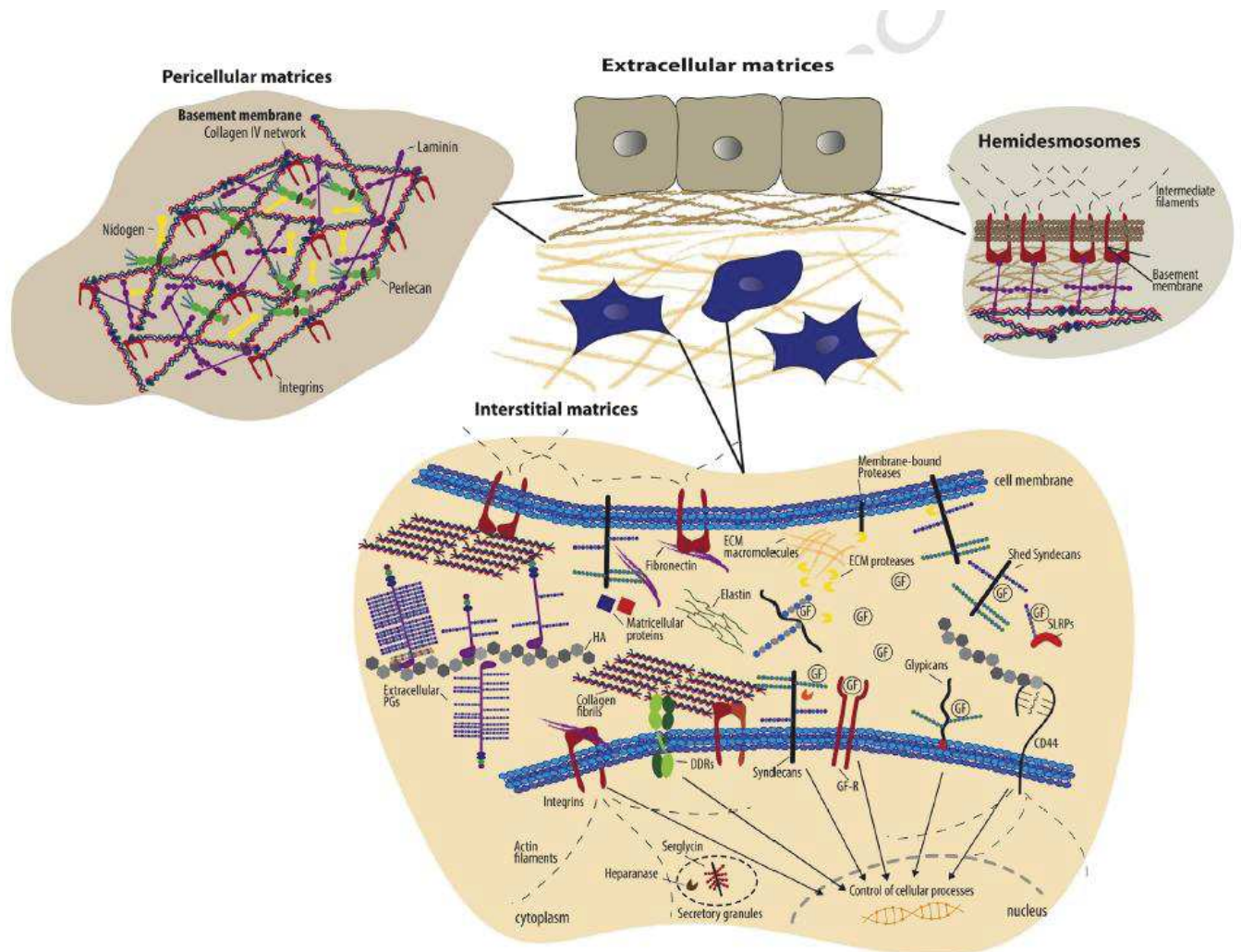


Figure 10. Représentation Schématique des matrices extracellulaires. Cette représentation inclue leur composition et les principaux récepteurs cellulaires (d'après Theocharis. AD et al, (Theocharis et al., 2016).

1.2- Composition biochimique de la matrice extracellulaire

La caractérisation structurale et biochimique des composants de la MEC a toujours été contraignante à cause de leur nature insoluble et réticulée. Il a fallu attendre l'avancement des techniques de séquençage génomique et de spectrométrie de

masse pour définir un répertoire complet des protéines de la MEC ou matrisome. Ce matrisome dit « fondamental » contient 300 protéines constituant 1 % à 1.5 % du protéome des mammifères, dont 43 sous-unités de collagène, une trentaine de protéoglycanes et environ 200 glycoprotéines. Ces protéines présentent en commun des répétitions de certains domaines comme LamG, TSPN, FN3, VWA, Ig, EGF, collagène pro-domaines, etc. Certains de ces domaines sont anciens et d'autres sont nouvellement apparus au cours de l'évolution. Une autre caractéristique remarquable des protéines du matrisome est l'augmentation du nombre d'homologues liée à la diversification au cours de l'évolution expliquant ainsi la présence de plusieurs types de collagènes et de laminines notamment. En revanche, le matrisome ne contient pas de lectines sécrétées, de galectines, de protéases et enzymes dégradant la matrice ou impliquées dans sa réticulation, ni de facteurs de croissance et cytokines capables de se lier à certains composants de la MEC. Deux banques de données contenant entre autres des informations sur l'expression et la distribution des protéines de la MEC ont été créées : « the Matrixome Project » maintenu par Kiyotoshi Sekiguchi et « Human Protein Atlas ». Un troisième projet collectant des informations sur les interactions entre ces protéines est « Matrix DB » (Hynes, 2002). Les différentes macromolécules constituant la MEC et décrites par Theocharis. AD et al (Theocharis et al., 2016) sont :

- Les protéoglycanes

Les protéoglycanes (PG) font partie des bio-macromolécules les plus importantes aux niveaux structural et fonctionnel. Ils sont formés d'un cœur protéique sur lequel s'accroche d'une façon covalente un ou plusieurs glycosaminoglycanes (GAG). Les GAG sont de longs hétéropolysaccharides chargés négativement contenant des répétitions disaccharidiques composées principalement d'héxosamines N-acétylés (N-acétyl-D-galactosamine ou N-acétyl-D-glucosamine) et d'acide L/D héxuronique (acide D-glucuronique ou acide L-iduronique). Il existe six types de GAG : galactosaminoglycanes chondroïtine sulfate (CS), dermatane sulfate (DS), glucosaminoglycanes HS, Hep, kératane sulfate (KS) et l'acide hyaluronique (AH). L'acide hyaluronique est le seul GAG qui n'a pas de cœur protéique. Les PGs peuvent être extracellulaires (aggrécane, versicane, neurocane, brévicane, décorin, fibromodulin et biglycane), péricellulaires (agrine, perlécane), ancrés dans la membrane cellulaire (syndécane, bétaglycane, phosphacane, CSPG4 et glypicane)

et intracellulaires (séruglycine) (Fig. 11). Les PGs régulent la prolifération, la migration, la différenciation, l'adhésion et l'apoptose *via* principalement leurs chaînes de GAG.

- *Le collagène*

Le collagène est la protéine fibreuse la plus abondante dans l'espace interstitiel et péricellulaire et constitue jusqu'à 30 % des protéines totales chez l'homme. La superfamille des collagènes contient 28 types différents formés à partir d'au moins 46 chaînes polypeptidiques α distinctes chez les vertébrés. Chaque molécule de collagène est constituée de trois hélices α surenroulées les unes sur les autres. La biosynthèse du collagène est altérée lors du remodelage tissulaire au cours de la tumorigenèse.

- *La fibronectine*

La fibronectine (FN) est une protéine ubiquitaire de la MEC exprimée par une variété de types cellulaires et impliquée dans le développement des vertébrés. Elle est constituée de deux sous-unités d'environ 250 KDa liées ensemble par des ponts disulfures. Un seul gène code pour la FN, mais plusieurs variants existent à la suite de l'épissage alternatif. La forme fonctionnelle de la FN *in vivo* est fibrillaire, qui en s'assemblant forme une structure supermoléculaire de taille allant de 10 nm à quelques micromètres. *In vitro*, les cellules assemblent la FN en un réseau fibrillaire sur lequel elles s'attachent *via* les syndécanes ou les intégrines. Ces dernières reconnaissent spécifiquement les sites RGD (arginine, glycine, acide aspartique) et CS1 de la FN. La fibronectine est produite spécialement lors du développement embryonnaire et de la cicatrisation, et participe à la progression tumorale.

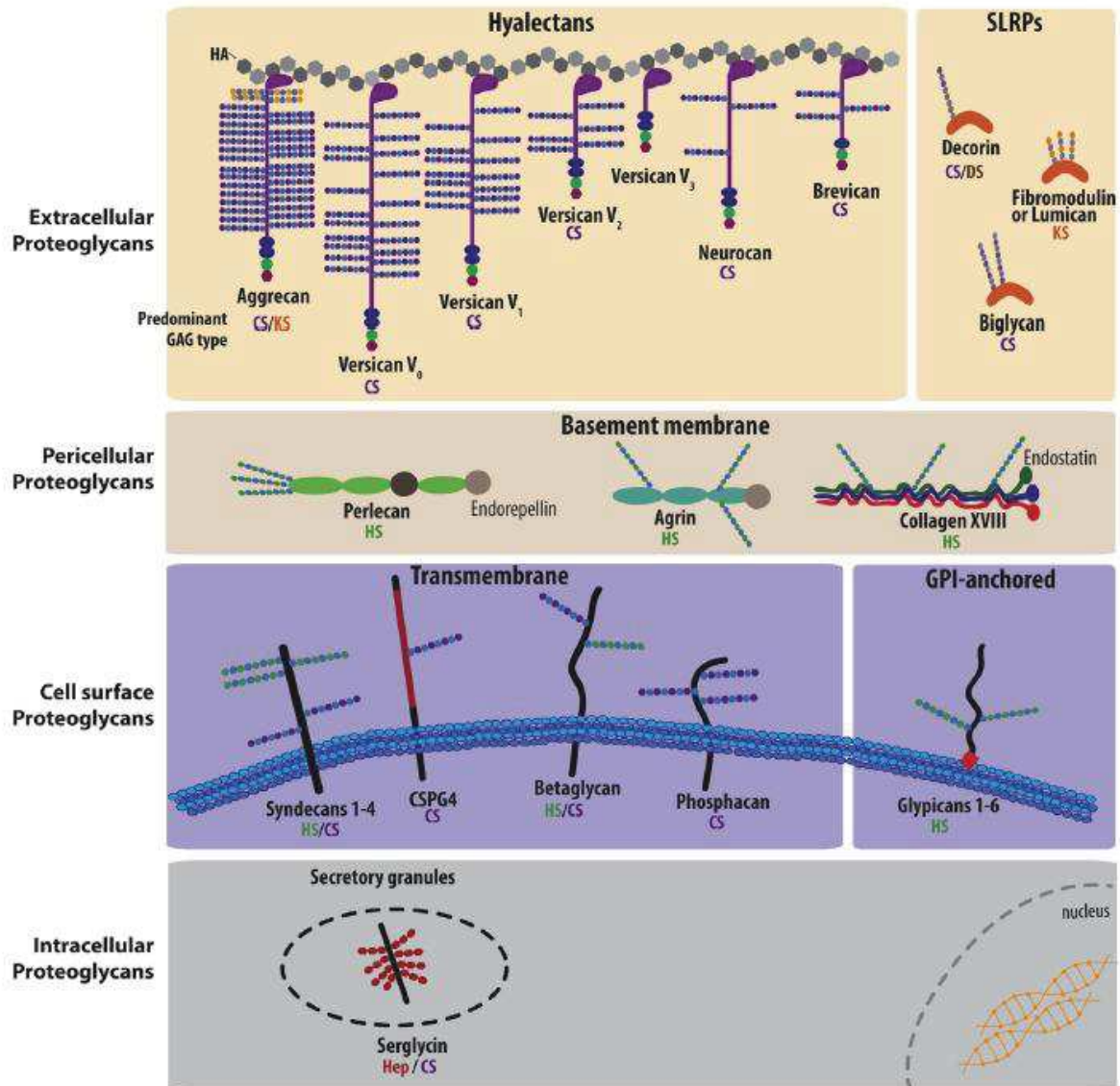


Figure 11. La classification des protéoglycans. Les PGs sont classifiés en fonction de leur localisation : extracellulaire, péricellulaire, à la membrane cytoplasmique et intracellulaire. Ils sont classés aussi en fonction de leur homologie aux niveaux protéique et génomique, et selon leur composition protéique (d'après Theocharis. AD *et al*, (Theocharis et al., 2016)).

- La laminine

La laminine (LN) est un hétérotrimère de chaînes α , β et γ (Fig. 12). Il existe cinq gènes α , trois β et trois γ chez les vertébrés. Alors que théoriquement 51 trimères peuvent exister, seulement 16 ont été décrits *in vivo*. Le nom de la laminine correspond à la numérotation de ses chaînes. Par exemple la laminine-111 contient les chaînes $\alpha 1$ $\beta 1$ et $\gamma 1$ (Fig. 12). Les molécules de LN possèdent des domaines globulaires du côté N-terminal des chaînes α , β et γ . Les chaînes β et γ se terminent par le domaine LCC responsable de la trimérisation de la molécule *via* des liaisons

disulfures, et la chaîne α se termine par cinq domaines globulaires (G region) (Fig. 12) sur lesquels se fixent les intégrines. La LN influence la différenciation, la survie, l'adhésion et la migration cellulaire.

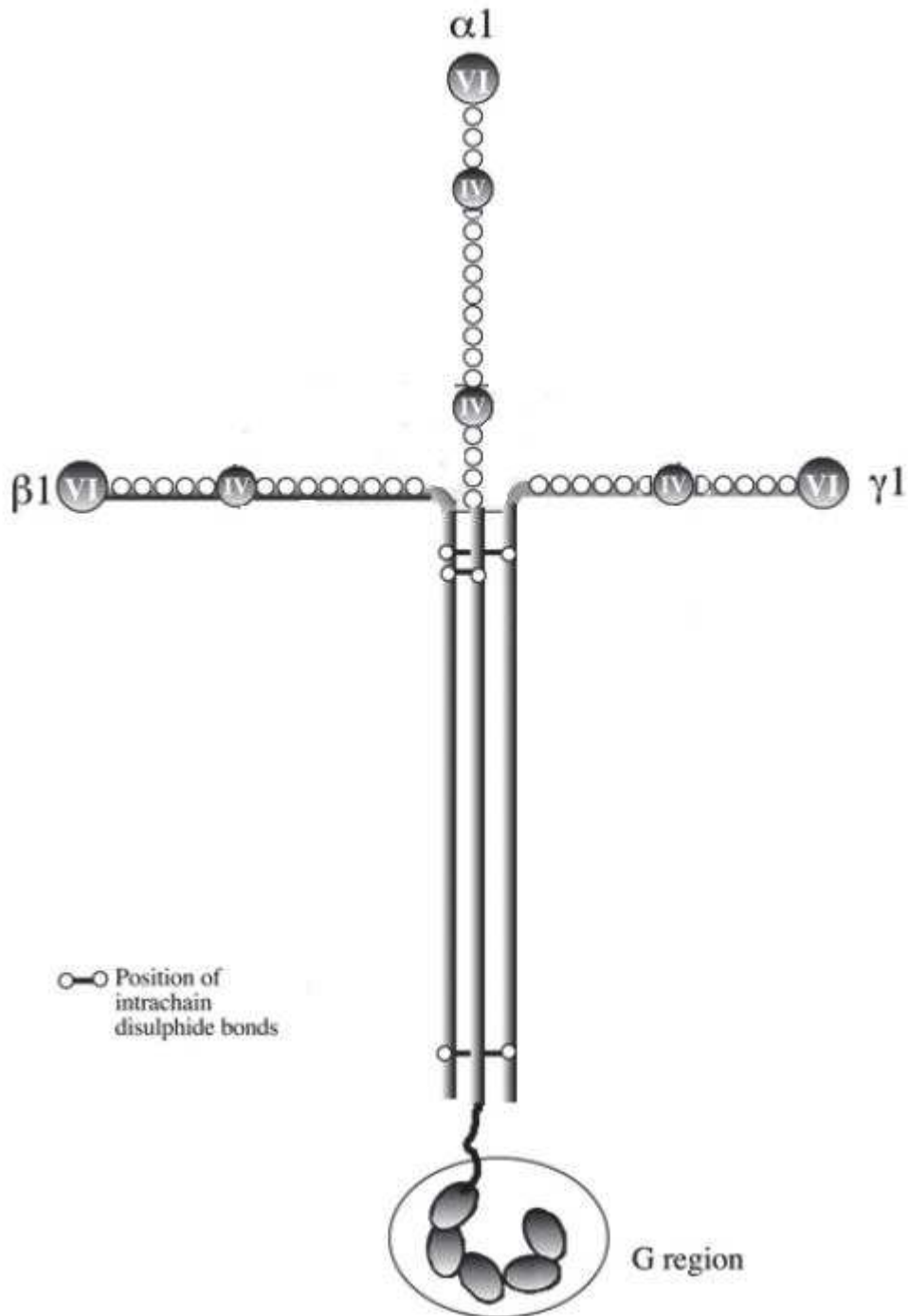


Figure 12. La structure de la laminine-111 (image modifié par rapport à la source, d'après (Nelson et al., 2008)).

- l'élastine

L'élastine est un polymère formé à partir d'un précurseur monomérique : la tropoélastine. Les fibres élastiques composées d'élastine et de microfibrilles se trouvent principalement dans les tissus qui reçoivent des étirements répétitifs comme les vaisseaux sanguins, la peau, le cœur et la vessie. Les fibres élastiques formées au cours du développement sont stables et se renouvellent peu ou très mal chez les adultes.

En plus de ces cinq familles de molécules, la MEC contient également des protéines non-structurales facilitant l'interaction cellule-cellule ou cellule-MEC et dites protéines matricellulaires comme la ténascine, la trombospondine, la périostine et la fibuline. Une surexpression aberrante de ces protéines est observée au cours de la croissance tumorale et notamment lors de la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT).

De plus, les protéases sont des composantes essentielles de la MEC jouant un rôle important dans son remodelage spécialement au cours de la formation des tumeurs. Ces protéases sont les métalloprotéinases, le système plasminogène/plasmin et les cathepsines. Les métalloprotéases sont les plus connues et sont réparties en six groupes: gélatinases, collagénases, stromelysines, matrilysines, MT-MMP et MMP. Elles sont produites par différentes cellules dont les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules cancéreuses et elles sont responsables de la dégradation de presque tous les composants de la MEC. Elles modulent ainsi l'interaction des cellules avec la MEC. Pour plus d'informations sur les différents composants biochimiques de la MEC, se référer à la revue de Theocharis AD.

1.3- Les aspects physiques et spatiaux de la matrice extracellulaire

En plus de la caractérisation de sa complexité biochimique, la dernière décennie a vu une avancée importante des connaissances concernant les aspects physiques et spatiaux de la MEC. Ces propriétés ont été largement décrites par Charras. G et Sahai. E, et Akhmanova. M *et al* (Fig. 13) (Akhmanova et al., 2015; Charras and Sahai, 2014). Les caractéristiques physiques et spatiales de la MEC ayant une relevance biologique sont :

- La rigidité

La rigidité ou l'élasticité d'une matrice est définie comme sa résistance à la déformation (strain) quand elle est soumise à une contrainte mécanique (stress) (Fig. 13). Le rapport entre la contrainte mécanique et la déformation élastique s'appelle le module de Young. Ce module décrit donc la rigidité d'une matrice.

Par exemple, une matrice élastique peut subir une déformation suite à l'application d'une force externe d'origine cellulaire. En réponse à cette pression, en revenant à sa position initiale, la matrice exerce une force sur la cellule. Ce signal intégré par la cellule induit une méchanotransduction qui module son activité. Ainsi, *in vitro*, les cellules souches mésenchymateuses se différencient en neurones ou cellules gliales sur des matrices souples ressemblant au tissu cérébral. A l'opposé, elles se différencient en adipocytes sur des matrices deux fois plus rigides et en ostéocytes sur d'autres plus rigides (Akhmanova et al., 2015). Toutefois, si après être soumise à une force mécanique, la matrice ne revient pas à sa position initiale, elle est dite plastique.

- La porosité, la taille des pores, le confinement et la perméabilité

Un pore est un espace vide présent entre les constituants d'une matrice (Fig. 13). La porosité d'un milieu poreux est une valeur définie comme le rapport entre le volume des vides contenus dans ce milieu et le volume total du milieu. Ceci correspond donc au volume de vides par unité de volume d'une matrice. En revanche, la taille des pores est liée à leur géométrie (diamètre, forme). L'adhésion et la migration cellulaire dépendent plus de la taille des pores que de la porosité (Akhmanova et al., 2015).

La taille des pores affecte la perception de l'environnement par la cellule. En effet, quand une cellule traverse un pore de diamètre supérieur au sien, seulement sa partie basale est en contact avec la matrice. Dans cette condition, la cellule a le même comportement que sur une surface plane 2D. Alors que si le diamètre est inférieur ou égal à son diamètre, les contacts cellule-MEC existent dans toutes les dimensions.

Un cas particulier de déplacement au sein d'une matrice, d'un tube ou d'un tunnel est la migration en sous-confinement. Dans ce type de migration et contrairement au mécanisme utilisé pour migrer sur une surface 2D ouverte, les cellules ne forment

pas de lamellipodes mais des filopodes et des protrusions membranaires en forme de bulles pour avancer indépendamment de RAC1 et ARP2/3 (Charras and Sahai, 2014). La contraction actomyosine joue un rôle important dans ce type de migration permettant à la cellule d'insinuer son noyau et corps cellulaire dans des espaces minuscules. La migration en sous-confinement joue un rôle fondamental au cours de la tumorigenèse.

De l'autre côté, la perméabilité d'une MEC définit l'accessibilité des petites molécules (hormones, nutriments), des molécules larges et des prolongements cellulaires (axones). La perméabilité affecte la survie cellulaire car une faible perméabilité se traduit par un manque de nutriments et d'oxygène.

La topologie de la surface

A cours de la migration, les cellules rencontrent deux types de surfaces possibles. Soit elles migrent sur une surface continue où les écarts entre les composants de la matrice sont négligeables par rapport à leur taille, soit sur une surface discontinue où ces écarts sont supérieurs à quelques centaines de nanomètres ou plus (p. ex. Support ayant une topologie fibreuse (Fig. 13)).

Sur les surfaces continues, les cellules forment des points d'adhésion larges activant la machinerie de polymérisation de l'actine et permettant la formation de lamellipodes larges. Au contraire, sur une surface discontinue, les mécanismes de prolongement membranaire indépendants de l'adhésion sont plus favorables. En effet, lors d'une migration sur des fibres espacées, le front de la cellule passe par des moments où il est incapable de générer des forces de traction car il n'est pas engagé dans une matrice extracellulaire. Ce sont alors des forces de traction dues à une pression hydrostatique générée plus en arrière dans le corps cellulaire qui permettront à la cellule de migrer (Charras and Sahai, 2014). Les mécanismes de la migration cellulaire varient donc considérablement en fonction de la topologie.

De même, la rugosité de la surface affecte le comportement cellulaire. Par exemple, des cellules souches mésenchymateuses cultivées sur une surface contenant des cannelures de 350 nm de largeur, alignent leur noyau et cytosquelette le long de ces cannelures. De façon intéressante, cette nanotopographie influence la différenciation de ces cellules souches mésenchymateuses. Ainsi, en utilisant des motifs de 100

nm de diamètre, il est possible d'induire une différenciation ostéogénique de ces cellules avec une efficacité comparable à l'induction chimique (Akhmanova et al., 2015).

La présentation spatiale des épitopes

Il est devenu évident que selon sa présentation spatiale, une même molécule engendre des effets différents au niveau cellulaire. Cette présentation spatiale dépend de la dimensionnalité de la matrice, de la polarité cellulaire, de la géométrie de surface et de sa topographie, de la concentration des épitopes et de leur arrangement (nombre d'épitopes par cluster, espacement entre les épitopes, etc.) (Fig. 13).

Sur un support bidimensionnel (2D), la cellule est en contact avec la matrice du côté basal seulement. Alors que dans une matrice tridimensionnelle (3D), la cellule forme des adhésions sur toute sa surface. Cette dimensionnalité influe sur le comportement cellulaire. Par exemple, des cellules mésenchymateuses de la moelle épinière de rat se différencient mieux en cellules productrices d'insuline sur un support 3D que 2D (Akhmanova et al., 2015).

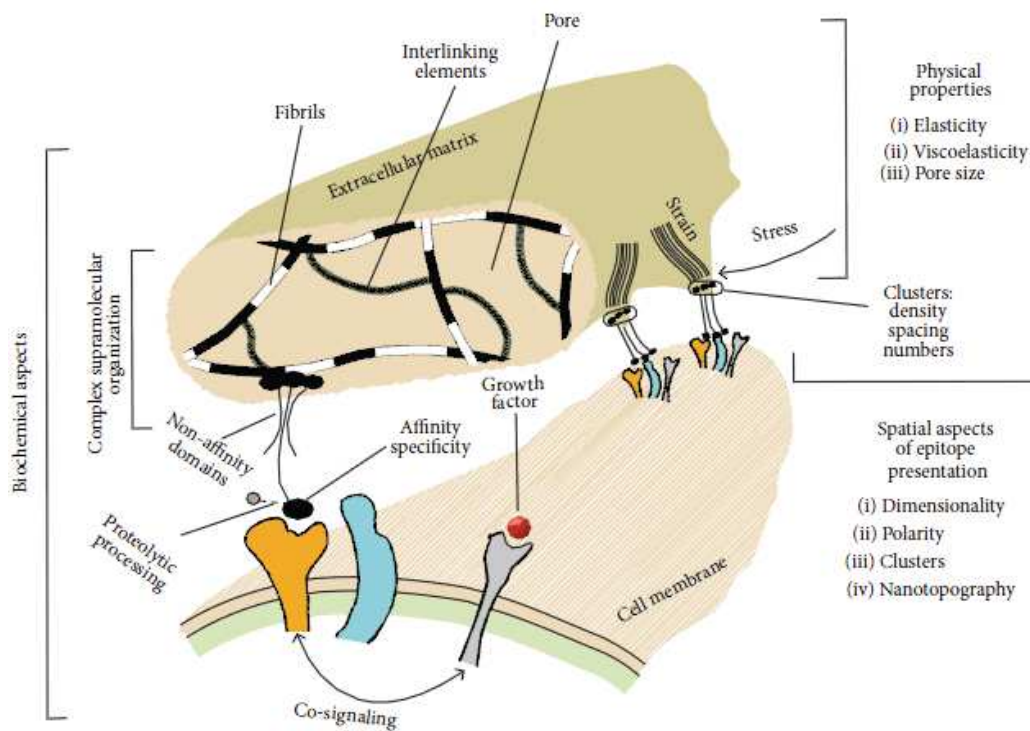


Figure 13. Les aspects physiques, spatiaux et biochimiques de la matrice extracellulaire (d'après Akhmanova. M et al, (Akhmanova et al., 2015)).

L'ensemble de ces propriétés physiques de la MEC affecte la tumorigenèse. Leur implication dans la croissance et la migration des glioblastomes sera détaillée plus tard dans ce manuscrit.

1.4- La matrice extracellulaire du cerveau

1.4.1- Composition biochimique

La MEC du cerveau est déposée majoritairement par les astrocytes et les oligodendrocytes et elle correspond à 20 % du volume d'un cerveau adulte (Gritsenko et al., 2012). L'espace interstitiel du parenchyme cérébral est rempli par une matrice constituée principalement par les protéoglycanes de la famille lécticane ou hyaléctane et d'acide hyaluronique ainsi que de ténascines. Ces molécules sont capables de fixer les molécules d'eau et sont ainsi responsables de l'aspect gélatineux du cerveau (Cuddapah et al., 2014).

L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane non-sulfaté de haut poids moléculaire (entre 10^6 et 10^7 kDa en fonction du nombre de disaccharides) et est très abondant à l'intérieur du cerveau. La famille des hyaléctanes (anciennement appelées hyaladhérines) comprend l'aggrécane, le vérsicane, le neurocane et le brévican/BEHAB. Ce sont tous des protéoglycanes sécrétés par les cellules et se fixent spécifiquement à l'acide hyaluronique au niveau N-terminal. Dans le cerveau de poulet, l'aggrécane est exprimé seulement au cours du développement embryonnaire alors qu'elle est plus exprimée dans le cerveau des rats. De plus, l'isoforme V2 du vérsican est largement présente dans le cerveau adulte en comparaison avec les autres isoformes V0 et V1. Le neurocane est exprimé seulement dans les tissus neuronaux. De même, le brévican est exprimé seulement dans le cerveau et son expression augmente lors de la gliogenèse au cours du développement ou dans les gliomes. La MEC du cerveau contient également d'autres protéoglycanes sécrétés qui ne se fixent pas à l'acide hyaluronique : les SLRPs tels que la décorine, la biglycane, la phosphacane, la perlécane et la dystroglycane (Novak and Kaye, 2000).

Le cerveau contient par ailleurs des glycoprotéines telles que reelin et ténascine-R. La famille des ténascines contient quatre protéines différentes: ténascine-C, ténascine-R, ténascine-X et ténascine-Y. Alors que les ténascines X et C sont

exprimés dans une large variété de tissus, la ténascine-R est exprimée seulement au sein du système nerveux central (Novak and Kaye, 2000).

Enfin, le cerveau contient une faible quantité de collagène ce qui lui donne son aspect souple. Le collagène est principalement présent au niveau de la membrane basale entourant les vaisseaux sanguins. De même, la fibronectine et la laminine ne sont pas abondantes dans la MEC du cerveau et sont présentes principalement au niveau de la membrane basale (Novak and Kaye, 2000).

1.4.2- Propriétés physiques

Grace à l'absence de fibres de collagène et à l'abondance d'acide hyaluronique, le cerveau est l'un des organes les plus souples du corps humain. La rigidité du cerveau, caractérisée par le module de Young est comprise entre 0.5 et 1KPa. A titre comparatif, la rigidité des os est comprise entre 10 et 20 GPa (Akhmanova et al., 2015).

D'un autre côté, la mesure du diamètre des espacements ou pores au sein de la MEC du cerveau est plus délicate. En effet, la plupart des mesures ont été faites sur du tissu *post mortem* ou après une ischémie terminale, ayant subi une certaine contraction suite à la perte d'eau et d'électrolytes. Les résultats de ces mesures donnent un diamètre allant de 10 à 20 nm seulement (Thorne and Nicholson, 2006). Des modèles computationnels indiquent un diamètre similaire de 20 nm (Thorne and Nicholson, 2006). Toutefois, l'utilisation d'une nouvelle technique d'imagerie optique intégrative (IOI) basée sur la diffusion de sondes fluorescentes à l'intérieur du néocortex de rat *in vivo* a montré que les pores de la MEC du cerveau ont un diamètre compris entre 38 et 64 nm, soit deux à trois fois plus importants que les anciennes estimations. D'autres espaces plus larges sont aussi présents, avec un diamètre allant jusqu'à 80 nm au niveau péri-axonique (Thorne and Nicholson, 2006).

Une autre étude s'est intéressée à la mesure du diamètre des axones de la matière blanche du cerveau humain. Les mesures ont été faites sur trois cerveaux humains différents et dans trois régions différentes : le fascicule longitudinal supérieur, le fascicule occipitofrontal supérieur et le corps calleux. Les diamètres se répartissent entre 0.19 et 4.79 μm avec des moyennes comprises entre 0.63 et 1.34 μm dans la

région du fascicule longitudinal supérieur ; entre 0.17 et 4.42 μm avec des moyennes comprises entre 0.46 et 0.6 μm dans la région du fascicule occipitofrontal supérieur. Finalement, à l'intérieur du corps calleux, les diamètres des axones sont compris entre 0.17 et 5.13 μm avec des moyennes entre 0.64 et 0.74 μm (Liewald et al., 2014).

2- L'adhésome

2.1- Définition

Les plaques d'adhésion focale sont des sites qui lient le cytosquelette d'actine du cytoplasme à la MEC *via* les intégrines membranaires et dont la dynamique d'association et de dissociation joue un rôle important au cours de la migration cellulaire. Les contacts focaux sont constitués d'abord par une ou plusieurs intégrines qui s'associent ensemble progressivement pour former des plaques d'adhésion focale matures. Ces structures riches en actine définissent un adhésome ou complexe associé aux intégrines (CAI) contenant une centaine de protéines signalétiques différentes qui sont impliquées dans la transduction des signaux extracellulaires contrôlant la prolifération, la migration, l'invasion, la différenciation et la survie cellulaire. Les plaques d'adhésion focale ne sont pas les seules structures adhésives dépendantes des intégrines. Les invadopodes, pseudopodes et podosomes sont d'autres plateformes dépendantes des intégrines assurant une adhésion avec la MEC et impliqués fonctionnellement dans sa dégradation (Manninen and Varjosalo, 2017).

Certaines des protéines constituant l'adhésome sont directement impliquées dans des maladies humaines telles que les maladies cardiovasculaires, la dystrophie musculaire ou le cancer (Winograd-Katz et al., 2014).

2.2- La composition moléculaire de l'adhésome

Il était auparavant admis que le complexe multimoléculaire associé aux intégrines - ou adhésome - contenait environ 200 protéines différentes. Cependant, les nouveaux travaux de Horton ER et al basés sur des analyses protéomiques, bioinformatiques et de spectrométrie de masse ont montré que la composition de l'adhésome est plus complexe et dynamique et qu'elle varie considérablement en fonction du type

cellulaire, du substrat d'adhésion et de l'état d'activation de la cellule (Horton et al., 2015). En effet, Les auteurs ont rassemblé les adhésomes de différentes lignées cellulaires cultivées sur de la fibronectine telles que la lignée de mélanome humain (A375), de leucémie humaine (K562) et de fibroblastes de souris. Ces travaux ont abouti à la définition d'un méta-adhésome comprenant 2412 protéines observées au moins dans l'un des CAI analysés.

En comparant la composition des différents adhésomes, les auteurs ont observé que certaines protéines sont redondantes. Ceci a permis de définir un adhésome consensus de 60 protéines qui sont réparties en quatre axes signalétiques (Fig. 14). Le premier axe est celui de ILK-PINCH-kindline, le deuxième celui de FAK-paxilline, le troisième celui de taline-vinculine et enfin le quatrième celui de α -actinine-zyxine-VASP (Fig. 14) (Horton et al., 2015). L'altération de ces voies de signalisation dans le cancer est impliquée dans la prolifération, l'invasion et les métastases (Bianconi et al., 2016).

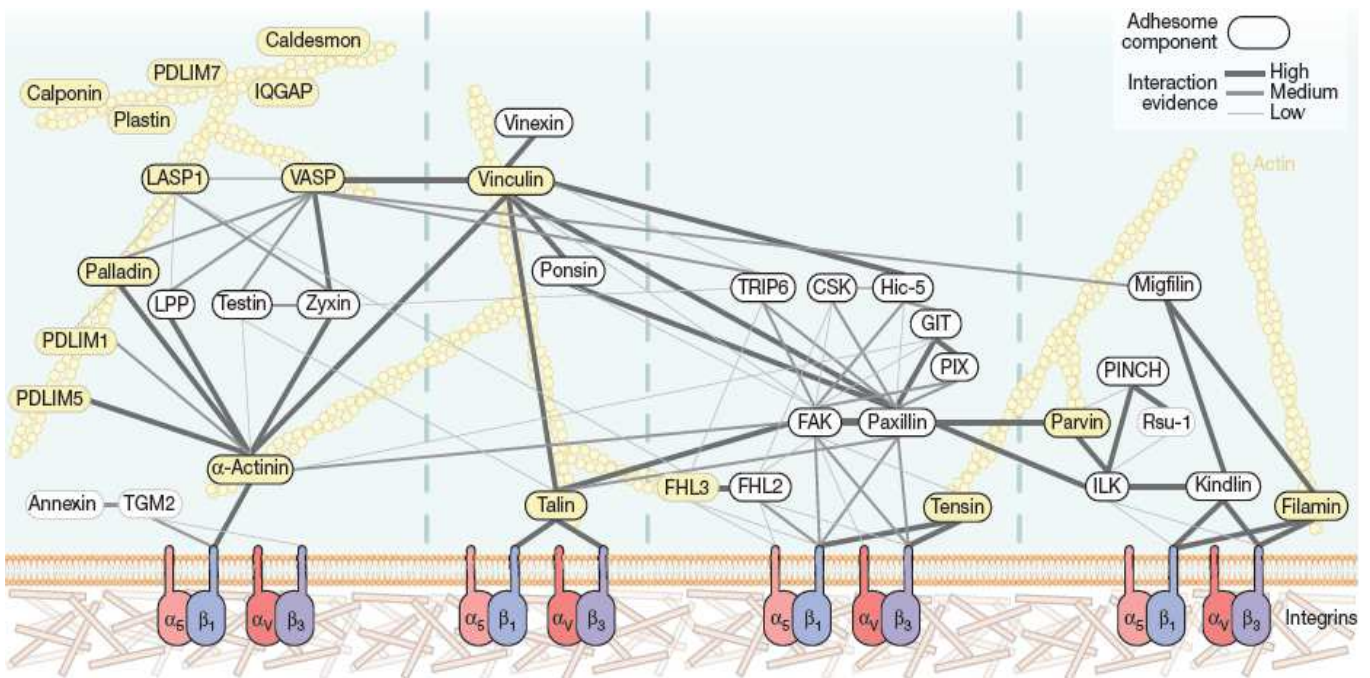


Figure 14. Les interactions signalétiques entre les différents composants du méta-adhésome (d'après Horton. ER et al, (Horton et al., 2015)).

2.3- Les intégrines

2.3.1- Généralités

La famille des intégrines a été découverte en 1987 par Richard Hynes (Hynes, 2002), et depuis, le rôle de ces récepteurs dans l'adhésion cellulaire est largement étudié. Les intégrines sont les récepteurs majeurs des protéines de la MEC chez les métazoaires. Chez les vertébrés, elles jouent en plus des rôles importants dans l'adhésion cellule-cellule. En plus de leur implication dans l'adhésion cellulaire, les intégrines participent à la transduction intracellulaire des signaux externes et à la régulation de plusieurs voies de signalisation. Elles sont essentielles pour le développement embryonnaire, la réponse immunitaire, l'homéostasie et sont impliquées dans plusieurs pathologies dont le cancer (Hynes, 2002).

Toutes les intégrines ont une structure commune (Fig. 15). Chaque récepteur correspond à un hétérodimère constitué de deux sous-unité α et β (Fig. 15). L'analyse du génome humain suggère la présence de 24 sous-unités α et 9 β différentes. Mais, à l'heure actuelle, seulement 18 sous-unités α et 8 β sont connues formant 24 hétérodimères. Dans chaque récepteur, les deux sous-unités sont liées ensemble par des liaisons non-covalentes. Chaque sous-unité est constituée de trois segments. Une partie extracellulaire glycosylée qui correspond à environ 90 % de la molécule, une autre transmembranaire hydrophobe responsable de l'ancrage à la membrane et une dernière cytoplasmique capable d'interagir avec un grand nombre de protéines signalétiques intracellulaires (Fig. 15) (Berman et al., 2003).

Les intégrines reconnaissent plusieurs macromolécules de la MEC, telles que le collagène, la laminine, la fibronectine et la vitronectine. Une intégrine peut interagir avec plusieurs molécules et inversement, une macromolécule de la MEC peut être reconnue par plusieurs intégrines. Six membres de la sous-famille $\beta 1$ des intégrines ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ and $\alpha 9\beta 1$), trois de la sous-famille αv ($\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 8$) ainsi que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ sont des récepteurs à la laminine. Plus particulièrement, le récepteur $\alpha 6\beta 1$ de la laminine est surexprimé dans les hépatocarcinomes et est impliqué dans l'adhésion des cellules cancéreuses aux vaisseaux sanguins. Il a été détecté également dans le cancer métastatique de la prostate suggérant son rôle dans la migration (Belkin and Stepp, 2000).

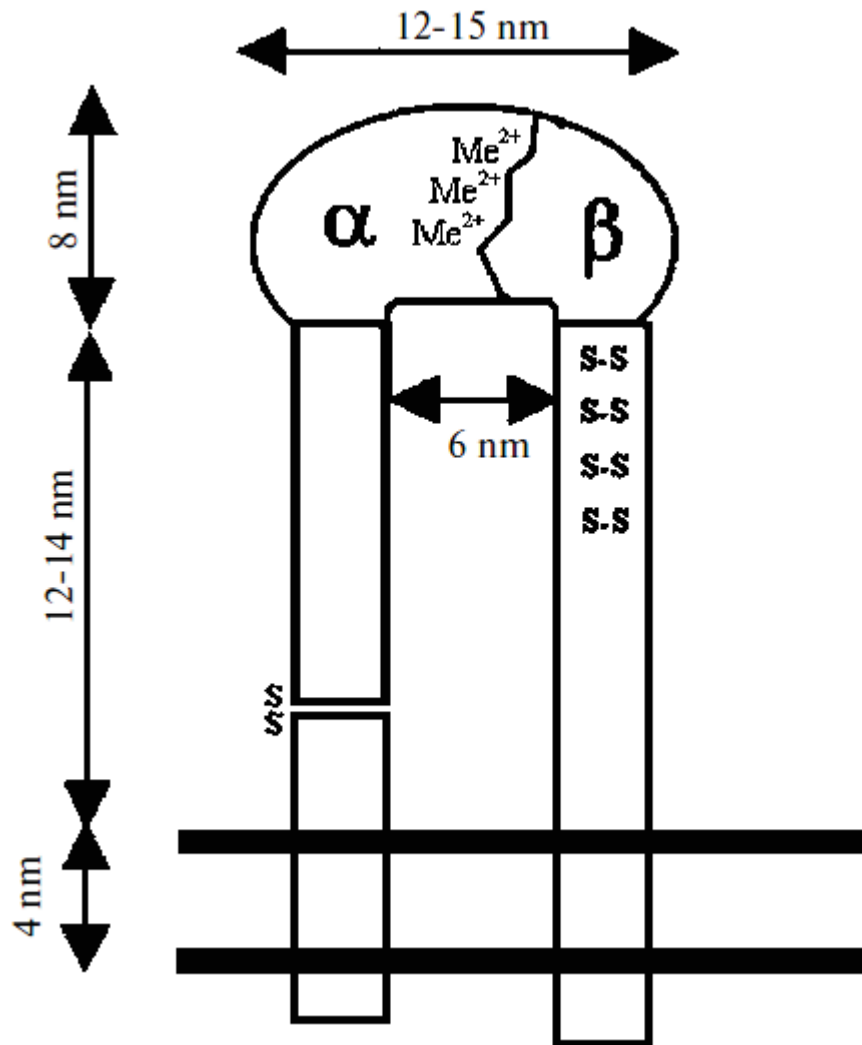


Figure 15. La structure tertiaire des intégrines. Les deux sous-unités α et β sont en forme de tige qui se termine par une extension globulaire du côté N-terminal (extracellulaire). Ces domaines globulaires fixent des cations bivalents et forment le site de fixation du ligand. Ces deux sous-unités possèdent aussi un segment hydrophobe transmembranaire et un autre intracellulaire. La taille des différents segments est indiquée sur la figure (d'après Berman, AE *et al*, (Berman et al., 2003)).

2.3.2- La signalisation bidirectionnelle des intégrines

2.3.2.1- La signalisation « inside-out »

Les intégrines présentent une particularité par rapport aux autres récepteurs membranaires par le fait qu'elles sont capables de transmettre des stimuli non seulement du milieu externe à l'intérieur de la cellule (signalisation « outside-in »), mais aussi de propager des signaux intracellulaires afin de causer des modifications extracellulaires (signalisation « inside-out »).

L'exemple le plus étudié de la signalisation « inside-out » est l'activation des intégrines elles-mêmes. A la surface des cellules, les intégrines se trouvent dans une conformation inactive. Ceci est primordial pour réguler les réponses inflammatoires des lymphocytes et plaquettes qui doivent interagir au minimum avec la MEC dans les conditions normales. Suite à la fixation à la MEC, une cascade de réactions amène au recrutement de taline et kindline qui se lient sur la queue cytoplasmique de la sous-unité β des intégrines. Ceci conduit à l'augmentation de l'affinité de l'intégrine aux molécules de la MEC. En plus de l'augmentation de l'affinité, l'avidité de l'interaction des intégrines avec la matrice se caractérisant par le recrutement d'un très grand nombre de récepteurs au site d'adhésion, doit aussi augmenter pour renforcer l'adhésion cellule-MEC (Legate et al., 2009).

La taline est un homodimère formé de deux sous-unités de 270 KDa chacune. Chaque sous-unité est constituée d'une partie N-terminale globulaire (tête) de 50 KDa et d'une partie C-terminale (queue) de 220KDa. La tête de taline contient le domaine FERM qui est subdivisé en sous-domaines F0, F1, F2 et F3. Sa queue contient 13 segments ou paquets contenant des hélices α (R1-R13), avec une hélice supplémentaire du côté C-terminal permettant la dimérisation (Fig. 16) (Haining et al., 2016). D'un point de vue mécanistique, taline se fixe sur la queue cytoplasmique de la sous-unité β des intégrines *via* son domaine FERM. A l'intérieur du domaine FERM, une structure ressemblant au domaine PTB se lie au motif NPxY de l'intégrine. En absence de taline, les sous-unités *allb* et $\beta 3$ des intégrines des plaquettes interagissent ensemble et l'affinité à la MEC est faible. Le recrutement de taline inhibe cette interaction, induit un changement conformationnel et augmente l'affinité de l'intégrine à la MEC (Calderwood, 2004).

La taline est recrutée vers la membrane et active les intégrines par au moins deux mécanismes différents. Selon le premier mécanisme, le couple Rap1-RIAM se lie à taline et facilite son interaction avec la sous-unité β des intégrines membranaires. Rap1 est une GTPase de la famille Ras qui se fixe sur les lipides membranaires par des liaisons covalentes et RIAM est une protéine qui se lie à Rap1 (Lagarrigue et al., 2016). Selon le deuxième mécanisme, les charges positives se trouvant au niveau des sous-domaines F2 et F3 de la tête de taline facilitent son interaction avec les lipides de la membrane cytoplasmique et notamment le PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate). Suite à cette interaction avec la bicouche lipidique, les sous-

domaines F0-F3 passent d'une conformation linéaire à une nouvelle conformation en forme de V. Ce changement de conformation consolide le contact membranaire et augmente le nombre de ponts hydrogènes avec la sous-unité β des intégrines (Ye et al., 2016).

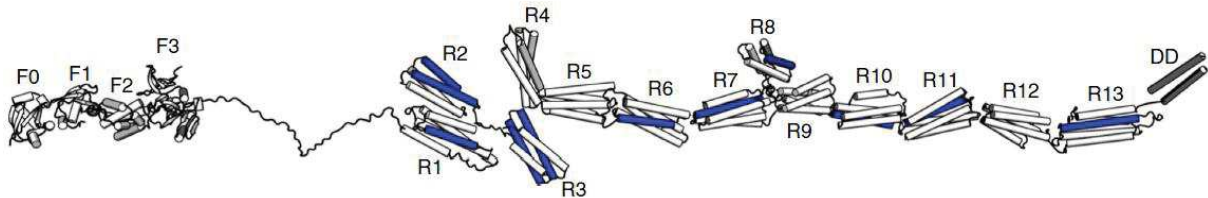


Figure 16. Le modèle structural de la taline. Les sous-domaines F0-F3 constituent le domaine de la tête de taline, et R0-R13 sa queue. Le côté C-terminal contient le domaine de dimérisation (DD) (d'après Yao. M *et al*, (Yao et al., 2016)).

2.3.2.2- La signalisation « outside-in »

Suite à la signalisation « inside-out » et à l'activation des intégrines, ces dernières transduisent des signaux extracellulaires et les transforment en réponses intracellulaires *via* une signalisation dite « outside-in ».

Le changement immédiat qui a lieu après l'activation des intégrines est la phosphorylation de la protéine FAK. FAK est composé d'un domaine central portant l'activité kinase, borné par le domaine FERM du côté N-terminal et de l'autre côté par le domaine C-terminal incluant la séquence FAT (Fig. 17). Le domaine FERM permet l'interaction avec la queue cytoplasmique des intégrines (Fig. 17). A l'état inactif, le domaine FERM est replié et encombre le domaine à activité kinase et le site d'autophosphorylation sur la tyrosine 397 (Y397). A la suite de l'engagement avec la MEC, l'intégrine change de conformation et déplace le domaine FERM, ce qui résulte en une autophosphorylation de la Y397 et une exposition de FAK à d'autres protéines de la famille des kinases Src. Les kinases Src phosphorylent FAK davantage et permettent son activation totale. De l'autre côté, FAK activé phosphoryle et active Src. Le complexe FAK-Src actif initie une cascade de phosphorylations aboutissant à l'activation de plusieurs protéines sous-jacentes et à la régulation de différentes fonctions cellulaires (Zhao and Guan, 2011).

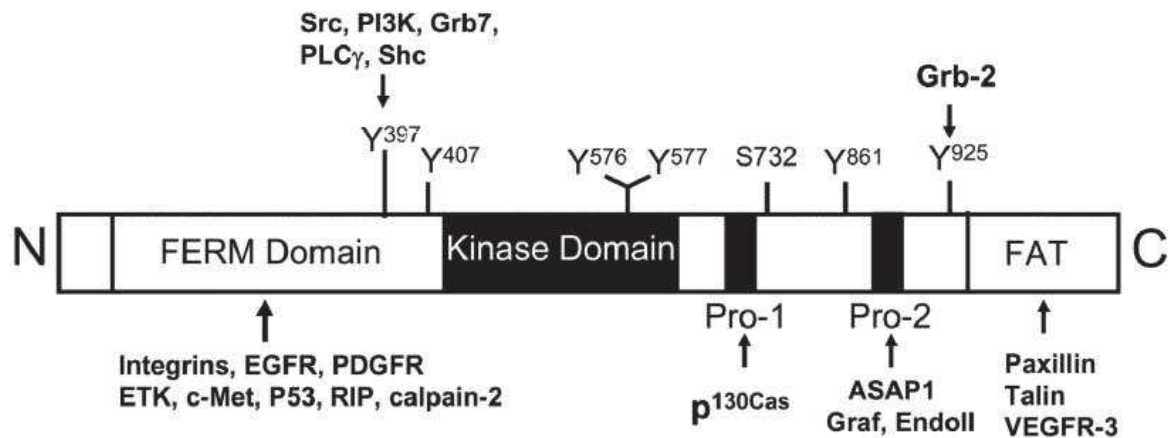


Figure 17. La structure de la kinase FAK. Ses sites d'interaction avec les différentes protéines signalétiques (d'après Zhao. X et Guan. J. L, (Zhao and Guan, 2011)).

L'une des principales fonctions régulaées par FAK est la migration cellulaire (Fig. 18). Les premières évidences de cette implication sont visibles par l'augmentation de son expression dans les kératinocytes migratoires au cours de la cicatrisation, lors du développement embryonnaire ou dans les cellules métastatiques des cancers humains. Plusieurs voies de signalisation activées par FAK et contrôlant la migration cellulaire ont été décrites. Dans la première, le couple FAK-Src phosphoryle p130Cas sur une tyrosine créant des sites de fixation pour les protéines à domaine SH2 telle que Crk (Fig. 18). Le complexe Cas/Crk active DOCK180 et Rac qui jouent un rôle important dans la polymérisation des microfilaments d'actine au niveau du front cellulaire ce qui permet la formation de lamellipodes au cours de la migration. FAK/Src phosphoryle également la protéine du cytosquelette paxilline qui s'associe à PAK aboutissant à l'activation de CDC42 qui est impliqué dans la formation des filopodes et le contrôle de la polarité cellulaire. FAK joue un rôle aussi dans l'invasion tumorale *via* le contrôle de l'expression des métalloprotéinases (MMP) (Fig. 18) (Zhao and Guan, 2011).

Une autre voie de signalisation correspond à l'interaction de FAK avec PI3K et la protéine adaptatrice Grb7 qui stimulent aussi la migration cellulaire *via* Rac (Fig. 18). De plus, FAK phosphoryle N-WASP (Fig. 18), un effecteur sous-jacent à CDC42, ce qui active Arp2/3 et favorise ainsi la nucléation et la polymérisation de l'actine au niveau du front des cellules migratrices (Zhao and Guan, 2011).

Enfin, FAK favorise la migration en phosphorylant l'endophiline A2 suite à l'activation de Src, ce qui réduit l'internalisation de la métalloprotéinase membranaire MT1-MMP (Fig. 18). Ceci permet la dégradation et le remodelage de la MEC facilitant la migration cellulaire (Zhao and Guan, 2011).

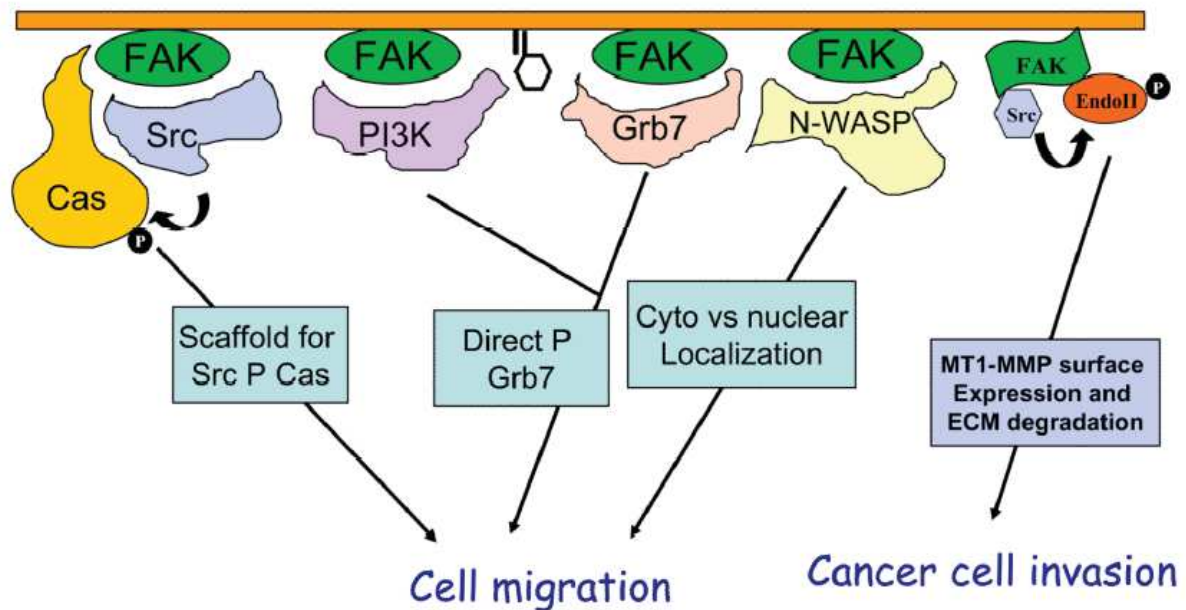


Figure 18. La régulation de la migration cellulaire par la protéine FAK (d'après Zhao. X et Guan. J. L., (Zhao and Guan, 2011)).

D'un autre coté, les intégrines jouent un rôle essentiel dans l'adhésion à la MEC. L'adhésion à la MEC dépendante des intégrines a lieu au niveau des plaques d'adhésion focale *via* les voies de signalisation incluant ILK, FAK, phospholipase C et les protéines de la famille Rho. Plusieurs intégrines dont $\alpha5\beta1$, $\alphaV\beta1$ et $\alphaV\beta6$ forment des points d'adhésion servant d'appui de traction au cours de la migration des kératinocytes (Pan et al., 2016).

Les intégrines régulent également la différenciation cellulaire. Les sous-unités $\alpha2$ et $\alpha3$ présentent un gradient d'expression au niveau des cryptes intestinales et modulent ainsi la différenciation épithéliale des cellules intestinales. Elles sont enfin impliquées dans la survie et la résistance des cellules à l'apoptose. Ceci est médié par les voies de signalisation passant par PI3K-AKT, AKT ou ERK. Suite à sa phosphorylation, AKT phosphoryle BAD qui appartient à la famille Bcl-2 pro-apoptotique, ce qui induit sa dégradation. De même, par l'intermédiaire de la voie PI3K-AKT, les intégrines aboutissent à la phosphorylation de Bax qui appartient

aussi à la famille Bcl-2. Enfin, une dernière voie permettant aux cellules de résister à la mort cellulaire, suite à l'activation des intégrines, est la voie ERK qui inhibe la protéine pro-apoptotique Bim (Pan et al., 2016).

Les intégrines jouent un rôle important au cours de la progression tumorale. Une description détaillée des mécanismes mis en jeu sera fournie plus tard dans ce chapitre.

2.4- Les autres récepteurs de la matrice extracellulaire

En dehors des intégrines, plusieurs récepteurs de surface se lient aux molécules de la matrice extracellulaire et participent à l'intégration des signaux externes. Ces récepteurs sont dits « matricellulaires ». Ce sont le CD44 - ou récepteur à l'acide hyaluronique - les récepteurs à domaine discoidine (DDR) et les protéoglycanes membranaires syndécans et glypicanes (Theocharis et al., 2016).

CD44 est une glycoprotéine transmembranaire qui sert de récepteur à l'acide hyaluronique mais aussi à d'autres ligands de la MEC tels que l'ostéopontine, la fibronectine, le collagène, les facteurs de croissance et les MMPs (Theocharis et al., 2016).

D'un autre côté, les récepteurs à domaine Discoidine DDR1 et DDR2 sont des récepteurs à activité tyrosine kinase qui se lient aux collagènes. Les deux formes de DDRs ont des interactions préférentielles aux différents types de collagènes. Par exemple, DDR1 se lie préférentiellement aux collagènes de types I et IV et DDR2 aux types I, II, et X (Theocharis et al., 2016).

Les syndécans sont des protéoglycanes transmembranaires à chaînes héparane sulfates. Plusieurs molécules de la MEC ayant un domaine de liaison à l'héparane sulfate se lient aux syndécans comme la fibronectine et la laminine. Au niveau de la laminine, les sites de fixation aux syndécans se localisent dans le domaine globulaire du côté C-terminal. Plusieurs collagènes se lient également aux syndécans. De même, les glypicanes contiennent des chaînes d'héparane sulfates qui se lient aux molécules de la MEC. Ces récepteurs possèdent des sites de fixation des glycosaminoglycanes leur permettant d'interagir avec les protéoglycanes membranaires et matricielles (Theocharis et al., 2016).

Une description détaillée de ces récepteurs est fournie dans la revue de Theocharis. A. D *et al* (Advanced Drug Discovery Reviews, 2015).

2.5- La dynamique des plaques d'adhésion focale

2.5.1- Composition des plaques d'adhésion focale et rôle du couple taline-vinculine

Le lien entre les intégrines membranaires et le cytosquelette correspond à un réseau d'interactions transitoires et dynamiques entre les protéines des plaques d'adhésion focale et les microfilaments d'actine. Cette dynamique facilite la connexion entre les intégrines statiques et le cytosquelette d'actine en coulissage perpétuel. Les protéines des adhésions focales (AF) sont réparties en quatre classes : 1- celles qui se fixent aux intégrines et interagissent directement avec l'actine telles que la taline, α -actinine et filamine ; 2- les protéines qui se lient aux intégrines mais interagissent indirectement avec l'actine et régulent le cytosquelette comme la Kindline, ILK, la paxilline et FAK ; 3- les protéines qui ne se lient pas aux intégrines mais se fixent sur l'actine telle que la vinculine ; 4- les protéines adaptatrices et signalétiques qui modulent l'interaction entre l'ensemble des composants des AFs (Legate et al., 2009).

Les techniques d'imagerie associées aux observations structurales, biochimiques et *in vivo*, ont montré que parmi tous les constituants des AFs, la taline, la vinculine, la α -actinine et ILK sont les éléments structuraux les plus primordiaux de l'association intégrine-actine. Par exemple, les fibroblastes ne possédant pas la taline-1 et la taline-2 sont incapables de lier leurs intégrines au cytosquelette. Cet effet ne peut s'expliquer seulement par le rôle de la taline dans l'activation des intégrines médiée principalement par son domaine de la tête, parce que l'introduction de la tête de taline sans sa queue ne suffit pas pour rétablir l'association avec le cytosquelette. Cette nécessité de la présence de la queue de la taline qui est responsable majoritairement de sa fixation à l'actine, montre que la taline forme un lien mécanique direct entre les intégrines et l'actine (Legate et al., 2009).

Le domaine de la « queue » de taline formé de 13 paquets d'hélice α (R1-R13) contient des sites de fixation aux protéines RIAM, vinculine, intégrine et deux régions qui se lient aux microfilaments d'actine ABS2 et ABS3. Le site ABS3 est essentiel

pour l'assemblage des AFs alors qu'ABS2 est nécessaire pour leur maturation. En absence d'une force mécanique, le site ABS2 est inhibé par le domaine R3 sur lequel se fixe la vinculine. La force de la contraction acto-myosine transmise au complexe intégrine-taline *via* ABS3 induit le déploiement du domaine R3 et la fixation de la vinculine, ce qui active le site ABS2 et stabilise la fixation de taline sur l'actine (Atherton et al., 2015). La vinculine renforce ainsi le lien taline-actine et l'assemblage des AFs.

2.5.2- Désassemblage des plaques d'adhésion focale

Le processus de la migration cellulaire nécessite des cycles dynamiques et régulés d'assemblage et de désassemblage des sites d'adhésion. La formation et la maturation des adhésions focales sont essentielles pour la prolongation des lamellipodes et l'avancement du front de la cellule. En même temps, la désadhésion de l'arrière de la cellule permet au corps cellulaire d'avancer. Des protéines sont donc recrutées continuellement aux sites d'adhésion puis dissociées et éliminées suite à une régulation spatio-temporelle.

Plusieurs mécanismes ont été associés au désassemblage des adhésions focales, impliquant la protéine FAK ou les microtubules. Premièrement, la phosphorylation et l'activation de p190RhoGAP par FAK diminue l'activité de la myosine II via la régulation de Rho et Rho kinase. La diminution de l'activité de la myosine II diminue la croissance des adhésions focales. De même, d'autres mécanismes de relaxation des adhésions focales par les microtubules ont été décrits (Gardel et al., 2010).

La régulation de la dissociation des plaques d'adhésion focale par les calpaines reste néanmoins l'un des mécanismes les plus étudiés. Les calpaines sont des cystéine-protéases activées par le calcium et impliquées dans la migration, l'adhésion et l'apoptose. Chez l'Homme, il existe 15 gènes qui codent pour des calpaines. La plupart de ces calpaines ont une expression variée selon les tissus, mais deux sont ubiquitaires : la μ -calpaine et la M-calpaine. Ces deux calpaines, appelées aussi respectivement calpaine-1 et calpaine-2 sont les plus étudiées dans le contexte de l'adhésion et de la migration cellulaire. Ces calpaines clivent et régulent plusieurs composants des plaques d'adhésion focale. Parmi les cibles connues se trouve taline, paxilline, α -actinine, ezrine, FAK et les queues cytoplasmiques des intégrines

$\beta 1$ et $\beta 3$. Le clivage de l'une de ces protéines est suffisant mais pas nécessaire pour affaiblir l'adhésion des intégrines à la MEC (Glading et al., 2002).

La protéolyse de taline représente l'étape déterminante au cours du désassemblage des plaques d'adhésion focale. Dans leur étude, Franco. S. J et al ont utilisé une forme mutée de taline résistante au clivage par la calpaine-2. Les auteurs montrent que le clivage de taline par la calpaine-2 régule la dynamique des adhésions focales. De façon intéressante, ils démontrent que le clivage de taline crée une cascade de désassemblages de plusieurs constituants des AFs incluant paxilline, vinculine et zyxine (Franco et al., 2004).

2.5.3- La dynamique des plaques d'adhésion focale au cours de la migration dans des environnements bi- ou tri-dimensionnels

La présence des plaques d'adhésion focale au cours de la migration sur des supports bidimensionnels (2D) a été validée (Chiu et al., 2014). Dans ces conditions, les cellules forment des adhésions au niveau du côté basal en contact avec le substrat. D'abord, quelques intégrines seulement s'associent à la MEC pour former des adhésions dites « naissantes ». Au fur et à mesure, d'autres intégrines s'engagent avec la matrice et une structure adhésive plus large et stable appelée adhésion fibrillaire se forme. Cette adhésion permet à la cellule de recevoir les informations biochimiques et mécaniques de son entourage et de migrer. Au cours de la migration en 2D, les plaques d'adhésion focale ainsi que le cytosquelette d'actine s'assemblent et se désassemblent continuellement, ce qui permet la prolongation des lamellipodes et filopodes au niveau frontal, suivie par la contraction de l'arrière et l'avancement du corps cellulaire.

En revanche, la présence de ces plaques d'adhésion focale et leur dynamique lors d'une migration dans un environnement tridimensionnel (3D) restent des sujets controversés. En effet, les composants des AFs incluant taline, vinculine, α -actinine, zyxine, paxilline, VASP, FAK et p130Cas sont présents dans le cytoplasme dans de telles conditions mais ne forment pas d'agrégats ou de structures adhésives classiques. Pour essayer de décortiquer ce phénomène, Fraley. S. I et al (Fraley et al., 2010) ont mis en place une étude élégante dans laquelle ils ont analysé les effets de l'absence de chacun des composants des AFs sur la vitesse et la persistance de

la migration des cellules de fibrosarcomes humains HT-1080 dans des environnements 2D ou 3D constitués de collagène.

Les auteurs ont observé que l'inhibition de ces protéines engendre des effets différents sur la vitesse et la persistance de la migration selon que les cellules se trouvent en 2D ou complètement submergées dans une matrice 3D. Par exemple, l'inhibition de p130Cas augmente la vitesse de migration en 2D mais la diminue en 3D (Fraley et al., 2010).

Dans un environnement tridimensionnel, les cellules de fibrosarcome HT-1080 forment des protrusions plus larges et plus longues que des filopodes mais plus étroites que les lamellipodes classiques observées en 2D. Les auteurs de cette étude leurs ont associé la dénomination de pseudopodes (Fraley et al., 2010). De plus, ce travail a démontré que l'ensemble des composantes des AFs à l'exception de zyxine contrôlent le nombre de ces pseudopodes ainsi que les forces de traction qu'elles génèrent et qui remodelent la MEC. En effet, ces forces de traction nécessitent une interaction stable et forte entre les intégrines et le cytosquelette d'actine, consolidée par le réseau formé entre l'ensemble des composants des AFs. La force générée suite à la contraction acto-myosine permet aux cellules de tirer les fibres de collagène et d'avancer dans un environnement 3D (Fraley et al., 2010).

La vinculine est aussi nécessaire pour la migration des fibroblastes dans une matrice de collagène en 3D. La diminution de son expression augmente la motilité sur un substrat de collagène en 2D mais la réduit significativement en 3D. La vinculine est nécessaire pour stabiliser les AFs et générer les forces de traction permettant à ces cellules de pénétrer dans une matrice tridimensionnelle dense (Mierke et al., 2010).

En revanche, en utilisant de nouvelles techniques d'imagerie assurant une résolution de l'ordre du nanomètre, Chiu, C. L. *et al* ont détecté des points d'attachement des cellules MDA-MB-231 à la MEC tridimensionnelle, au niveau desquels la paxilline, l'intégrine $\alpha 5$ et les fibres de collagène se co-localisent. Ces régions d'attachement à la MEC, considérées comme des adhésions focales par les auteurs de l'étude, sont plus petites et ont une dynamique d'assemblage/désassemblage plus rapide qu'en 2D (Chiu et al., 2014).

2.5.4- Dynamique des adhésions focales et rôle de taline et calpaine-2 dans les glioblastomes

La dynamique des plaques d'adhésion focale a été peu étudiée dans les glioblastomes. La plupart des études sont incluses dans la perspective d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans la régulation des adhésions focales et de l'invasion tumorale. Par exemple, Le, P. U. *et al* ont démontré que la protéine DRR (downregulated in renal cell carcinoma) est surexprimée dans les gliomes invasifs, jouant un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine et des microtubules et contrôlant ainsi le désassemblage des AFs et l'invasion (Le et al., 2010). De même, le co-transporteur d'ions NKCC1 est surexprimé dans les glioblastomes et les astrocytomes anaplasiques et régule la dynamique des AFs. En effet, l'inhibition pharmacologique de NKCC1 dans ces cellules par des shRNA induit la formation de plaques d'adhésion focale larges et diminue les forces de traction d'environ 40 % par rapport aux cellules contrôles (Garzon-Muvdi et al., 2012). Sloan. K. E *et al* ont identifié que CD155/PVR est une cible thérapeutique envisageable puisqu'elle diminue l'adhésion et la densité des AFs favorisant ainsi la migration des gliomes (Sloan et al., 2005).

Analogiquement, l'implication de taline dans la tumorigenèse a été caractérisée. C'est le cas par exemple dans le carcinome hépatocellulaire (CHC) où taline promeut le transport ionique, la dépolarisation membranaire, la croissance et l'adhésion cellulaire au cours de la progression tumorale (Perng et al., 1994).

D'autre part, des études récentes ont montré que taline joue un rôle clé dans la mécanotransduction des signaux de la MEC. En utilisant des pincettes magnétiques, Mingxi. Y *et al* ont démontré que taline est capable de « sentir » des forces de l'ordre de 5-10 pN et de plier et déployer ses domaines en hélices α au niveau de sa queue en réponse à ces signaux mécaniques. Ceci module l'interaction de taline avec plusieurs molécules signalétiques affectant par la suite un ensemble de voies de signalisation liées à l'adhésion et à la migration (Yao et al., 2016)). C'est dans cette perspective que s'inclut le rôle de taline dans les glioblastomes. Ainsi, suite à l'inhibition spécifique de la taline-1 dans les cellules de glioblastome U373-MG, une réduction significative de l'adhésion accompagnée d'une suppression de la capacité des cellules à s'adapter aux différentes rigidités de la MEC a été observée.

Concrètement, les auteurs de cette étude ont observé que les cellules dans lesquelles l'expression de la taline-1 a été inhibée, étaient incapables de modifier leur rigidité corticale en fonction de la rigidité de l'hydrogel de fibronectine sur lequel elles étaient cultivées. Néanmoins, malgré la diminution de l'adhésion cellulaire, l'assemblage des AFs dépendant de vinculine et FAK n'a pas été compromis (Sen et al., 2012).

De façon similaire, le rôle des calpaines dans la progression tumorale est aujourd'hui bien décrit. L'expression des calpaines est altérée durant la tumorigenèse. La protéolyse de certains substrats (tels que les inhibiteurs du facteur nucléaire – κ B (I κ B), taline, FAK et certains proto-oncogènes comme MYC) par les calpaines est impliquée dans la pathogenèse tumorale (Moretti et al., 2014). La contribution des calpaines dans la migration des cellules tumorales et dans le processus métastatique est due à leur capacité à cliver certains composants comme paxilline, fodrine, taline et ezrine et à réguler la dynamique des adhésions focales (Storr et al., 2016). De plus, en clivant ATG-5 associé à la formation des autophagosomes et la sous-unité α des protéines G hétérotrimériques, les calpaines diminuent l'autophagie dans les cellules tumorales (Storr et al., 2016). D'un autre côté, l'activité des calpaines favorise l'apoptose en inactivant des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-xL et en activant les caspases pro-apoptotiques comme la caspase 12 (Moretti. D et al, Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014). Les calpaines jouent aussi un rôle dans l'hypoxie en clivant HIF-1 α et HIF-2 α (Moretti et al., 2014).

Concernant plus particulièrement les glioblastomes, les études s'intéressant aux fonctions des calpaines sont rares. Cependant, une étude menée par Jia-Jun C *et al* a montré que la sous-unité régulatrice des calpaines S1 ou autrement nommée Capn4 est plus exprimée dans les gliomes que dans les tissus sains avoisinants et que sa surexpression est corrélée à un mauvais pronostic. Conjointement, l'inhibition de la Capn4 diminue la migration des gliomes *in vitro* (Cai et al., 2014).

Une autre étude a identifié un rôle de la calpaine-2 dans l'invasion des glioblastomes. En inhibant la calpaine-2 par des shRNA dans les cellules U-87, les auteurs ont détecté une diminution de 90 % de l'invasion sur du matrigel. Ils ont associé cet effet à une diminution de la production des métalloprotéinases MMP-2 (Jang et al., 2010). Une étude supplémentaire effectuée par la même équipe, a

montré une diminution de l'invasion du cerveau de poisson-zèbre par les cellules U-87 dans lesquelles l'expression de la calpaine-2 a été diminuée. Le même résultat a été obtenu sur des cultures organotypiques de cerveaux de souris. Les auteurs ont émis comme hypothèse que l'activation de la calpaine-2 par le calcium suite à l'induction des récepteurs AMPA par le glutamate, permet la protéolyse de la filamine. Or cette protéine cytosquelettique est impliquée dans la réticulation des filaments d'actine en réseaux orthogonaux nécessaires pour la réorganisation corticale du cytosquelette lors de la migration dans des espaces étroits à l'intérieur de la MEC (Lal et al., 2012).

3- Rôle de la matrice extracellulaire et des intégrines dans la progression du cancer

3.1- La matrice extracellulaire influence la progression tumorale

En 2000, Hanahan et Weinberg ont énuméré les différents traits acquis par les cellules cancéreuses au cours de la progression tumorale. Ces traits sont : l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux inhibiteurs de croissance, la résistance à l'apoptose, l'immortalité répliquative, l'angiogenèse et l'invasion et les métastases (Hanahan and Weinberg, 2000). Ils ont été révisés en 2011 et deux nouveaux traits ont été ajoutés : la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'évasion du système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2000).

Au cours de ces dernières années, il est devenu évident que les modifications biochimiques et biomécaniques de la MEC accompagnent la progression tumorale. La MEC module l'ensemble des propriétés acquises par les cellules au cours de la transformation tumorale, telles qu'elles ont été définies par Hanahan et Weinberg (Fig. 19) (Lu et al., 2012; Pickup et al., 2014).

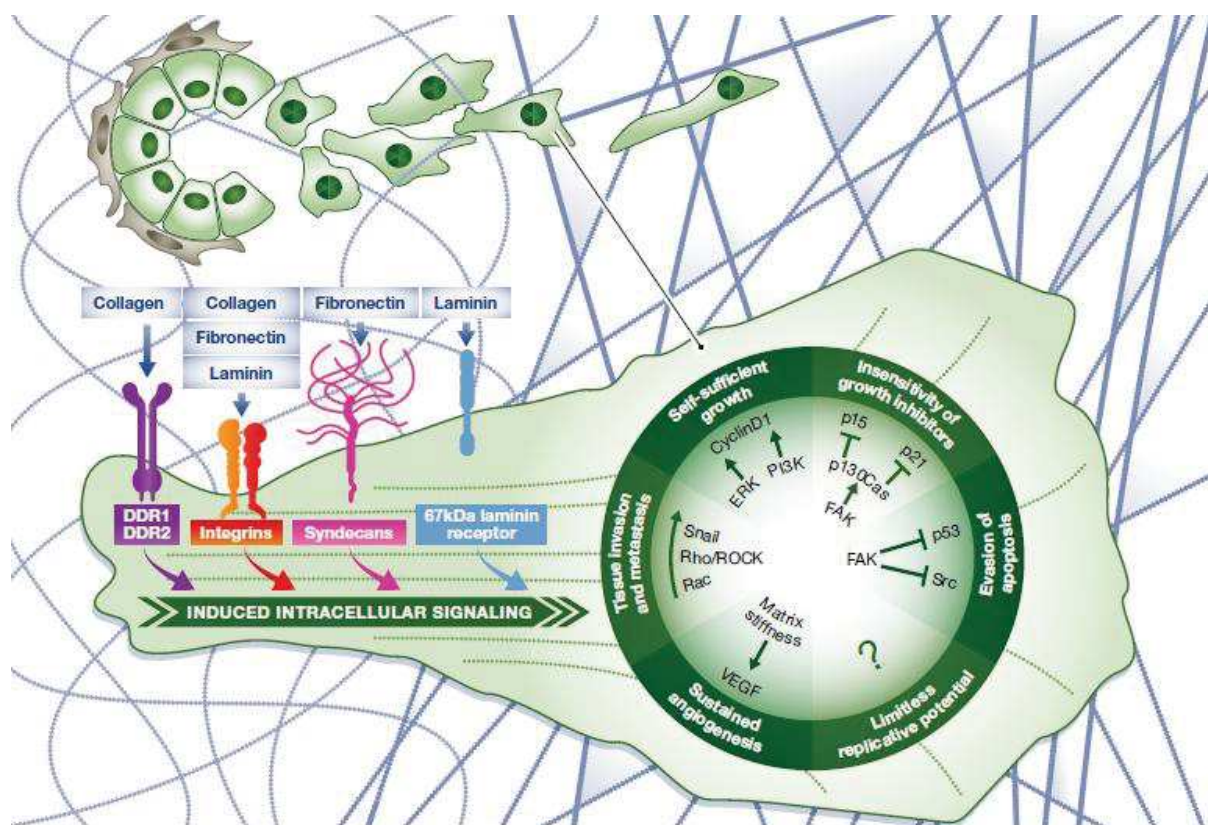


Figure 19. La MEC module la progression tumorale (d'après Pickup MW *et al.*, (Pickup *et al.*, 2014)).

L'adhésion à la MEC est nécessaire pour l'activation de Ras et Erk par les facteurs de croissance et l'induction de la transition G1/S du cycle cellulaire permettant la prolifération cellulaire (Fig. 19) (Pickup *et al.*, 2014). Par ailleurs, les cellules tumorales produisent leur propre MEC pour croître et se multiplier indépendamment de l'ancrage dans des environnements hostiles et prolifèrent plus en présence d'une MEC rigide (Pickup *et al.*, 2014).

L'interaction avec la MEC affecte l'inhibition de la progression tumorale par les gènes suppresseurs de tumeurs. Par exemple l'interaction cellule-MEC régule la voie du TGF- β en induisant p130Cas qui inhibe la phosphorylation de Smad3 ce qui résulte en une diminution de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs P15 et P21, enlevant ainsi le contrôle négatif exercé sur le cycle cellulaire (Fig. 19(Pickup *et al.*, 2014)).

La MEC est aussi un réservoir de facteurs pro et anti-angiogéniques, jouant un rôle dans la migration des cellules endothéliales et la formation de nouveaux vaisseaux bénéfiques à la tumeur. Une MEC rigide favorise l'angiogenèse tumorale en

induisant l'expression des facteurs de transcription GATA2 et TFII-I régulant l'expression de VEGFR2 et donc la survie et la croissance des cellules endothéliales (Fig. 19) (Pickup et al., 2014).

La rigidité de la MEC est aussi associée à la formation des invadopodes, protrusions riches en actine, et à l'assemblage des plaques d'adhésion focales augmentant l'invasion (Fig. 19) (Pickup et al., 2014). Elle promeut une transition épithélio-mésenchymateuse induite par TGF- β ce qui stimule les métastases tumorales (Pickup et al., 2014).

La MEC inhibe également la prolifération des lymphocytes T et diminue leur activité par l'altération des cellules présentatrices d'antigènes (APC) (Pickup et al., 2014). Egalement, certains composants de la MEC sont des chimioattractants affectant la mobilisation et l'infiltration des cellules immunitaires et donc l'inflammation associée à la progression tumorale (Lu et al., 2012).

La MEC intervient autant dans la régulation du métabolisme des cellules tumorales. La coopération de FAK avec les oncogènes Ras et Myc suite à l'adhésion à la MEC, permet de convertir le glutamate en glutamine augmentant la biosynthèse protéique et alimentant le cycle TCA ce qui augmente la survie et la prolifération cellulaire (Pickup et al., 2014).

Cette description du rôle de la MEC dans la progression tumorale n'est pas exhaustive. Des informations plus détaillées sont accessibles dans les revues de Pickup. M. W et al (Pickup et al., 2014) et Lu. P et al (Lu et al., 2012).

3.2- Les intégrines influencent la progression tumorale

Tout au long de leur vie, les cellules prolifèrent, migrent et surmontent des obstacles. Pour ce faire, elles ont besoin d'interagir avec leur microenvironnement. Cette interaction est assurée par un ensemble de récepteurs matricellulaires qui intègrent les signaux externes et les transforment en réponses intracellulaires régulant la croissance, la survie et la migration. Ces récepteurs servent de bio-senseurs permettant aux cellules tumorales de répondre aux variations environnementales et participent donc à l'acquisition de la malignité.

Parmi ces récepteurs matricellulaires, les récepteurs DDR1 et DDR2 à domaine discoidine sont impliqués dans les phases successives du développement tumoral en assurant l'interaction des cellules cancéreuses avec le collagène de type I déposé dans la MEC tumorale (Emonard et al., 2016). De même, les syndécanes régulent la prolifération, la migration et l'angiogenèse et ceci via l'interaction de leur queue cytoplasmique avec les protéines à domaine PDZ qui à leur tour recrutent d'autres protéines signalétiques et cytosquelettiques à proximité de la membrane cytoplasmique (Cheng et al., 2016).

D'autre part, la signalisation intracellulaire médiée par le récepteur CD44 de l'acide hyaluronique, active la prolifération des cellules tumorales via la voie Ras-MAPK, la réorganisation du cytosquelette et la migration par l'intermédiaire des protéines de la famille Rho ainsi que la survie via l'axe PI3-K-Akt (Naor et al., 2002).

Toutefois, la famille des intégrines reste la plus étudiée parmi l'ensemble des récepteurs matricellulaires. Les intégrines sentent la MEC avec une très grande flexibilité, transmettant ainsi des signaux spécifiques dans des conditions physiologiques mais aussi pathophysiologiques.

Ces récepteurs de la MEC sont capables de moduler l'ensemble des modifications malines, définies par Hanahan et Weinberg, et acquises par les cellules tumorales au cours de la progression du cancer, telles que la prolifération, la résistance aux suppresseurs de tumeurs et à la mort cellulaire ainsi que l'angiogenèse, l'invasion et les métastases (Fig. 20) (Blandin et al., 2015).

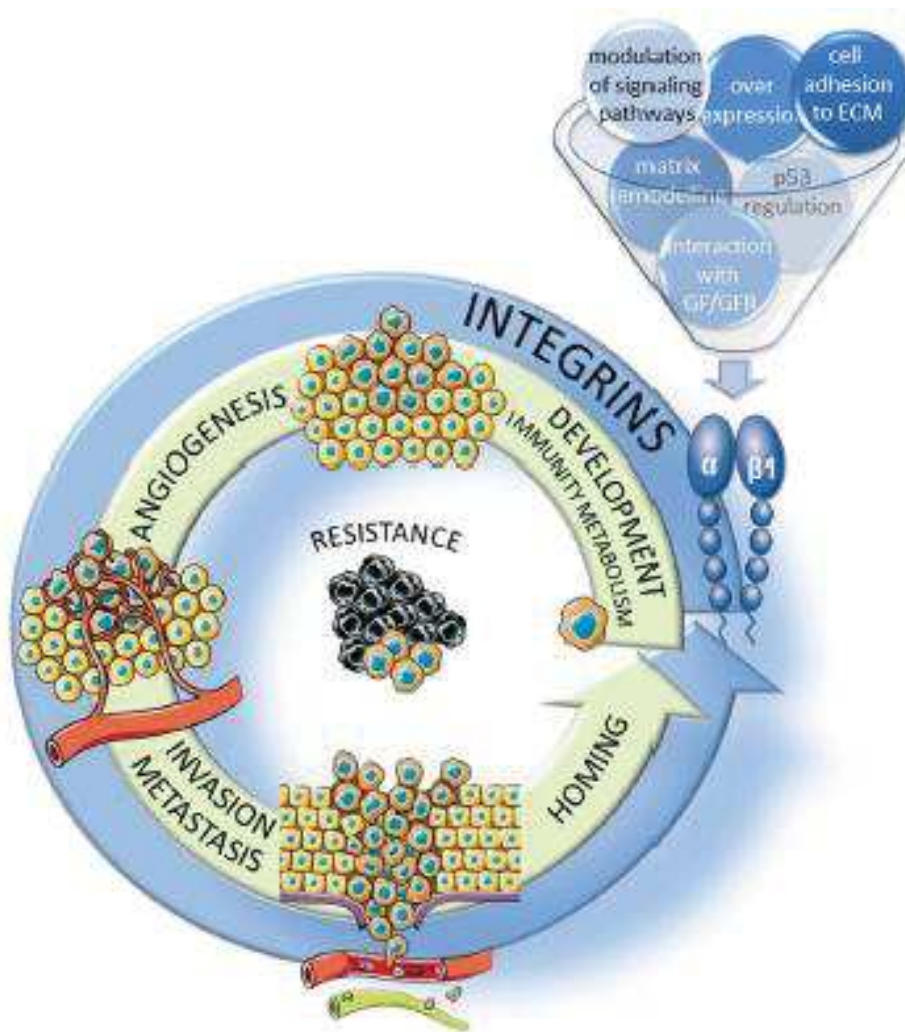


Figure 20. Les intégrines $\beta 1$ modulent la progression tumorale (d'après Blandin. A. F et al, (Blandin et al., 2015)).

Les intégrines contribuent à la prolifération continue des cellules tumorales grâce à une interconnexion avec les récepteurs aux facteurs de croissance (Fig. 20). Cette interaction peut être soit directe, soit régulée au niveau de l'expression génique ou par une activation réciproque (Tableau 3) (Bianconi et al., 2016). Plusieurs récepteurs sont impliqués dans cette interaction dont EGFR, HGFR/cMet, PDGFR et VEGFR (Blandin et al., 2015). Par exemple, dans le carcinome épidermoïde, l'inhibition de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ réduit la phosphorylation d'EGFR qui contrôle la prolifération cellulaire (Blandin. A. F et al, *Frontiers in Pharmacology*, 2015). A un autre niveau, l'intégrine $\alpha V\beta 3$ régule l'expression du récepteur EGFR au niveau de son promoteur et influence son regroupement membranaire dans le cancer ovarien (Bianconi et al., 2016).

Les intégrines participent également à l'échappement des cellules tumorales aux signaux suppresseurs de la croissance (Fig. 20). A titre d'exemple, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ empêche l'activation du suppresseur de tumeur P53 lors des traitements chimiothérapeutiques (Blandin et al., 2015). Des résultats similaires ont été obtenus dans le cancer du sein où l'inactivation de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est corrélée à l'augmentation de l'expression de P53 (Blandin et al., 2015). Cette inhibition de P53 est médiée par la voie intégrine/AKT/PEA15/caspase-8 (Blandin et al., 2015). De même, l'adhésion à la fibronectine via les intégrines inhibe un autre suppresseur de tumeur qui est la protéine Merlin codée par le gène NF2 (Neurofibromatosis type 2) (Tableau 3) (Bianconi et al., 2016). Merlin régule l'activité du récepteur EGFR et active la voie Hippo impliquée dans le contrôle de la croissance tissulaire et l'inhibition de contact (Bianconi et al., 2016).

De plus, les changements d'expression et de fonctionnalité des intégrines durant le détachement des cellules tumorales de la MEC lors des métastases jouent un rôle essentiel dans la résistance à la mort cellulaire par anoikis. Par exemple, dans les mélanomes, c'est l'interaction des intégrines avec CD63 et TIMP1 (inhibiteur des métalloprotéinases) qui permet cette résistance (Blandin et al., 2015).

Une caractéristique essentielle de la progression tumorale comprenant l'invasion locale et la dissémination métastatique est aussi modulée par les intégrines (Fig. 20). En effet, les intégrines régulent les métalloprotéinases MMPs impliquées dans la dégradation de la MEC lors de l'invasion. Elles interagissent aussi avec les récepteurs couplés aux protéines G suite à leur activation par la protéine Girdin au niveau des invadosomes, ce qui induit l'invasion tumorale (Blandin et al., 2015). Les intégrines participent à la transition épithéliale-mésenchymateuse et à l'acquisition par les cellules tumorales d'un phénotype migratoire. Les récepteurs $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha V\beta 8$ et une intégrine encore non identifiée contenant la sous-unité $\beta 1$ facilitent l'exposition de TGF- β à son récepteur cellulaire (Tableau 3) (Bianconi et al., 2016). La dissémination des cellules cancéreuses vers une nouvelle niche métastatique dépend du répertoire d'intégrines exprimé à leur surface. Par exemple, la métastase des cellules du cancer colorectal vers le foie est favorisée par la présence des intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ à leur surface (Blandin et al., 2015).

Les intégrines $\alpha V\beta 3/\beta 5$ et $\alpha 5\beta 1$ jouent aussi un rôle primordial dans la néo-angiogenèse tumorale (Blandin et al., 2015). Plus particulièrement, les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha 5\beta 1$ sont impliquées dans l'angiogenèse médiée par le FGF et $\alpha V\beta 5$ dans celle médiée par le VEGF (Bianconi et al., 2016).

La reprogrammation métabolique et énergétique des cellules cancéreuses est également modulée par les intégrines (Fig. 20). Cette reprogrammation du métabolisme du glucose est induite par le facteur de transcription Twist suite à l'activation de la voie de signalisation intégrine/FAK/PI3K/AKT/mTOR (Blandin et al., 2015). De même, l'intégrine $\beta 1$ augmente l'invasion cellulaire en induisant un remplacement de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) par la glycolyse aérobie (effet Warburg) (Blandin et al., 2015).

Les intégrines modulent également la réponse immunitaire anti-tumorale (Fig. 20). En effet, la réponse immunitaire locale est inhibée par l'interaction ténascine C/ $\alpha 5\beta 1$, ce qui favorise les métastases (Blandin et al., 2015). Au contraire, l'intégrine αV promeut la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (Blandin et al., 2015).

Cette description de l'implication des intégrines dans la modulation de la tumorigénicité n'est pas exhaustive. Des informations plus détaillées sont présentes dans les revues de Blandin. A. F et al (Blandin et al., 2015) et Bianconi. D et al (Bianconi et al., 2016).

Les intégrines $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ reconnaissant la laminine sont elles aussi impliquées dans la tumorigénèse. Par exemple, l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ permet l'interaction des cellules métastatiques de la prostate avec la laminine au cours de l'invasion périneuronale et les métastases vers les os (Sroka et al., 2010). L'intégrine $\alpha 3\beta 1$ est essentielle pour la prolifération des cellules tumorales induite par les facteurs de croissance ; pour la résistance à l'apoptose en interagissant avec la laminine et via la voie de signalisation FAK/ERK, ainsi que pour l'angiogenèse et les métastases (Ramovs et al., 2017). Finalement, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est impliquée dans l'initiation tumorale médiée par le virus HPV dans les cancers anal, cervical et oropharyngé (Ramovs et al., 2017). Elle est impliquée également dans la prolifération des cellules tumorales et la résistance à l'apoptose en régulant les voies de signalisation sous-

jaçentes aux récepteurs à activité tyrosine kinase, ainsi que dans la régulation de l'angiog nese, l'invasion et les métastases (Ramovs et al., 2017).

Finalement, durant ces dernières années, il est devenu évident que les caractéristiques physiques de l'environnement tumoral, particulièrement la topologie et la rigidité, altèrent la signalisation intracellulaire médiée par les intégrines et par conséquent la réponse cellulaire qui en résulte. C'est le cas par exemple lors de l'augmentation de la rigidité tissulaire dans le cancer du sein. Dans ce cancer, l'augmentation de l'activité de l'enzyme LOX, responsable de la réticulation du collagène, est associée à la rigidification de la MEC. Ceci altère la signalisation intracellulaire de l'intégrine $\beta 1$ par la phosphorylation de FAK favorisant ainsi l'invasion tumorale (Loffek et al., 2016).

Tableau 3. Rôles des intégrines dans la modulation du cancer (d'après Bianconi. D *et al*, (Bianconi et al., 2016)).

Hallmark of Cancer	Integrin's Contribution
Sustaining proliferative signalling	<ul style="list-style-type: none"> • Integrins can potentiate growth factor signalling pathways that promote proliferation via (1) direct binding and synergy; (2) modulation of expression levels of growth factor receptors or (3) by direct activation of growth factor receptors. • The oncogene MYC and cytokines such as TNF-α can upregulate pro-proliferating integrins. • Integrin interactions with other proteins such as CD98hc and transmembrane CDH17 that promote proliferation. • Exogenous and endogenous compounds (e.g., phorbol ester, fish oil fatty acids and vitamin D) can alter integrin expression and modulate cell proliferation.
Evading growth repressors	<ul style="list-style-type: none"> • Dysregulation of contact inhibition of locomotion: Necl-5 interacts with $\alpha v \beta 3$ (and not with nectin-3 in trans), promoting cell migration. • Dysregulation of contact inhibition of proliferation: Engagement of integrins in fibronectin binding is sufficient to inactivate Merlin, the protein responsible for stabilizing cell junctions. In turn, Merlin might also modulate $\beta 1$ integrin located at the plasma membrane. • Crosstalk with p53: <ul style="list-style-type: none"> - Integrin-mediated ECM detachment can lead to a decreased level of wildtype p53. This promotes cell survival beyond DNA-damage. - Restoration of normal wildtype p53 levels decreases $\alpha 5$ levels and sensitizes glioblastoma cancer cells to a specific chemotherapeutic agent. - Mutated p53 alters integrin recycling and promotes cancer cell migration and invasion.
Invasion and metastasis	<ul style="list-style-type: none"> • Role of integrins during EMT: <ul style="list-style-type: none"> - Specific integrins can initiate a paracrine loop of TGF-$\beta 1$, one of the major EMT inducers. In turns, TGF-$\beta 1$ induces an upregulation of specific integrins that promote a malignant phenotype. - Some integrins subunits can upregulate TGF-$\beta R1$ and Slug, both inducers of the EMT. • Role of integrins during migration/invasion: <ul style="list-style-type: none"> - FGF-2 bound to CAFs activates the FGFR signalling pathway in colon cancer cells and leads to an upregulation of integrins that can adhere to fibroblasts and migrate. - $\alpha v \beta 6$ enhances expression of uPAR and MMP-2 and MMP-9 that are responsible for ECM degradation, enabling migration as a result. - uPAR-integrin interaction is necessary to acquire an invasive amoeboid phenotype.
Limitless replicative potential	<ul style="list-style-type: none"> • Downregulation of hTERT leads to downregulation of the αv integrin subunit. • MMP-9 decreases $\beta 1$ integrin and the subsequent FAK activation decreases hTERT expression.
Sustained angiogenesis	<ul style="list-style-type: none"> • Hypoxia initiates a signaling cascade that upregulates specific integrins and pro-angiogenic factors such as VEGF and ANGPT2. The upregulated integrins mediate tumor cell invasion and regulate also HIF-1α cellular levels. VEGF is also involved in an autocrine and paracrine loop which is mediated by integrins. • The secreted compounds by the tumor cells induce an angiogenic switch and upregulate integrins which are involved in endothelial cell migration and proliferation.
Evasion of apoptosis	<ul style="list-style-type: none"> • Promoter methylation of caspase-8. • Phosphorylated caspase-8 (induced by EGF) leads to PI3K activation. • Expression of new integrins so that cells can bind to other ligands via integrins.

4- Rôle de la matrice extracellulaire et des intégrines dans le développement des glioblastomes

4.1- Rôle de la composition biochimique de la matrice extracellulaire dans le développement des glioblastomes

La MEC du cerveau subit un remodelage considérable au cours du développement des néoplasies cérébrales. Ces modifications qualitatives et quantitatives des composants de la MEC modulent la croissance, la prolifération et l'invasion de ces tumeurs. Dans les glioblastomes, la MEC est complètement modifiée autour de la masse tumorale en comparaison avec le tissu adjacent sain, participant ainsi à l'invasion et à l'infiltration des cellules cancéreuses (Fig. 21) (Bellail et al., 2004).

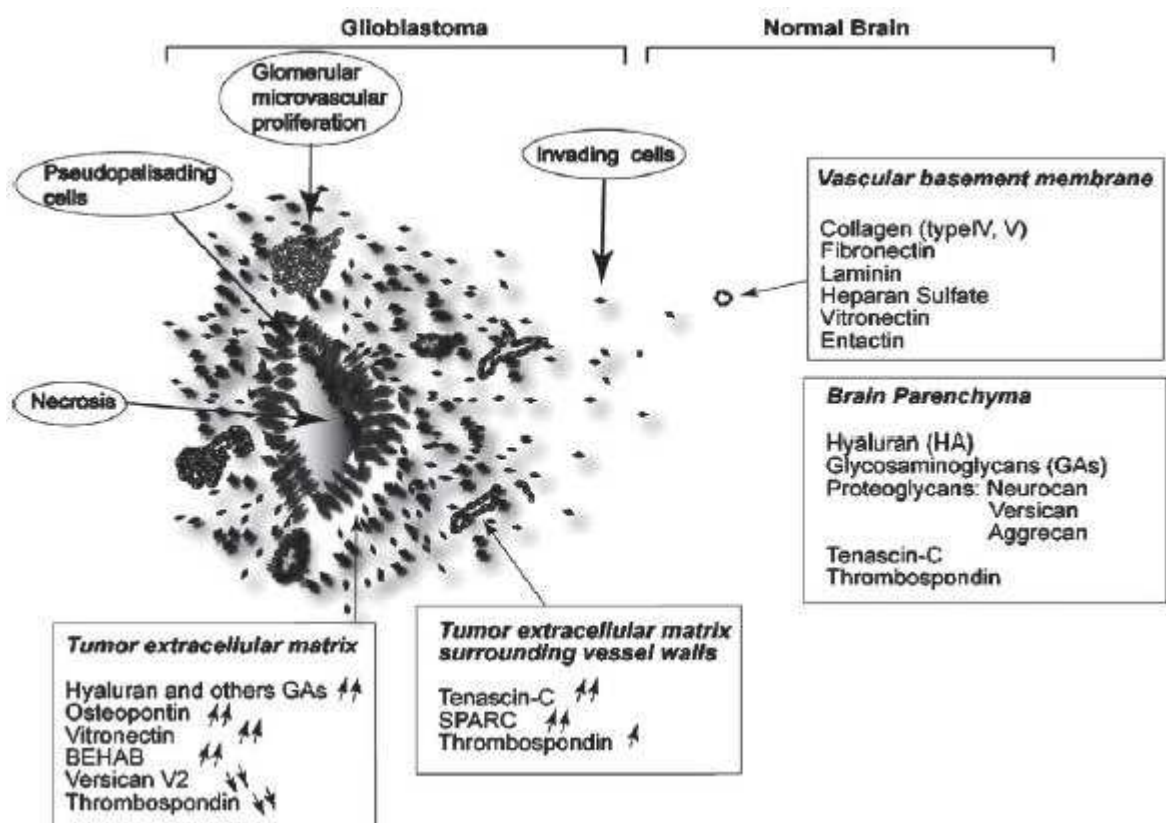


Figure 21. Les modifications de la composition de la MEC des glioblastomes (d'après Bellail et al (Bellail et al., 2004)).

La MEC des glioblastomes est fortement enrichie en acide hyaluronique ainsi qu'en d'autres composants tels que l'ostéopontine, la vitronectine et la protéoglycane

BEHAB (Fig. 21). En revanche, l'expression du protéoglycane versicane et de la thrombospondine diminue (Fig. 21).

L'acide hyaluronique induit l'invasion des glioblastomes par deux mécanismes principaux *via* ses récepteurs cellulaires CD44 et RHAMM. D'un côté, il active la protéine FAK, qui à son tour transmet le signal *via* les facteurs ERK et NFκB, ce qui induit la sécrétion des métalloprotéines MMPs. De l'autre côté, l'acide hyaluronique déclenche la migration cellulaire *via* l'activation de la voie AKT et l'augmentation de l'expression de l'ostéopontine (Park et al., 2008). De son côté, l'ostéopontine favorise le maintien du caractère souche des gliomes et participe à la radorésistance par l'intermédiaire aussi du récepteur CD44 (Bonnans et al., 2014).

De même, l'ostéonectine ou SPARC est intensément exprimée dans les glioblastomes. Après transplantation dans le cerveau de rat, les cellules U-87, surexprimant l'ostéonectine, sont hautement invasives et migrent en formant des projections de type « finger-like » ou en masse dans le parenchyme ou au niveau du corps calleux (Bellail et al., 2004). Au contraire, la surexpression de la thrombospondine réduit la croissance tumorale des glioblastomes *via* un effet anti-angiogénique (Bellail et al., 2004).

Les protéoglycanes sont abondants dans la MEC du cerveau, mais leur rôle dans la malignité des glioblastomes est assez controversé. C'est le cas plus particulièrement des protéoglycanes à chaînes chondroïtine sulfates (CSPG) constituant la sous-famille des lécticanes. Initialement, il a été démontré que les CSPGs, présentes dans la MEC de certains gliomes, repoussent les astrocytes réactifs en dehors de la masse tumorale aboutissant à son encapsulation et à l'inhibition de l'invasion (Silver et al., 2013). Plus récemment, cette inhibition de l'invasion des gliomes a été attribuée aux chaînes de glycosaminoglycanes chondroïtine sulfate (CS-GAG) présentes dans les CSPGs (Silver and Silver, 2014). En revanche, une autre lécticanne appelée brévicanne ou BEHAB est fortement exprimée dans les glioblastomes et active leur invasion (Bellail et al., 2004).

La niche périvasculaire riche en collagène, fibronectine et laminine maintient les cellules souches de glioblastome, favorise leur auto-renouvellement et accélère ainsi la croissance tumorale (Wong and Kumar, 2014). La laminine, la fibronectine et le collagène de type IV stimulent la migration des gliomes *in vitro* (Tysnes et al., 1996).

De plus, sur des coupes histologiques de glioblastomes humains, la laminine et le collagène IV sont exprimés sur des cellules vasculaires et non vasculaires et sont localisés dans la membrane basale au niveau de la niche périvasculaire. L'expression de la fibronectine est quant à elle limitée au compartiment vasculaire. Les chaînes $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 5$ de la laminine sont exprimées par les cellules tumorales non-souches et par les cellules endothéliales au sein de la niche périvasculaire et la diminution de l'expression de la laminine $\alpha 2$ inhibe la croissance et l'autorenouveaulement des cellules souches de glioblastome (Lathia et al., 2012). De même, un autre composant essentiel de la niche périvasculaire des glioblastomes est la protéine matricellaire ténascine-C. Les coupes histologiques de glioblastomes humains présentent une immunopositivité supérieure à la ténascine-C au niveau des vaisseaux sanguins et dans la MEC en comparaison avec les gliomes de bas grade et cette expression est corrélée à un mauvais pronostic (Brosicke et al., 2013; Leins et al., 2003).

Les cellules de glioblastomes sécrètent aussi leur propre MEC. Par exemple, les lignées A172, KG1C, T98G et U251 synthétisent, assemblent et sécrètent les laminines Lm-211, Lm-411 et Lm-511 et en moindre quantité les laminines Lm-221, Lm-421 et Lm-521 *in vitro* (Kawataki et al., 2007). De la même façon, le collagène XVI est produit et exprimé par les lignées U-87, 86HG39 et la culture primaire TB288 *in vitro* et est fortement exprimé dans les cellules de glioblastome et au niveau des vaisseaux sanguins sur les coupes de tumeurs humaines (Senner et al., 2008).

Enfin, de nouvelles matrices tridimensionnelles revêtues par différentes macromolécules ont été développées pour étudier l'importance de la composition biochimique de la MEC sur la progression des glioblastomes *in vitro*. Dans une première étude effectuée sur une matrice constituée de collagène de type I et d'acide hyaluronique, les auteurs ont montré que l'augmentation de la concentration en acide hyaluronique diminue la migration des cultures primaires de glioblastomes humains (Herrera-Perez et al., 2015). Conjointement, une autre étude développée sur une matrice composée de nanofibres de poly-caprolactone a démontré aussi que l'acide hyaluronique inhibe l'adhésion et la migration des cellules de glioblastome. En revanche, le revêtement des nanofibres par du collagène I ou du matrigel n'a aucun effet significatif sur la migration par rapport à la migration sur nanofibres non fonctionnalisées (Rao et al., 2013).

4.2- Rôle de la mécanotransduction dans le développement des glioblastomes

Les progrès achevés ces dernières années dans la fabrication de nouvelles matrices tridimensionnelles ont ouvert la voie à des études innovantes visant à identifier l'implication des différents paramètres physiques et mécaniques de la MEC dans le développement des glioblastomes. Les paramètres qui ont attiré le plus d'attention sont la topographie, la rigidité et la porosité.

Les cellules de glioblastome suivent la nanotopographie et l'alignement des fibres de la matière blanche et des vaisseaux sanguins au cours de leur migration dans le tissu cérébral. Plusieurs études ont donc cherché à décrire comment la topographie de la matrice influence la migration des glioblastomes. Parmi elles, Beliveau. A *et al* ont démontré que les lignées U-87 et A-172 ainsi que la tumeur primaire BT145 possèdent un cytosquelette moins rigide sur les nanofibres de poly-caprolactone alignées en comparaison avec les nanofibres enchevêtrées. Cette diminution de la rigidité est liée à une vitesse plus importante de la polymérisation/dépolymérisation des microfilaments d'actine et donc à un potentiel migratoire plus important. Les auteurs ont également observé une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, concomitante avec une élévation de l'expression des gènes engagés dans la migration sur les nanofibres alignées (Beliveau et al., 2016). De façon similaire, Agudelo-Garcia. P. A *et al* ont montré que les cellules U-87 et U-251 adoptent une morphologie allongée récapitulant celle observée au niveau des fibres de la matière blanche du cerveau et migrent dépendamment de la myosine II et de STAT3 sur les fibres alignées de poly-caprolactone. En comparaison, ces cellules ont une morphologie plate et une migration indépendante de la myosine II et de STAT3 dans une boîte de culture traditionnelle 2D de polystyrène (Agudelo-Garcia et al., 2011). Ces deux études montrent parfaitement que la migration des glioblastomes est régulée par les signaux nanotopographiques générés au sein de la MEC.

D'un autre côté, un lien a été établi entre la rigidité de la MEC et la régulation de certaines fonctions cellulaires fondamentales y compris la prolifération, la mobilité et l'expression génique. Concernant les glioblastomes, les matrices rigides favorisent leur prolifération, adhésion et migration (Wong and Kumar, 2014). Dans ce contexte,

Ananthanarayanan. B *et al* (Ananthanarayanan et al., 2011) ont développé un gel de méthacrylate-acide hyaluronique fonctionnalisé avec des motifs RGD dont la densité des ligands et la rigidité sont modulables séparément. Les auteurs montrent que la variation de la rigidité du gel affecte la morphologie et la migration des lignées cellulaires U-87 et U-373 humains et C6 de rats. En effet, à basse rigidité (150 Pa), les cellules sont rondes et le cytosquelette d'actine ainsi que la protéine vinculine des AFs ont une distribution diffuse. Alors qu'à haute rigidité (1-5 KPa), les cellules sont plus polarisées, moins circulaires et forment de longs lamellipodes. Conjointement, la vitesse de migration augmente significativement avec l'augmentation de la rigidité et atteint son maximum à 5 KPa. Cette étude a montré par ailleurs que l'adhésion cellulaire augmente avec l'augmentation de la densité des ligands RGD influençant la morphologie et l'organisation du cytosquelette d'actine (Ananthanarayanan et al., 2011).

Sur gel de poly-éthylène-glycol (PEG) revêtu d'acide hyaluronique, la prolifération de cellules U-87 est ralentie à haute rigidité (26KPa). Mais, à cette même rigidité, les cellules produisent plus de MMP-1 et de HA synthase 1, simultanément avec une activation de Hras, RhoA et ROCK1 induisant la migration (Wang et al., 2014). Au contraire, sur gel de poly-acrylamide, l'augmentation de la rigidité induit la prolifération de cellules de glioblastomes (U-87 et U-373). Cet effet serait dû à l'augmentation de l'expression et de la phosphorylation du récepteur EGFR et de son effecteur sous-jacent AKT (Umesh et al., 2014).

La différence de réponse des cultures primaires de glioblastomes à la variation de la rigidité de la MEC rend compte parfaitement de l'hétérogénéité inter-tumorale. C'est ce qui a été démontré par les travaux de Grundy. T. J *et al*, où sur un gel de polyacrylamide, les lignées primaires JK2, WK1, RN1, PR1 et SJH1 réagissent de manière différentielle aux changements de la rigidité. En fait, les lignées JK2, WK1, RN1, PR1 ont une morphologie variable en fonction de la rigidité allant jusqu'à une diminution significative de la migration sur les gels de faible rigidité, alors que la lignée SJH1 est complètement insensible et a la capacité invasive la plus prononcée sur les gels souples (Grundy et al., 2016). Ces différentes réponses à la variation de la rigidité observées entre les lignées seraient liées à leur sous-classement moléculaire tumoral (neural (SJH1) ou mésenchymateux (WK1)) (Grundy et al., 2016).

Enfin, un intérêt a été porté aussi à l'importance de la récapitulation de la porosité de la MEC cérébrale *in vitro* et à son effet sur l'agressivité des glioblastomes. Ainsi, une étude a montré que la culture des cellules U-118 sur une matrice 3D poreuse de chitosane et d'acide hyaluronique stimule leur caractère souche *via* une augmentation de l'expression des marqueurs CD44, Nestin, Musashi-1, GFAP et HIF-1 α en comparaison avec la culture 2D. Sur cette matrice poreuse, les cellules sont plus invasives et résistantes aux traitements chimiothérapeutiques (Florczyk et al., 2013). La taille des pores de la MEC joue également un rôle dans l'invasion des cellules de glioblastomes (Yang et al., 2010). Ainsi, en variant la température de gélification d'une matrice constituée de collagène de type I afin de contrôler la taille des pores indépendamment de la concentration, les auteurs ont montré que la migration de cellules C6 (glioblastome de rats) est complètement inhibée en présence de pores de taille de 2 à 3 μm . Tandis que la distance d'invasion ne change pas pour des pores dont la taille est comprise entre 5 et 12 μm et au-delà.

4.3- Rôle des intégrines dans le développement des glioblastomes

La transduction des signaux de la MEC et l'altération résultante des fonctions cellulaires dans les glioblastomes sont médiées par un ensemble de récepteurs membranaires. Par exemple, le récepteur CD44 à l'acide hyaluronique est fortement exprimé dans les glioblastomes ; il participe à l'induction de la prolifération *via* l'activation de ERK et AKT et de la voie EGF ; augmente l'adhésion à la laminine, à la fibronectine et au collagène et favorise l'invasion ainsi que la résistance aux thérapies standards (Mooney et al., 2016).

D'autres récepteurs sont impliqués dans la transmission des signaux extracellulaires amenant à la progression des glioblastomes tels que les récepteurs à domaine discoidine DDR (Payne and Huang, 2013) et les récepteurs appartenant à la famille des intégrines.

Plusieurs intégrines jouent un rôle crucial dans l'initiation et la progression des gliomes. Les plus documentés sont les récepteurs $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$. Les intégrines liées au complexe αV ont une relevance supérieure que celles associées au complexe $\beta 1$ dans la progression tumorale (Schittenhelm et al., 2016). Ainsi, les

récepteurs $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ sont associés à l'angiogenèse dans les tumeurs astrocytaires et sont exprimés aussi bien dans les cellules tumorales que dans les cellules endothéliales (Bello et al., 2001). L'expression de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ est corrélée au grade histologique et est significativement plus importante dans les glioblastomes en comparaison avec les gliomes de bas grade (Schnell et al., 2008). De plus, les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ sont impliquées dans la radiorésistance des lignées de glioblastomes U-87 et SF-763 *via* ILK (Integrin Linked Kinase) et la GTPase RhoB (Monferran et al., 2008).

D'un autre côté, l'intégrine $\alpha 5$ a un rôle très important dans les interactions cellule-cellule et cellule-MEC dans les glioblastomes. C'est la conclusion des travaux de Blandin. A. F et al, qui ont démontré que l'intégrine $\alpha 5$ permet la dissémination des glioblastomes en présence d'un microenvironnement riche en fibronectine alors qu'elle renforce la cohésion cellulaire en son absence (Blandin et al., 2016). Par ailleurs, l'expression de cette intégrine dans les glioblastomes est liée à leur résistance aux thérapies et son abrogation induit une apoptose à la suite de l'activation de P53 (Blandin et al., 2015).

Récemment, l'expression de certaines intégrines a été détectée exclusivement dans les cellules souches de glioblastome et non dans les cellules tumorales non-souches. Par exemple, l'intégrine $\alpha 3$ est surexprimée dans les cellules CD133+ en comparaison avec les cellules CD133- dans les quatre lignées de glioblastomes U87, U251, T98G et SNB19. Cette étude a démontré que l'intégrine $\alpha 3$ contribue à l'invasion des cellules souches de glioblastome *via* la phosphorylation de la protéine ERK1/2 (Nakada et al., 2013). De même, l'intégrine $\alpha 6$ a été identifiée comme un marqueur d'enrichissement des cellules souches de glioblastome, co-exprimée avec d'autres marqueurs tels que CD133 et Olig2. Ce même travail a également montré que la sous-unité $\alpha 6$ est associée particulièrement avec la sous-unité $\beta 1$ et non $\beta 4$ en formant un complexe actif engagé avec la laminine. Les auteurs ont enfin montré que les cellules exprimant $\alpha 6$ sont plus clonogéniques *in vitro*, s'auto-renouvellent et propagent plus efficacement des tumeurs secondaires *in vivo* chez les souris (Corsini and Martin-Villalba, 2010; Lathia et al., 2010).

En somme, l'altération de la composition biochimique et des propriétés mécaniques de la MEC joue un rôle essentiel au cours de la croissance et de l'invasion des

glioblastomes. Ces modifications sont accompagnées par des anomalies de l'expression et de l'activité signalétique des récepteurs de la MEC dont les intégrines.

5- Rôle de la glycosylation dans la progression du cancer

Les glycanes constituent un groupe de molécules variées et abondantes chez tous les organismes vivants (Vasconcelos-Dos-Santos et al., 2015). Ils sont fréquemment associés à des protéines pour former des glycoprotéines, ou des lipides formant des glycosphingolipides. La glycosylation de ces composants cellulaires joue un rôle essentiel dans la croissance, la différenciation, l'adhésion à la MEC et la migration (Vasconcelos-Dos-Santos et al., 2015). Différentes classes de glycosylation existent chez les protéines : la O-glycosylation et la N-glycosylation. Ces deux processus diffèrent par la nature de l'acide aminé sur lequel s'associent les glycanes : la thréonine ou la sérine dans la O-glycosylation ; l'asparagine dans la N-glycosylation. Les mécanismes de la biosynthèse de la O-glycosylation et la N-glycosylation sont aussi différents et aboutissent à des associations de glycans de structures et de fonctions différentes. Dans ce travail, nous décrivons seulement la N-glycosylation et son rôle dans le développement tumoral.

La N-glycosylation des protéines se déroule en plusieurs étapes dans le cytoplasme, d'une part dans le réticulum endoplasmique (RE) et d'autre part dans l'appareil de golgi (Fig. 22) (Vasconcelos-Dos-Santos et al., 2015). Cette modification post-traductionnelle s'initie par le transfert sur des résidus asparagine (NX \neq PS/T) d'un « high mannose N-glycan » ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) provenant du dolichol prophosphate. (Fig. 22). Ce « high mannose N-glycan » est ensuite traité successivement par des glucose transférases ou GlcT catalysant l'addition de Glucose (Glc) et des glucosidases qui procèdent à leur élimination. (Fig. 22) (Vasconcelos-Dos-Santos et al., 2015). Ces différentes étapes sont essentielles au bon repliement de la protéine. Un dérèglement de ce processus aboutira à une « unfolded protein response » qui se traduira par un stress du RE et l'engagement de la cellule dans un processus de mort cellulaire. La séquence du N-glycan associée est identique à toutes les protéines (Figure 22). Dans un deuxième temps, au sein de l'appareil de golgi, outre l'élimination de résidus mannose, une série d'enzymes à activité N-

acétylglucosaminyltransférase (MGAT) ajoutent des résidus de N-acétylglucosamine (GlcNac) aux mannoses et génèrent différentes ramifications (Fig. 22) (Vasconcelos-Dos-Santos et al., 2015) qui seront spécifiques de chaque type et état cellulaires. Parmi ces enzymes, la MGAT3 catalyse l'addition du GlcNac sur le mannose β 1,4 aboutissant à la formation de glycan dits intercalaires (Fig. 22) (Ihara et al., 1993). Ces N-glycans ne seront jamais multibranchées. Dans une autre voie, la MGAT5 catalyse l'ajout β 1-6 de GlcNac sur le mannose α 1,6 et génèrera des N-glycans multibranchées (Fig. 22) (Nagae and Yamaguchi, 2012). Une description plus détaillée du processus de la N-glycosylation est présentée dans la revue de Vasconcelos-dos-Santos *et al* (Vasconcelos-Dos-Santos et al., 2015).

L'activité de l'enzyme MGAT3 est impliquée dans la suppression des métastases (Nagae and Yamaguchi, 2012; Vasconcelos-Dos-Santos et al., 2015). Au contraire, celle de MGAT5 favorise la progression du cancer, et augmente la prolifération induite par les cytokines *in vitro* et stimule les métastases *in vivo* (Lau and Dennis, 2008). Dans les tumeurs gastriques, la modification de la N-glycosylation de la E-cadhérine par la MGAT3 augmente la stabilité des jonctions adhérentes au niveau de la membrane et diminue l'invasivité. Au contraire, l'activité de la MGAT5 déstabilise ces jonctions, inhibe l'adhésion cellule-cellule et augmente l'invasivité tumorale (Vasconcelos-Dos-Santos et al., 2015).

Les chaînes β 1,6-GlcNac produites par la MGAT5 sont les ligands privilégiés des galectines et principalement des galectine-1 -3 (Lagana et al., 2006). Les galectines sont des protéines qui possèdent un ou plusieurs domaines de reconnaissance des carbohydrates leur permettant de s'associer à des ligands glycosylés, jouant ainsi un rôle important dans l'activation, la compartimentalisation et l'endocytose des glycoprotéines et glycolipides membranaires (Nabi et al., 2015). La fixation de la galectine-3 sur les N-glycane multibranchés stimule le remodelage des plaques d'adhésion focale ; active les protéines FAK et PI3K ; augmente la dynamique des filaments d'actine ; permet la translocation de l'intégrine α 5 β 1 vers les adhésions fibrillaires et stimule la polymérisation de la fibronectine (Laferte and Dennis, 1988). L'ensemble de ces modifications régule le remodelage de la MEC contenant la fibronectine et augmente la migration des cellules tumorales mammaires (Lagana et al., 2006). De même, la fixation de la galectine-3 sur les N-glycane décorant la N-

cadhérine déstabilise les jonctions adhérentes dans les cellules de carcinomes mammaires, modulant ainsi leur adhésion, migration et signalisation intracellulaire (Boscher et al., 2012).

En conclusion, l'altération du profil de glycosylation des cellules cancéreuses affecte les interactions cellule-cellule et cellule-MEC induisant la migration et les métastases tumorales.

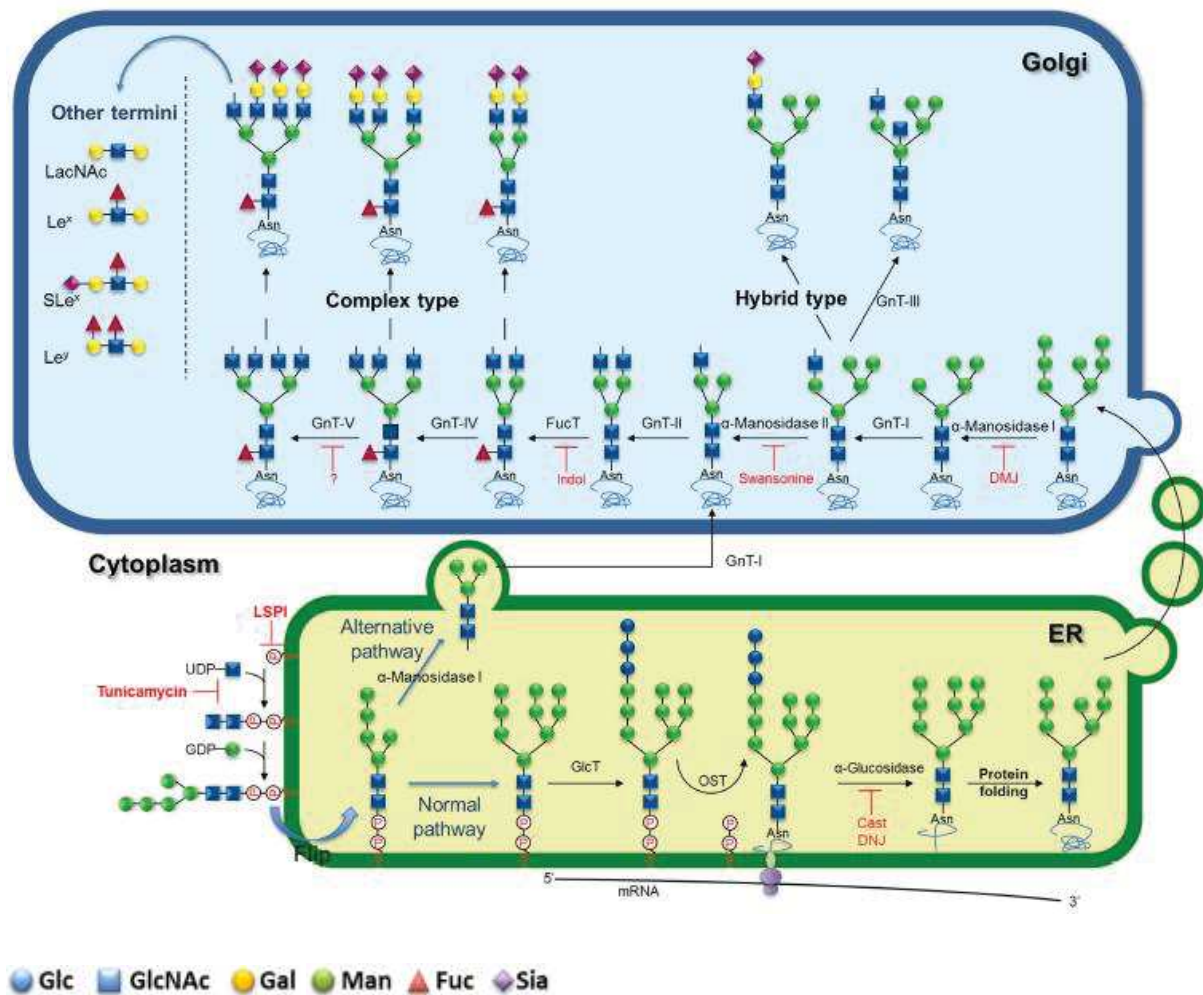


Figure 22. Représentation schématique de la biosynthèse des N-glycanes. Asn = asparagine, GnT = N-acétylglucosaminyltransférase ou MGAT, GlcT= glucose transférase, Glc = glucose, GlcNac = N-acétylglucosamine, Gal = galactose, Man = mannose, Fuc = fucose, Sia = acide sialique (d'après Vasconcelos-dos-Santos. A et al, (Vasconcelos-Dos-Santos et al., 2015)).

Objectifs

Comme nous venons de le voir, la migration et l'invasivité des cellules de glioblastome est un obstacle majeur à la thérapie de cette pathologie fatale. Nous avons vu également que la complexité des mécanismes engagés dans la migration cellulaire des cellules tumorales nécessite une approche prenant compte de cette complexité.

Avant mon arrivée en thèse, les travaux de l'équipe du Pr. Bakalara ont abouti à la mise en place d'une nouvelle molécule anti-cancéreuse appelée Phostine (PST). Cette molécule a été développée en collaboration avec les professeurs Jean-Luc Pirat et David Virieux de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier. En testant son effet sur une série de lignées cellulaires cancéreuses de l'Institut National du Cancer (NCI), les résultats ont montré sa spécificité contre le cluster des tumeurs du système nerveux central qui contient également deux lignées du cancer du sein triple négatives et une lignée de cancer du poumon (Clarion et al., 2012). Les premiers résultats *in vitro* sur des cellules souches de glioblastome (CSG) ont montré que l'effet anti-migratoire de la phostine est de l'ordre du nanomolaire (nM) alors que son activité anti-proliférative est dans l'ordre du micromolaire (μ M). Le mécanisme d'action de cette molécule inhibe donc spécifiquement la migration des CSG (Hassani. Z. *et al*, accepted *Molecular cancer Research*).

Ainsi dès mon arrivée au laboratoire du Pr. Bakalara, je me suis intégré dans les travaux de caractérisation des effets anti-migratoires de la PST. Jusque là, ces mécanismes étaient encore inconnus. La PST est un glycomimétique (Clarion et al., 2012). Ainsi, l'hypothèse de travail qui a été émise est qu'elle interférerait avec les mécanismes de glycosylation des protéines et lipides cellulaires. Or, comme nous avons vu précédemment, l'adhésion cellule-cellule, cellule-MEC et la migration des cellules tumorales sont corrélées à l'altération du profil de glycosylation. De plus, d'autres travaux ont démontré que la modification des oligosaccharides décorant les molécules de la surface cellulaire induit l'invasion des tumeurs cérébrales (Moskal et al., 2009). Ces aberrations sont dues à l'expression et à l'activité des deux enzymes : la N-acétylglucosaminyltransférase 3 (MGAT3) et la N-acétylglucosaminyltransférase 5 (MGAT5) (Yamamoto et al., 2000).

D'un autre côté, des glycomimétiques ont été développés contre les diabètes de type 2, les infections virales et bactériennes ainsi que les maladies cardio-vasculaires

(Hudak and Bertozzi, 2014). Pourtant, leur utilisation dans les thérapies anticancéreuses reste encore très limitée.

Durant mes trois années et demie de thèse, j'ai participé aux travaux qui ont eu pour but de tester l'action de la phostine sur l'activité des enzymes MGAT3 et MGAT5. J'ai participé également à l'étude de l'effet de la phostine sur la modulation de différentes voies de signalisation impliquées dans l'interaction avec la MEC et la migration des cellules CSG. Egalement, j'ai contribué aux expérimentations *in vivo* dans le but d'évaluer l'effet anti-invasif de la phostine sur les lignées primaires de tumeurs issues des patients humains et xenotransplantées à l'intérieur du cerveau des souris immunodéprimées. L'ensemble de ces travaux ont amené à l'élaboration de l'article intitulé « PHOSTINE PST3.1a TARGETS MGAT5 AND INHIBITS INVASIVENESS AND PROLIFERATION OF GLIOBLASTOMA INITIATING CELLS », qui a été accepté dans le journal « *Molecular Cancer Research* ». Cet article constituera la première partie des résultats de mes travaux de thèse.

En plus de cette première partie concernant la caractérisation de l'effet anti-migratoire de la phostine, le projet central de ma thèse correspond au développement d'une nouvelle matrice tridimensionnelle (3D) de nanofibres (NF) pour étudier les mécanismes de la migration des cellules de glioblastome *in vitro*. Le but est d'étudier les effets de la variation des composantes biochimiques et mécaniques de la MEC sur la migration des CSG. La mise en place de ce support prend son intérêt dans la perspective de l'utiliser pour tester l'efficacité des molécules anti-migratrices ciblant les glioblastomes, y compris la phostine, dans des conditions physiologiques et plus représentatives du microenvironnement cérébral que les modèles de cultures classiques bidimensionnels (2D).

Comme nous l'avons vu, les composantes biochimiques et mécaniques de la MEC jouent un rôle clé dans la croissance, la migration et l'invasion des glioblastomes. Elles modulent également la sensibilité des CSG aux thérapies actuelles. De même, les récepteurs membranaires de la MEC, dont spécialement les intégrines, régulent l'auto-renouvellement et l'invasion de ces cellules souches tumorales.

Ces caractéristiques de la MEC sont pauvrement récapitulées par les modèles de culture classiques bidimensionnels comme la chambre de Boyden, la migration radiale ou les essais de « wound-healing ». Les signaux physiques fournis par ces

cultures, tels que la rigidité et la topographie, ne ressemblent pas à ceux générés à l'intérieur de la MEC du cerveau (Rao, SS et al, Tissue Engineering: Part B, 2014). D'autres modèles de culture d'organes *ex vivo* ou de xénogreffes orthotopiques *in vivo* ont vu le jour pour combler les limites de la culture 2D. Alors que ces essais correspondent discutablement à la meilleure approximation des conditions trouvées chez les patients, ils présentent certains désavantages : la variabilité inter-individuelle, l'incapacité de contrôler toutes les composantes du microenvironnement et le coût de ces approches limitent leur utilisation (Rao et al., 2014).

Dans ce contexte, le développement de nouvelles matrices tridimensionnelles permettant de contrôler les composantes du microenvironnement et notamment celles de la MEC est devenu indispensable. Toutefois, ces modèles restent encore lacuneux et méritent des perfectionnements. Par exemple, les hydrogels possèdent une flexibilité et une densité qui sont facilement manipulables et qui permettent de mimer les propriétés biophysiques de la MEC du cerveau. Pourtant, leur teneur importante en eau, leur taux élevé de dégradation et leur cytotoxicité ont stimulé la recherche d'autres méthodes alternatives (Shologu et al., 2016). De même, la mise en œuvre de tissus décellularisés et des puces de criblage à haut débit de la MEC (Braga Malta et al., 2016), permettant de mimer loyalement la composition et l'organisation de la MEC, manque toujours de standardisation et de reproductibilité (Shologu et al., 2016).

La production de NF par électrospinning a permis de surpasser un certain nombre d'inconvénients rencontrés dans d'autres modèles 3D. L'interconnectivité des fibres crée un réseau poreux idéal pour l'étude de l'invasion des cellules tumorales. De plus, les NF miment l'architecture et la topographie de la MEC des tissus et peuvent être fonctionnalisées avec diverses macromolécules biologiques (Shologu et al., 2016). Cependant, plusieurs problèmes liés à leur usage subsistent toujours tels que la faible infiltration des cellules, l'incorporation limitée des facteurs de croissance et de différenciation et la cytotoxicité des solvants utilisés (Agarwal et al., 2009).

Ainsi, dans le but de surmonter les obstacles rencontrés au cours de l'utilisation des supports cités auparavant, nous avons développé et caractérisé une nouvelle matrice de NF. Cette matrice a été fabriquée à partir de polymères de XPX (composition protégée). Ces NF de XPX ont été élaborées et optimisées par le

professeur David Cornu et Aziz Chérifi à l'Institut Européen des Membranes (IEM) à Montpellier. Dans ce contexte, la première étape de ma thèse consistait à étudier les propriétés physiques de ces NF telles que leur auto-fluorescence, ainsi que l'alignement et le diamètre des fibres qui les constituent. L'étape suivante était de cultiver des neurosphères de CSG sur ce nouveau support et d'analyser leur viabilité ainsi que leur comportement migratoire.

L'objectif principal de ce travail étant d'étudier l'interaction des CSG avec la MEC, la démonstration de la tridimensionnalité du microenvironnement généré par les NF s'est avérée d'une importance capitale. Je me suis donc intéressé à l'étude de la répartition et de l'infiltration des cellules à l'intérieur du réseau.

Afin de comparer notre modèle de NF à la culture classique en 2D vis-à-vis principalement de l'intégration des signaux externes de la matrice, j'ai analysé le niveau d'expression des récepteurs membranaires de la MEC (intégrines $\alpha6$ et $\beta1$), des lectines (galectine-3) et des protéines impliquées dans les voies de signalisation sous-jacentes sur les supports 2D et 3D fonctionnalisés ou non avec de la laminine. Notamment, j'ai analysé la dynamique des composants des plaques d'adhésion focale et j'ai comparé les résultats obtenus avec un modèle de xénogreffes orthotopiques de glioblastomes chez la souris.

Après cette première phase dans laquelle mon travail avait pour objectif de démontrer la validité de notre matrice 3D, j'ai étudié l'importance des composantes physiques et biochimiques de la MEC au cours de la migration des glioblastomes sur les NF. Ainsi, j'ai choisi de travailler dans des conditions qui miment la topologie et la composition biochimique de la MEC cérébrale naturelle et de tester l'effet de la modulation de ces caractéristiques de la MEC sur la migration des CSG. Dans leur environnement cérébral *in vivo*, les cellules de glioblastome suivent l'alignement des fibres myélinisées de la matière blanche à l'intérieur du corps calleux (Fig. 23) (Bellail et al., 2004). Afin d'étudier le rôle de la topologie de la MEC dans la migration des CSG, j'ai comparé la direction de migration de ces cellules sur des NF enchevêtrées par rapport à leur direction de migration sur des fibres alignées. Du point de vue biochimique, j'ai fonctionnalisé les NF avec de la laminine afin de récapituler la composition de la MEC de l'espace périvasculaire cérébral et de la membrane basale

entourant les vaisseaux sanguins. De même, j'ai étudié l'influence de la présence ou l'absence de la laminine sur le mode migratoire et la distance de migration des CSG.

L'ensemble de ces résultats a donné lieu à une publication en cours de préparation, qui sera présentée dans la deuxième partie de mes résultats de thèse.

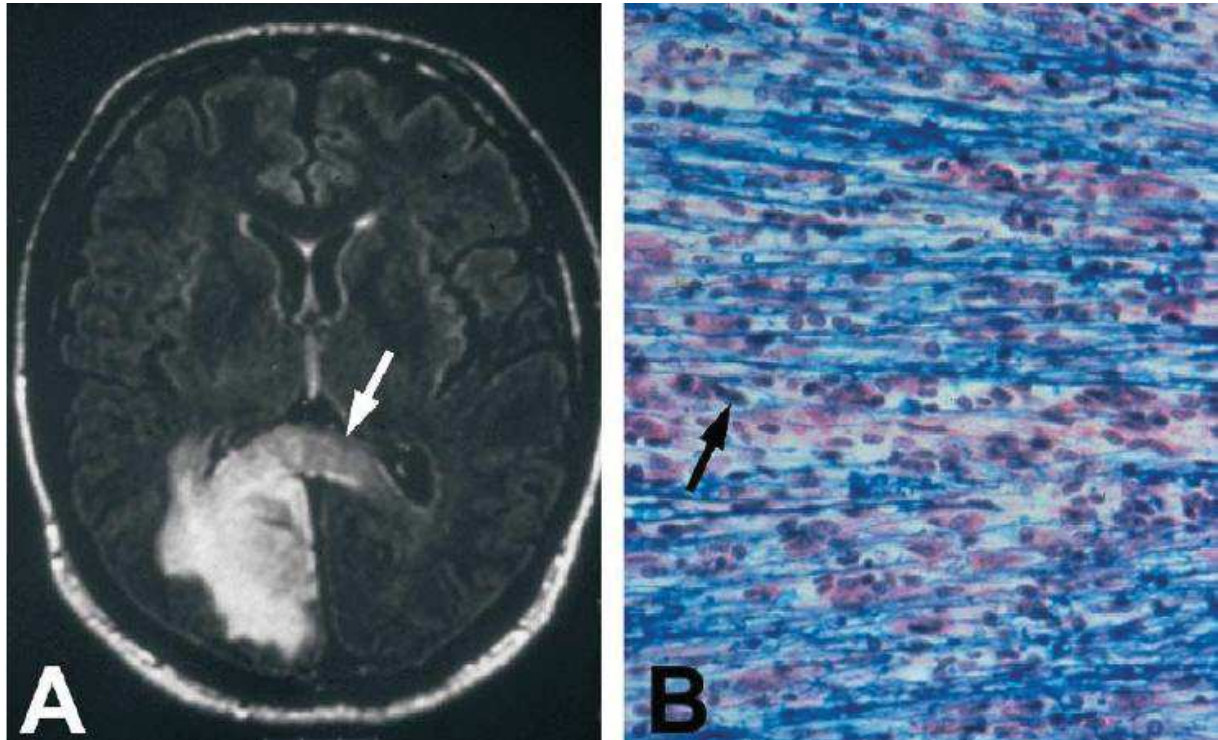


Figure 23. L'invasion du corps calleux par les cellules de glioblastome. (A) Passage des cellules de glioblastome (flèche blanche) vers l'hémisphère controlatéral *via* le corps calleux. (B) Coupe histologique du corps calleux montrant l'infiltration des cellules de glioblastome entre les fibres alignées de la matière blanche (flèche noire). Les fibres du corps calleux apparaissent en bleu (d'après Bellail. AC *et al*, (Bellail et al., 2004)).

Résultats

Partie I

La Phostine PST3.1a modifie le profil de Glycosylation et inhibe l'Invasion et la Prolifération des Cellules Souches de Glioblastome

Introduction

La migration cellulaire en général et celle des cellules tumorales astrocytaires en particulier est un processus compliqué faisant intervenir au moins trois fonctions biologiques indépendantes et hautement coordonnées. Ce sont (1) l'adhésion à la MEC *via* principalement les intégrines ; (2) la réorganisation du cytosquelette d'actine et (3) l'invasion nécessitant la dégradation et le remodelage de la MEC par les protéases. De plus, bien que la survie et la résistance à l'apoptose ne soient pas impliquées directement dans le processus migratoire, ces deux fonctions biologiques sont essentielles pour la réussite du processus invasif.

Les avancées de ces dernières années ont permis d'acquérir des connaissances précises sur toutes ces fonctions biologiques et sur les différents acteurs et voies de signalisation impliqués. Ceci a ouvert la voie vers l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques visant à limiter la dissémination des glioblastomes.

L'identification du rôle anti-adhésif et pro-migratoire de la ténascine-C de la MEC du cerveau durant l'invasion des glioblastomes a abouti à la mise en place d'essais cliniques en phases I and II d'un anticorps anti-ténascine (81C6 mAb). Cet anticorps a été administré directement dans la cavité post-opératoire de patients souffrant d'un glioblastome récurrent ou nouvellement diagnostiqué (Lefranc et al., 2005). De même, la surexpression de certaines intégrines et leur rôle dans l'adhésion et la migration des cellules de glioblastome ont amené au développement de certains inhibiteurs dont le plus connu est le cilengitide (phase clinique III). Cette molécule est un pentapeptide cyclique qui bloque sélectivement l'activation des intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ connues pour leur rôle dans l'angiogenèse, la croissance mais aussi les métastases des glioblastomes (Wilson et al., 2014).

D'un autre côté, l'altération de la polymérisation et du remodelage des microfilaments d'actine joue un rôle important dans la migration des gliomes. Des approches utilisant des produits modulant la polymérisation de l'actine, ou des inhibiteurs des protéines GTPases oncogéniques (Rac, Rho, CDC42), ainsi que la surexpression des protéines suppresseurs de tumeurs se liant à l'actine (gelsoline), sont en cours de développement (Giganti and Friederich, 2003; Rao and Li, 2004).

L'inhibition de la synthèse et de la sécrétion des protéases remodelant la MEC fait également partie des stratégies thérapeutiques visant à atténuer l'invasion des glioblastomes. Différents inhibiteurs des métalloprotéinases (MMP), des cathépsines et des uPAs sont en cours de développement (Rao, 2003).

Les récepteurs à activité tyrosine kinase tel que EGFR sont associés à la migration des glioblastomes. Les thérapies moléculaires ciblant ces récepteurs correspondent à des anticorps monoclonaux (cetuximab) ou à des inhibiteurs spécifiques de l'activité tyrosine kinase (gefitinib, erlotinib, lapatinib et canertinib) (Tanase et al., 2013). Par exemple, il a été démontré que géfitinib réduit la migration des tumeurs primaires de glioblastome cultivées *ex vivo* sur des coupes organotypiques et ceci en ciblant le récepteur EGFR (Parker et al., 2013).

Les voies de signalisation activées par EGFR et qui sont impliquées dans la migration, la survie et la résistance à l'apoptose des cellules migratrices de glioblastomes ont également été ciblées. Ainsi, plusieurs inhibiteurs sont développés pour cibler les voies PI3K/AKT (wortmannin, staurosporine, quercetin) et mTOR (PI-103, torin, Ku-0063794) (Tanase et al., 2013).

Les phostines sont des composés synthétiques appartenant à la famille des oxaphosphinanes. Ces molécules ont été développées au sein de notre équipe. Ce sont des glycomimétiques constitués d'un cycle de pyranose dans lequel le carbone anomérique a été substitué par un phosphore (Fig. 24).

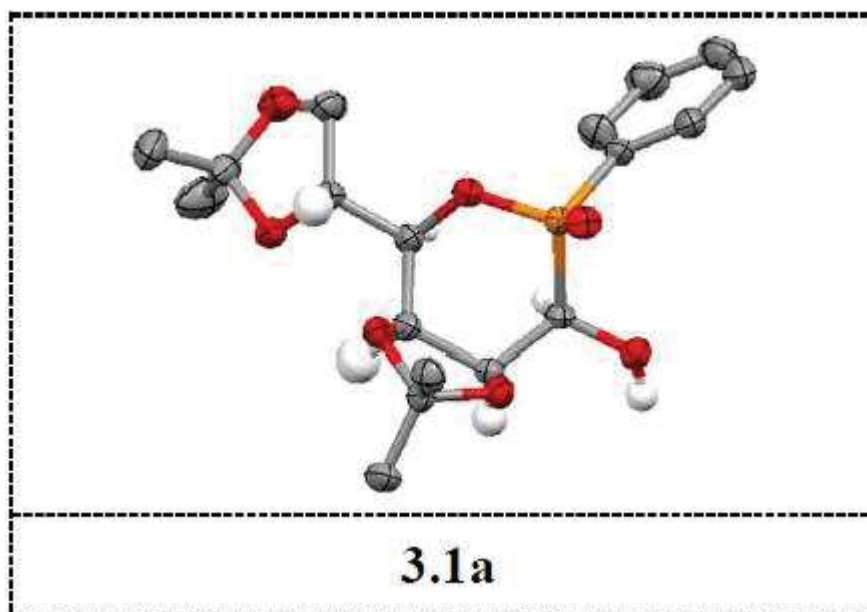


Figure 24. Structure ORTEP du composé 3.1a (d'après Clarion. L *et al*, (Clarion et al., 2012)).

En fonction des modifications chimiques effectuées sur l'atome de phosphore ou du carbone adjacent et de la disposition stéréoisomérique, vingt-six composés différents sont obtenus. L'activité antiproliférative des différents composés de la famille des phostines a été mesurée sur plusieurs lignées cellulaires de glioblastomes et d'autres cancers humains et de souris ainsi que sur des cultures primaires de glioblastomes humains (Gli4 et Gli7). A l'issue de cette étude, deux composés ont été sélectionnés pour des tests de migration : le composé « 3.2a » grâce à son activité antiproliférative spécifique des glioblastomes et le composé « 5.3d » ayant une activité étendue sur différentes lignées cellulaires (Clarion et al., 2014).

Ainsi, l'activité anti-migratrice de ces deux composés a été testée sur les cultures primaires Gli4 et Gli7 de cellules souches de glioblastomes et sur les lignées SNB75 et C6 cultivées sur de la fibronectine, la laminine et la vitronectine en 2D. Les auteurs de cette étude montrent que les deux phostines « 3.2a » et « 5.3d » inhibent la migration des CSG et d'autres lignées cellulaires aussi bien sur la fibronectine que sur la laminine ou la vitronectine avec des valeurs de K_i de l'ordre du nanomolaire (nM). Toutefois, les valeurs de la constante d'inhibition K_i de la migration sont différentes en fonction de la composition biochimique de la MEC et ceci sur une même lignée cellulaire et pour le même composé (Tableau 4).

Tableau 4. Effet anti migratoire des composés « 3.2a » et « 5.3d ». Effet mesuré sur les lignées Gli4, Gli7, SNB75 et C6 cultivées sur différentes matrices 2D constituées de laminine, fibronectine et vitronectine (d'après Clarion. L *et al*, (Clarion et al., 2014)).

Matrix context		Ki *(nM)					
		FN		VN		LN	
Compound		5.3d	3.2a	5.3d	3.2a	5.3d	3.2a
Cell line	Gli4	31 ±1	100 ±1	36 ±1	194 ±1	22 ±1	239 ±1
	GLI7	16 ±1	64 ±1	42 ±1	438 ±1	100 ±1	1048 ±1
	SNB75	124 ±1	19 ±1	100 ±1	66 ±1	60 ±1	27 ±1
	C6	126 ±1	27 ±1	300 ±1	47 ±1	77 ±1	25 ±1

Par exemple, les cellules de la lignée primaire Gli7 sont environ six fois plus résistantes à l'effet anti-migratoire du composé « 5.3d » quand elles sont en migration sur de la laminine en comparaison avec la fibronectine (Tableau 4). De plus, sur une matrice tridimensionnelle de matrigel, les cellules Gli7 sont plus sensibles que quand elles sont cultivées sur une matrice 2D de laminine (Clarion et al., 2014).

Ces études ont permis de démontrer l'activité anti-proliférative et anti-migratrice des PST. Or, le mécanisme sous-jacent de l'action de ces composés contre les cellules de glioblastome était encore inconnu. Dans l'article suivant intitulé « PHOSTINE PST3.1a TARGETS MGAT5 AND INHIBITS INVASIVENESS AND PROLIFERATION OF GLIOBLASTOMA INITIATING CELLS », nous avons caractérisé la phostine PST3.1a, pour laquelle il avait été mis en évidence une activité antiproliférative supérieure à celle du temozolomide et du paclitaxel sur les lignées SF295 et SNB75 de glioblastome (Clarion et al., 2012). Dans cette même étude, il avait été montré que les activités anti-proliférative et –migratoire de PST3.1a concernait uniquement le cluster des tumeurs cérébrales comme décrit par Ross et al (Ross et al., 2000). Dans la présente étude, nous montrons que l'activité antimigratoire de PST3.1a est supérieure à celle des PST5.3d et 3.2a. Mécanistiquement, nous démontrons que PST3.1a inhibe l'activité de l'enzyme MGAT5 ce qui résulte en l'inhibition des voies de signalisation de TGFR-β et de FAK qui se traduit par une diminution de l'expression des galectines-1 et -3. Ceci est associé à l'augmentation de l'expression du marqueur de progéniteurs neuronaux DCX et à une diminution de l'expression du marqueur de progéniteurs oligodendrocytaires OLIG2. PST3.1a perturbe l'organisation des microfilaments

d'actine et des microtubules induisant ainsi une diminution de l'invasion et de la prolifération des CSG. *In vivo*, PST3.1a diminue l'invasion des CSG dans le modèle de xéngreffe orthotopique et améliore la survie des souris en comparaison avec le temozolomide.

Publication 1

Phostine PST3.1a targets MGAT5 and inhibits invasiveness and proliferation of Glioblastoma Initiating Cells

Zahra Hassani, Ali Saleh, Soumaya Turpault, Salim Khiati, Willy Morelle, Jacques Vignon, Jean-Philippe Hugnot, Emmanuelle Uro-Coste, Philippe Legrand, Marcel Delaforge, Séverine Loiseau, Ludovic Clarion, Marc Lecouvey, Jean-Noël Volle, David Virieux, Jean-Luc Pirat, Hugues Duffau and Norbert Bakalara* .

Accepted in *Molecular Cancer Research*

PHOSTINE PST3.1a TARGETS MGAT5 AND INHIBITS INVASIVENESS AND PROLIFERATION OF GLIOBLASTOMA INITIATING CELLS

Zahra Hassani, Ali Saleh, Soumaya Turpault, Salim Khiati, Willy Morelle, Jacques Vignon, Jean-Philippe Hugnot, Emmanuelle Uro-Coste, Philippe Legrand, Marcel Delaforge, Séverine Loiseau, Ludovic Clarion, Marc Lecouvey, Jean-Noël Volle, David Virieux, Jean-Luc Pirat, Hugues Duffau and Norbert Bakalara* .

Running title: Phostine PST**3.1a** affects N-glycosylation in glioblastoma

Keywords: Glioblastoma initiating cells, Mgat5, phostine, invasion, epithelial mesenchymal transition.

Financial support: N. Bakalara, P. Legrand, M. Lecouvey, D. Virieux, J.N. Volle, J.L. Pirat E. Uro-Coste and Ali Saleh were supported by the ANR-PCV (G2O), ANR Emergence-Bio (IDEPHOST), SATT (AxLR), INCA (formation des medecins), the Région Languedoc-Roussillon-Midi Pyrénées and the ENSCM. L. Clarion, Z. Hassani, S. Loiseau and S. Turpault were supported by Phost'IN SAS. The Mass Spectrometry facility (MALDI-TOF and MALDI-TOF/TOF) is funded by the European Community (FEDER). The Région Nord-Pas de Calais (France) and the Université des Sciences et Technologies de Lille I support W. Morelle.

*Corresponding author : Norbert Bakalara, Ecole Nationale Supérieure Chimie Montpellier - 8 Rue de l'École Normale, 34090 Montpellier cedex 5. France. FAX: +33 (0) 4 99 63 60 20.

norbert.bakalara@enscm.fr

Conflict of interest: L. Clarion, J.N. Volle, M.Lecouvey, D.Virieux, J.L.Pirat and N. Bakalara are co-inventors on two filed patents protecting PST3.1a, and exploited by Phost'IN SAS. L. Clarion, Z. Hassani, S. Loiseau and S. Turpault are employees of Phost'IN SAS. All the data (except for the glycoprofile) have been generated within the academic structures. Quantification, analysis and interpretation of the data have been done under the control of the academic structures.

Abstract

Glioblastoma multiforme is the most common primary malignant brain tumor and accounts for approximately 65% of all primary brain tumors. Median survival after treatment is around 15 months. Remodeling of N-glycans controlled by the N-acetylglucosamine glycosyltransferase Mgat5 regulates tumoral development. We demonstrate that perturbation of Mgat5 enzymatic activity by the small molecule 3-Hydroxy-4,5-bis-benzyloxy-6-benzyloxymethyl-2-phenyl-2-oxo-2λ5-[1,2]oxaphosphinane (PST**3.1a**) restrains Glioblastoma (GBM) growth. In cell based assays we showed that PST**3.1a** alters the β1,6-GlcNAc N-glycans of GBM Initiating Cells (GIC) by inhibiting Mgat5 enzymatic activity, resulting in the inhibition of TGFβ-R and FAK signaling associated with DCX down-regulation and OLIG2 increase of expression. PST**3.1a** thus affects microtubules and microfilaments integrity of GBM stem cells, leading to the inhibition of GIC proliferation, migration, invasiveness and clonogenic capacities. Orthotopic graft models of GIC showed that PST**3.1a** treatment leads to a drastic reduction of their invasive and proliferative capacities and to an increase of mice overall survival compared to the standard temozolomide treatment. Finally, bioinformatics analyses revealed that PST**3.1a** cytotoxic activity is positively correlated with the expression of genes of the Epithelial-Mesenchymal Transition, while the expression of mitochondrial genes correlate negatively with cells sensitivity to the compound. This novel anti-invasive chemotherapy might offer substantial promise for the future treatment of Glioblastoma.

Introduction

Control of cell surface glycosylation homeostasis occurs during cell proliferation, differentiation and invasiveness and has been correlated with adaptation to the microenvironment and to disease development (Ohtsubo and Marth, 2006). Mannoside acetyl glucosaminyltransferase 5 (Mgat5) over-expression is associated with malignancies and correlates with cell migration, invasion, and epithelial mesenchymal transition (EMT) (Chaney et al., 1989; Dennis et al., 1987; Lau and Dennis, 2008). Mgat5 located in the medial Golgi catalyses the addition of β 1,6-N-acetylglucosamine (GlcNAc) to selectively generate tri (2,2,6)- and tetra- (2,4,2,6)antenna-like oligosaccharides, intermediates of complex type N-glycans (Shoreibah et al., 1993). Gliomas express highly variable levels of Mgat5 mRNA (Yamamoto et al., 2000), and Mgat5 enzymatic activity changes through the course of glioma genesis (Padhiar et al., 2015; Ross et al., 2000). This leads to a dynamic adhesion of the cells to the ExtraCellular Matrix (ECM), which appears crucial for GBM invasiveness (Gu and Taniguchi, 2008; Guichet et al., 2013). GBM recurrent lesions are formed by heterogeneous but widely infiltrative small anaplastic cells responsible for the fatal outcome (Burger et al., 1983).

Glycans and glycan mimetics have been successfully engineered as therapeutic agents against type II diabetes, viral and bacterial infectious diseases and cardio-vascular pathologies (Hudak and Bertozzi, 2014). No organ toxicity (Granovsky et al., 2000), brain malformation, cell number and architecture (Lee et al., 2012) were observed in $Mgat5^{-/-}$ mice in which N-glycan products were missing. Moreover in these mice mammary tumor growth and metastases induced by the polyomavirus middle T oncogene were drastically reduced (Granovsky et al., 2000). These results confirmed the initial observations showing that MDAY-D2 cells deficient in Mgat5 activity lose their metastatic potential (Dennis et al., 1987).

We have established a strategy based on rational drug design to create glycomimetic compounds - phosphinosugars also called phostines - in which the hemiacetal group of an hexopyranose was replaced by a chemically and configurationally stable phosphinolactone group (Clarion et al., 2014; Clarion et al., 2012) with the aim to interfere with glycosylation in cancer cells. *In vitro* screening of

several derivatives bearing this scaffold described by Clarion *et al* (Clarion et al., 2014; Clarion et al., 2012) revealed potent activities. Among the active phosphines, the compound PST3.1a (3-Hydroxy-4,5-bis-benzyloxy-6-benzyloxymethyl-2-phenyl-2-oxo-2λ5-[1,2]oxaphosphinane, Fig. 1A) was selected according to a versatile screening based on cellular phenotype assays linked to cell glycosylation alterations combined with enzymatic activity tests.

In this paper, we decipher the mode of action of PST3.1a, selected for its ability to inhibit Mgat5, its stereoselectivity and selectivity towards the CNS cluster within the NCI panel of cancer cell lines (Clarion et al., 2012). Physiological and signaling effects of PST3.1a were analyzed on two GIC lines (Gli4 and GliT) grown either in proliferation or differentiation conditions (Guichet et al., 2013). The resultant effects were mostly similar to those triggered by siRNA-mediated inhibition of Mgat5 expression. The *in vivo* pharmacological activity of PST3.1a was then evaluated in orthotopic graft models of GBM using Gli4 and GliT. Finally, using the NCI-60 cancer cell line panel, we showed that mitochondrial genes expression was negatively correlated with PST3.1a cytotoxicity, while the expression of genes involved in EMT was positively correlated with the response.

Materials and Methods

GBM initiating cells and GBM cell lines

GBM stem cells were obtained using the classical non-adherent NS isolation and culture method as described in Dromard *et al* (Dromard et al., 2008) and adapted by Guichet *et al* for Gli4, Gli7 (Guichet et al., 2013) and GliT. SNB75 cells were obtained in 2010 from Prof Shoucheng Ning and Prof. Susan J. Knox (University of Stanford). All cells were checked monthly for mycoplasma (LT07-418, Lonza) and used under passage 15.

Animals

All experiments involving animals were submitted to the local committee (division départementale de la protection des populations de l'Hérault) and approved under the Project Licence: C34-172-36. The lead experimenter holds a Level 1 Personal Licence under the reference: I-34UnivMontp-F1-12.

Drug addition

Phostine solutions were prepared in 100% DMSO and diluted to obtain in each condition a final percentage of 0.3% DMSO.

Cytotoxicity

The MTT assay was carried out as previously described at 48 and 72h after drug addition (Clarion et al., 2012). The number of cells per distance of migration was quantified using the Axio Imager software. Briefly, concentric arcs were defined from the center of the sphere with regular intervals (see inset Fig. 4) and the number of cells present between two successive arcs was counted, defining a number of cells by range of migration.

Migration and invasion

For migration experiments, inserts of Boyden chambers (BD Biosciences) were coated overnight with 20 µg/mL of either laminin, fibronectin, or vitronectin (BD Biosciences). For invasion, 100 µL of matrigel (BD Matrigel TM Matrix, mouse EHS tumor, LDEV; BD Biosciences) was diluted 33 times in PBS and added onto the insert. Cells (50×10^5) suspended in DMEM supplemented with 0.1% BSA were plated into the upper compartment and incubated for 24 h with and without treatment. Cell culture medium (0.5 ml) containing 10% FCS was placed in the lower compartment to facilitate chemo-attraction. Cells attached to the lower side were counted using a Zeiss axiophot microscope.

Optimization of PST3.1a formulation for *in vivo* applications

We developed a nanosuspension using the nanoedge™ technology allowing a *per os* administration of doses up to 50 mg/kg. The average particle size was estimated at 300 nm with a polydispersity index around 0.15.

For the detection and quantification of PST3.1a in the brains, 3 mice were treated with 27mg/kg of PST3.1a by *per os* administration. The animals were sacrificed 1h post-treatment by lethal administration of pentobarbital. After exsanguination and washing with 5mL of NaCl, the brains were removed and stored at -80°C until shipment. The quantifications and analyses were performed by amatsiavogadro group.

Xenotransplantation

Gli4 or GliT cells were dissociated and resuspended in PBS at 5×10^5 cells per μL . Three microliters (1.5×10^5 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 anesthesia. At the end of the surgery, the remaining cells were seeded to check for cell viability. Transplanted animals were allocated randomly to each treatment group by the end of the surgery.

Ten weeks post-surgery, the animals were treated with 2 daily *per os* administrations of PST3.1a (15mg/kg) for 10 consecutive days. Control animals received the same volume of excipients. The animals were sacrificed at the end of treatment and the brains removed and processed for histochemistry.

For the survival study 1.5×10^5 Gli4 GIC cells were transplanted by stereotaxic injection into the striatum of Nude mice. Ten weeks post-transplantation, 28 mice were randomized in four groups: Control, PST3.1a, Temozolomide, PST3.1a + Temozolomide. PST3.1a was daily administered by oral gavage: 2 X 25mg/kg *per os*, for two cycles of 30 days separated 19 days. Temozolomide was administered IP : 3 cycles of 4 administrations (40mg/kg) every other day. Cycles were separated by 4 days.

Animals were sacrificed when signs indicating brain tumor development (prostration, hunched back, weight loss) were detected and their brain were checked for tumor growth.

Enzymatic activity

The enzymes, human recombinant Mgat3, Mgat5 and ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase3 (ENTPD3), were obtained from R&D System. The Mgat donor substrate, UDP-N-acetylglucosamine, was obtained from Sigma. The Mgat acceptor substrate, a biantennary N-linked core pentasaccharide, was obtained from V-Labs.

The activities of Mgat3 and Mgat5 were measured according to the procedure described by R&D Systems with slight modifications using the malachite green method (Lemercier et al., 2004) to determine the amount of Pi released by ENTPD3. PST3.1a was solubilized in DMSO and activities measured in the presence of 2 % DMSO.

Transfection

SiMgat5 and scrambled siRNA were ordered from Clinisciences. Cells were transfected with 100 nM of siRNA using an Amaxa Nucleofector with the Mouse Neural Stem Cell kit (Lonza).

PHA-L and CD15 staining

Gli4 cells transfected or not with siMgat5 and treated with DMSO (controls) or PST3.1a were stained with the PHA-L lectin for binding to β 1,6 N-Acetylglucosamine moieties or with CD15 coupled to PhycoErythrin (CD15-PE). Biotinylated PHA-L (Vectorlabs) was used at 4 μ g/mL followed by Streptavidin-FITC (Clinisciences, 1/500) in PBS + 0.1% sodium azide. Labelled cells were sorted using the BD Accuri™ C6 flow cytometer.

Clonogenicity assay

After a 48h treatment with or without PST3.1a, Gli4 or GliT cells were dissociated and plated as single cells in poly-HEMA-coated 96 well plates using a BD FACSAria™ flow cytometer, in the presence or in the absence of PST3.1a. The number of colonies in each condition was counted 3 weeks post plating.

Western blot analysis, Immunofluorescence and Imaging

20 µg of protein lysate were separated by SDS-PAGE. Immunoreactive protein bands were visualized using ECL western blotting detection reagents (Biorad). The ECL analysis system was used for detection in accordance with the manufacturer's instructions. Immunostainings for HuNu (Millipore) and DCX (Chemicon) were performed following standard protocols. The sections were mounted in Fluoromount medium.

Videomicroscopy

Gli4 cells were first dissociated and seeded at 25 000 cells per mL in a 24 well plate in proliferation conditions. PST3.1a was added at 5 µM and neurosphere formation was monitored for 24h in a 37°C chamber with 5% CO₂. In the control video, acquisition was taken every 14 minutes. In the treated well, acquisition was taken every 3 minutes. The videos were reconstructed with the Cells and Maps software (bram.org/serf/CellsAndMaps.php) and then converted in MP4 format.

Statistics

The presented experiments were carried out at least in biological triplicates (except for the *in vivo* experiments which was done twice). EC₅₀ values were calculated using the Hill equation of the dose–log response curves using serf software. IC₅₀ were computed from the means of 3 different experiments (n= 3 (toxicity), 10 (invasion, migration) for each concentration) expressed as percentage of control value in each experiment. Values are expressed as mean +/- SEM or 95% confidence interval.

Results

PST3.1a selectively inhibits Mgat5 without affecting Mgat3 enzymatic activity.

The oxaphosphinanes core of **PST3.1a** is conformationally and stereochemically related to the structure of glucose (Fig. 1A) or more specifically to C-arylglycosides (e.g. canagliflozin, ertugliflozin). This structural analogy is supported by other series of phosphorus heterocycles embedding a phosphinolactone group as a surrogate of lactol group present in glycosides. The combination of the structural analogy and the phenotypic screening (Clarion et al., 2014; Clarion et al., 2012) prompted us to evaluate its inhibitory effects on Mgat5 enzymatic activity. In our assays, using a synthetic pentasaccharide as glycan acceptor and UDP-GlcNac as the donor substrate, the apparent K_m value for Mgat5 was 14 mM and the V_{max} 4 $\mu\text{mol/h/mg.}$, **PST3.1a** showed an inhibitory effect against Mgat5 activity with an IC_{50} of 2 μM (Fig. 1B) whereas no inhibition of Mgat3 enzymatic activity was found (Fig. 1C).

Pst3.1a affects multibranched β 1,6-GlcNAc N-glycans of the GIC, Gli4NS.

Gli4 cells express several typical markers of neural precursors (CD133, CD15, Nestin, OLIG2, and SOX2) and are multipotent (Guichet et al., 2013). They generate NS when cultivated in growth factor-containing medium (proliferative medium) (Guichet et al., 2013). The major N-glycan structures expressed by Gli4NS are presented in Supplementary figure S1A. This glycome was next compared to the glycomes of Gli4NS grown for 10 days in the absence or presence of 5 μM **PST3.1a** (Supplementary Fig. S1B). Relatively to untreated cells, the abundance of ions at m/z 1907, 2081, 2111, 2285 and 2489 were all significantly reduced in treated Gli4NS (Supplementary Fig. S1A and B). These data indicated that multibranched β 1,6-GlcNAc mannose intermediate N-glycans were decreased by the treatment confirming the *in cellulo* Mgat5 inhibition by **PST3.1a**.

Enzymatic activity inhibition of Mgat5 by PST3.1a affects the glycoprofile of GLI4NS and cell signaling

In order to measure if the N-glycosylation pattern of Gli4NS was altered beyond the triantennary intermediate glycans, a Glycoprofile was performed at 10 days using a set of lectins. The Glycoprofile analysis confirmed a lower binding of GLI4NS treated cells to PHA-L lectins (Fig. 1D and Supplementary Fig. S2). The status of glycan sialylation was estimated by measuring cell binding through lectin recognition of α 2,3- and α 2,6-linkages in N-glycans. Figure 1D indicates a lower binding of PST3.1a treated cells to the MAA and SNA lectins. PST3.1a did not affect the binding to the fucosylated core recognized by the PSA lectin indicating that PST3.1a treatment does not inhibit the fucosyl-transferase Fuc-TVIII. Finally, the Tn antigen was mapped with the MPA, BPA and AIA lectins. Although PST3.1a-treated cells bound to a lower amount to the MPA lectin (Supplementary Fig. S2), this differential binding to the Tn-antigen was not confirmed by the binding to BPA and AIA (Supplementary Fig. S2). These data indicate that O-glycosylation was not affected. Analysis of the O-linked glycan structures by the glycome analysis confirmed the absence of effect on O-glycosylation (Supplementary Fig. S3). A more complete analysis of the Gli4 glycoprofile presented in Supplementary figure 3 indicates that Gli4NS did not bind or bound very poorly to lectins recognizing polymeric GlcNAc (GSL-II, PWM, STA, UEA-II), terminal fucosylation (UEA-I) and glycan structures containing GalNAc (DBA, ECA) or α Gal motifs (GSLI- β 4, PAI-L).

After 10 days of treatment, the inhibition of Mgat5 activity by PST3.1a on Gli4NS could account for the observed reduction of β 1,6 glycans on the glycome and glycolprofile analyses. However, the effects on multibranched β 1,6-GlcNAc N-glycans analyzed by FACS indicate that during the first 48 h of treatment, PST3.1a had no effect on the binding of PHA-L on Gli4NS (Fig. 1E).

We therefore monitored Mgat5 expression in Gli4NS treated or not with PST3.1a. Figure 2A indicates that Mgat5 expression first increases during the first 48 h of PST3.1a treatment, and then decreases to reach control levels after five days (Fig. 2A and Supplementary Fig. S4). This could explain the absence of effect on PHA-L binding after 48 h of treatment as observed by FACS analysis (Fig. 1E). To

test this hypothesis, we inhibited the expression of Mgat5 by siRNA (Fig. 2B and 1E and Supplementary Fig. S4) to counteract its overexpression. As expected, inhibition of Mgat5 expression in Gli4NS-siMgat5 led to lower binding of the PHA-L lectin after 48 h (Fig. 1E). Additionally, PST3.1a treatment of Gli4NS-siMgat5 cells led to a further reduction in PHA-L binding, underlying the inhibitory effect of PST3.1a on remaining Mgat5 activity (Fig. 1E). Similar effects were observed with another GIC (GliT), (Fig. 1E).

Mgat5 modulates the cell surface glycosylation level and markedly regulates many transmembrane receptor families including the vascular endothelial growth factor (VEGF), ErbB (Contessa et al., 2008), TGF β R (Lau et al., 2007) families and integrins (Janik et al., 2010). The activation states of signaling pathways associated with these receptors were therefore evaluated in Gli4NS treated with PST3.1a or transfected with siMgat5. SiMgat5 but not PST3.1a treatment inhibits TGF β R signaling (Fig. 2A and B). Considering that in Mgat5^{-/-} cells TGF β R signaling is correlated to Mgat5 expression (Partridge et al., 2004) we can hypothesize that the lack of effect of PST3.1a on TGF β R signaling can be explained by the previously observed compensatory overexpression of Mgat5 protein in response to PST3.1a treatment. ERK (data not shown), and FAK (data not shown) phosphorylations were not affected by PST3.1a or by siMgat5 treatments.

Enzymatic inhibition of Mgat5 affects the ability of GLI4 to generate neurospheres in non-adherent/proliferative conditions

A defining characteristic of GIC is their ability to grow as neurospheres in serum-free medium, with cell surface characteristics permitting cell-cell interactions. We analyzed the effects of PST3.1a on the ability of GIC to form large NS (Fig. 2C). A 5 days treatment (5 μ M) had no effect on the growth of GLI4 and GliT GIC (data not shown). Quantification (Fig. 2D) confirmed that the total numbers of NS are increased in treated GIC, compared to controls. Large NS formation is not simply the result of cell proliferation but also involves cell/cell, NS/NS and cell/NS interactions. A video microscopy analysis, performed over 24 h following drug addition, shows that cell/cell, NS/NS and cell/NS interactions are

all affected by PST3.1a treatment (Supplementary Movies S1 and S2). This explains the dramatically reduced number of enlarged NS following a 5 days treatment. Similarly, siMgat5 transfection confirmed that Mgat5 inhibition increases the number of small neurospheres (Fig. 2C and D). The effect of PST3.1a was significantly different on siCtrl- and siMgat5- transfected cells (two-way Anova, $p < 0.0001$) concordant with Mgat5 as the target of PST3.1a.

We next tested the ability of GICs to generate clones in a clonogenicity test after PST3.1a treatment. Gli4 (Fig. 2E) and GliT (not shown) were pre-treated or not with 2 μ M PST3.1a for 48 h. The cells were then dissociated and plated as single cells with or without PST3.1a (2 μ M) in 96 well plates. Three weeks post-plating, the number of colonies was reduced in PST3.1a-pretreated cells compared to non-pretreated cells. Interestingly, the number of colonies was not further diminished when cells were seeded as single cells in PST3.1a-containing medium. The expression of the CD15 glycan, a GBM stem cells enrichment marker (Son et al., 2009), was reduced by siMgat5 but not upon treatment with PST3.1a treatment (Fig. 2F). However, OLIG2 another marker associated with GBM stemness was significantly increased by both PST3.1a treatment and siMgat5 transfection (Fig. 2A and B).

Inhibition of Mgat5 by PST3.1a reduces invasion and migration of Gli4, GliT, Gli7 GIC in adherent differentiation conditions.

GIC undergo a shift in their surface glycans when they enter differentiation (Tucker-Burden et al., 2012). We therefore evaluated the impact of PST3.1a on GIC cultured as adherent cells on polyD-lysine/laminin (PDL/LN) in a differentiation medium (retrieval of growth factor, addition of 0.5 % serum). We first measured the impact of PST3.1a on the formation of multibranched β 1,6- linked N-acetylglucosamine on Gli4 and GliT differentiated cells (DC). Figure 3A and B indicates that reduced PHA-L binding is observed at nanomolar concentrations of PST3.1a, on both Gli4DC and GliTDC. We next analyzed the effects of PST3.1a and siMgat5 on Mgat5 expression level in Gli4DC. Both treatments resulted in the reduction of Mgat5 expression (Fig. 3C). The effects of PST3.1a on signaling pathways were then studied on Gli4DC. Figure 3C indicates that SMAD2 phosphorylation

was inhibited by both PST3.1a and Mgat5, whereas FAK phosphorylation was inhibited by PST3.1a and activated by siMgat5. Erk phosphorylation was not affected by either approach (data not shown).

The consequences of these glycosylation and signaling effects were evaluated on cell migration in Boyden chambers (Table 1). PST3.1a inhibited the migration of Gli4, Gli7, GLIT and SNB75 cells on matrix supports made from either fibronectin, vitronectin or laminin (Table 1). IC₅₀ values for PST3.1a to inhibit migration of GIC were in a 1-30 nM range.

PST3.1a cytotoxic activity has been reported previously (Clarion et al., 2012). Here we show that PST3.1a inhibits the proliferation of SNB75 and Gli4DC, Gli7DC and GliTDC cells with IC₅₀ values between 1.7 and 2.6 μM (Table 1). This antiproliferative effect triggered by the inhibition of Mgat5 enzymatic activity was confirmed by siMgat5 in Gli4DC (Fig. 3D). The impact on migrating cells was also measured by wound healing (Fig. 4A) and by plating Gli4NS on PDL/LN for 4 days before the addition of 2 μM of PST3.1a for 48 h. Figure 4B shows that cells that migrate the farthest were the most sensitive to the treatment. Phalloidin staining of the treated migrating cells indicates a profound disorganization of the actin cytoskeleton (Fig. 4C). We next evaluated the inhibitory effect of PST3.1a on SNB75, Gli4-, Gli7- and GliT invasion (Table 1 and Supplementary Fig. 5). IC₅₀ values of PST3.1a (7 nM and 2.5 nM for Gli4 and GliT respectively) were similar to those observed for migration.

To evaluate the impact of PST3.1a on differentiation processes in GLI4, NS were plated on PDL/LN coated slides and grown in differentiation medium in the presence or absence of 2 μM PST3.1a. In the control wells, we observed that cells entering migration out of the sphere express DCX, a determinant of the infiltrative capacity of GBM (Ortensi et al., 2013). In contrast, DCX positive cells in the PST3.1a-treated wells were blocked within the NS (Fig. 4D) and failed to spread and migrate outside the NS. Western blot quantification showed that DCX expression was increased in the presence of PST3.1a (Fig. 4E). As a control, when plated on PDL/LN, but cultivated in proliferation medium, DCX was not expressed and PST3.1a treatment did not induce its expression (Fig. 4D) in Gli4

cells. In addition, Galectin 3 expression was decreased by PST3.1a treatment. These data suggest that PST3.1a inhibits Gli4 migration leading them to accumulate within the NS. This effect is connected to a strong disruption of the actin cytoskeleton.

Pharmacological activity of PST3.1a in orthotopic xenografted models using Gli4- and GliT-GIC

PST3.1a at doses up to 50 μ M did not exhibit toxicity against non-proliferative astrocytes (Clarion et al., 2012) or activated PBMC (Supplementary Fig. S6). No mortality was observed in mice treated with *per os* administration of 50 mg/Kg daily during 20 days. In addition, no weight loss, no obvious organ toxicity and no behavioral alteration was revealed (data not shown). Thus, the pharmacological activity of PST3.1a was next investigated using Gli4- and GliT-GIC in an orthotopic mouse graft model of the disease. A bio- distribution study indicated that 1.5 h after a *per os* administration of 27 mg/Kg of PST3.1a, concentration of the product into the brain reached 4.6 ± 2.2 ng/g. Figure 5A and B show that Gli4 cells are highly invasive since 85% of the ipsilateral and 65% of the contralateral hemispheres were invaded by grafted cells at the end of the experiment. Cell densities were counted across several areas of the cortex, corpus callosum and striatum regions. Figures 5A, B and C indicate that in PST3.1a-treated animals the overall Gli4-invaded surface was significantly reduced and tumoral cell densities within invaded areas were also substantially lower than in untreated mice. Notably, in the striatum of the ipsilateral and contralateral hemispheres, the number of Gli4 cells in treated mice was reduced by 80% (Fig. 5A and B).

GliT cells are less invasive and form a tumor mass at the surface of the brain (Fig. 5D). The tumor compresses the brain leading to overt clinical signs in control animals (prostration, weight loss) by the end of the experiment. By contrast, at the same time no clinical symptoms were visible in PST3.1a-treated mice. We quantified the brain compression due to the tumor mass by measuring the dorso-ventral and left-right (Fig. 5E) axes of the brains. We found that the dorso-ventral axis was 28% shorter in the control group compared to PST3.1a-treated animals, owing to the reduction of the

tumor mass in response to PST3.1a treatment (Fig. 5D and E). The left-right axis was similar in control and PST3.1a-treated animals (Fig. 5D and E).

Based on these first results demonstrating a strong anticancer potential of PST3.1a *in vivo*, we sought to determine whether PST3.1a could lead to better survival of these xenotransplanted animals. We thus established a survival curve of control versus treated mice (n=7 per group). Mice treated with PST3.1a demonstrated a significant survival advantage over those treated with vehicle (P=0.0017), with a median survival of 108 days versus 79 days for the vehicle cohort (Fig. 5F). Mice treated with PST3.1a and TMZ demonstrated a significant survival advantage over those only treated with TMZ (P=0.0287), with a median survival of 135 days versus 102 days for the vehicle cohort (Fig. 5F).

Genes positively and negatively correlated with PST3.1a response

We have previously shown the selective anti-proliferative activity of PST3.1a against the CNS cluster within the NCI-60 collection of cancer cells (Clarion et al., 2012) as published by Ross *et al* (Ross et al., 2000) and a correlation between anti-proliferative and anti-migratory effects of phostines (Babouri et al., 2015; Clarion et al., 2014). Although all NCI-60 cell lines express Mgat5 at the mRNA level, the anti-proliferative effect was seen primarily on the CNS cluster (Clarion et al., 2012). Therefore, we performed an *in silico* transcriptomic analysis, using Cell Miner and DAVID of all 60 cell lines, and identified a series of genes which were either positively or negatively correlated to cell growth in the presence or absence of PST3.1a (Fig. 6A). We then clustered the selected genes by pathways and function, and found that a large number of genes (>150) associated with mitochondrial function are positively correlated with cell growth in the presence of PST3.1a. Consequently, these genes are negatively correlated to the cell sensitivity to the compound (Fig. 6B). On the contrary, genes associated with cell adhesion and cell interaction with the ECM, were negatively correlated with cell growth (Fig. 6C). It is noteworthy that SNAI1 and N-Cadherin (CDH2), two genes reflecting EMT progression, were negatively correlated to cell growth in presence of PST3.1a. This finding suggests that PST3.1a preferentially targets mesenchymal-like cancer cells. This latter information

supports our observation that of over 31 cell lines which express E-cadherin (E-CADH), according to the CellMiner transcriptomic analysis, only 2 are sensitive to PST3.1a cytotoxic effect at 10 μ M (Clarion et al., 2012). To determine whether or not the absence of expression of E-CADH is a requirement to PST3.1a cytotoxicity, we over-expressed E- CADH in the sensitive E-CADH⁻ Gli4DC. E-CADH over-expression renders these cells resistant to PST3.1a (Fig. 6D). Conversely, the inhibition of E-CADH with a Crispr-Cas9 construct in the resistant pancreatic ductal cancer cell line PANC-1 renders these cells sensitive to PST3.1a (Fig. 6E).

Discussion

The inhibition of Mgat5 enzymatic activity (Fig. 1B), coupled to the modular character of the N-glycosylation pathway (Kim et al., 2009) could account for the lectin binding profile. Final glycan production is controlled by the regulated biosynthesis of intermediate glycans (Kim et al., 2009). Thus, lower cell binding to SNA and MAA lectins could be explained by the reduction of the tri- and tetra-antennary glycan motifs (Fig. 1D and supplementary Fig. S1) which are substrates for α 2,6- and α 2,3-sialylation (Lau and Dennis, 2008). These data are in accordance with the observation that Mgat5 enzymatic activity controls the number of α 2,3-sialyl residues at the glycan termini of proteins by controlling the expression of the α 2,3 sialyl transferase (ST3Gal-IV) (Guo et al., 2004). The lower binding to PHA-E lectin indicated that bisecting tri-antennary glycans motifs could be reduced. Because Mgat3 was not inhibited by PST3.1a (Fig. 1C) we can conclude that either Mgat3 enzymatic activity was reduced or that the bisected tri-antennates glycans are less accessible.

SiMgat5 transfection and PST3.1a treatment have different effects on Mgat5 expression in NS. This difference may account for the distinct effects on the TGF- β signaling pathways (Fig. 2A and B) and on CD15 expression (Fig. 2F). Nevertheless, the over-expression of OLIG2 in proliferative culture condition is observed in both treatments (Fig. 2A and B). These apparently contradictory data suggest that PST3.1a-treated cells maintain an apparent GIC expression profile identity, but the disruption of

N-glycosylation induced by the treatment leads to phenotypic alterations strongly affecting their function. An over-expression of OLIG2 in proliferative culture conditions was previously reported to suppress the ability of GIC to form colonies in an anchorage-independent manner (Tabu et al., 2006). Taken together the data support the suggestion of Farahani *et al* (Farahani et al., 2014) that cell adhesion is crucial for GIC to keep their stemness character.

Signaling effector pathways impacted by PST3.1a also differ depending on cell growth conditions (Fig. 2A and B and Fig. 3C). Such a difference was already reported for SMAD2 activation in glioma cells treated with an integrin signaling inhibitor (Silginer et al., 2014). In this latter study, when the expression of integrins was inhibited in non-sphere glioma cells, the TGF- β pathway was strongly impaired, whereas no such effect was observed in glioma cells cultured under sphere formation conditions. In our conditions, the TGF- β pathway is also only impaired in differentiation culture conditions after PST3.1a treatment (Fig. 2A and Fig. 3C), which could underlie the resulting effects on cell migration and proliferation owing to the key role of the TGF- β receptor in these two processes in glioma cells (Han et al., 2015). In GBM TGF- β signaling is associated with EMT, loss of E-cadherin expression (Iwadate et al., 2016) and poor prognosis (Padhiar et al., 2015). The impact of Mgat5 on TGF- β was already extensively reported (Lau et al., 2007; Mendelsohn et al., 2007; Partridge et al., 2004). However in the PyMT Mgat5^{-/-} cell line used in these studies, TGF- β signaling was associated with cell growth arrest. Inhibition of the activating phosphorylation of the focal-adhesion kinase (FAK) by PST3.1a only occurs in non-sphere glioma cells, suggesting that signaling centers involved in interactions between the ECM and integrins are altered by PST3.1a. Finally, PST3.1a treatment reduces galectin-3 expression in Gli4 cultivated in adherent conditions. This observation is coherent with the stimulatory effect of galectin3 on integrin-mediated activation of FAK, increasing cell motility (Lagana et al., 2006). Interestingly, integrins, growth factors and cytokine receptors are all glycoproteins which activities are controlled by the high avidity interactions of their N-glycans with a galectin lattice (Dennis, 2015). Tight regulation of integrin turnover has been reported to be a key factor regulating cell migration and cytokinesis (De Franceschi et al., 2016) and FAK inhibition was

shown to inhibit actin assembly (Serrels et al., 2007). We show that integrin signaling is sensitive to glycosylation dysregulation, as illustrated by the alteration of FAK phosphorylation (Fig. 3C) associated with the actin cytoskeleton disruption (Fig. 4C).

Transcriptomics analyses on CellMiner revealed that Mgat5 expression was necessary but not sufficient for a cytotoxic effect of PST3.1a on cell lines within the NCI-60 panel. Therefore, dependence on Mgat5 expression is not equivalent in all cell types. DAVID analysis revealed that physiological states of cells are linked to PST3.1a responsiveness. Firstly, it appeared that the EMT engagement of cancer cells is positively associated with responsiveness to PST3.1a. This analysis was confirmed by the loss of cytotoxic response to PST3.1a after re-expression of E-CADH in Gli4 (Fig. 6D). Secondly, the absence of response to PST3.1a can be linked to the energy metabolism status of the cell. Non-responding cells express a set of genes such as NDUF3, UQCRC2 involved in oxidative phosphorylation. It was previously reported that triantennary N-glycan levels double in an Mgat5^{-/-} mammary tumor cell line, when supplemented with GlcNac (Lau et al., 2007). This feed-back regulation system was shown to be associated with mitochondrial respiration (Lau et al., 2007; Ryczko et al., 2016; Wellen et al., 2010).

Nanomolar range of PST3.1a concentrations were sufficient to trigger anti-migration effects on fibronectin, whereas the cytotoxic effects of the molecule in proliferative conditions were in the millimolar range (Table 1). This implies that GICs migration is more dependent on β 1,6-GlcNac branching than is cell proliferation. An estimation of the K_i considering a strict competitive inhibition against the acceptor glycan predicts a value of 300 nM confirming the nmolar range of activity of PST3.1a. In addition, the cellular and pharmacological data are to be put in light to the biochemical characteristic of the linear pathway that initiates the GlcNac branching (Lau and Dennis, 2008; Schachter, 1986). This branching is dependent on glycoprotein acceptor concentrations for the initial Mgat1 and Mgat2 steps while Mgat5 activity is limited by UDP-GlcNac concentrations (Lau and Dennis, 2008). We observed a diminution of the abundance of ions at m/z 1662 and 1836 (Supplementary Fig. S1). This observation suggests that the access of Mgat2 to its substrates could

have been reduced either by an increase of Mgat3 activity which blocks further branching (Schachter, 1986) or by a decrease of α -mannosidase I and II activities. Moreover we observed that Mgat5 expression was reduced under PST3.1a treatment in Gli4DC (Fig. 3C). In other words, the cell answer to Mgat5 inhibition could enhance the cellular and physiological effects of PST3.1a and account for its nanomolar range of activity.

In summary, PST3.1a targets Mgat5. The anti-tumor effect relies on the Mgat5 dependency of a given cell type. This dependency is linked to cellular engagement in the EMT and its energetic metabolic status. The biological importance of these combined physiological states, associated with glycosylation, opens up a new area of investigation for cancer therapy.

Acknowledgments

We thank Odile Sainte-Catherine for her technical support. We thank the Montpellier RIO Imaging (MRI) facility, the flow cytometry platform at the Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy (IRMB) in Montpellier, and in particular Dr Christophe Duperray for his expertise and the Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier (RHEM). We also thank Prof. James W. Dennis (University of Toronto), Prof. Michael Peter Barrett (University of Glasgow) and Dr. Guy Lenaers (University of Angers) for the critical reading and English correction.

References

1. Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* **2006**;126:855-67
2. Dennis JW, Laferte S, Waghorne C, Breitman ML, Kerbel RS. Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* **1987**;236:582-5
3. Chaney W, Sundaram S, Friedman N, Stanley P. The Lec4A CHO glycosylation mutant arises from miscompartmentalization of a Golgi glycosyltransferase. *J Cell Biol* **1989**;109:2089-96
4. Lau KS, Dennis JW. N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology* **2008**;18:750-60

5. Shoreibah M, Perng GS, Adler B, Weinstein J, Basu R, Cupples R, *et al.* Isolation, characterization, and expression of a cDNA encoding N-acetylglucosaminyltransferase V. *J Biol Chem* **1993**;268:15381-5
6. Yamamoto H, Swoger J, Greene S, Saito T, Hurh J, Sweeley C, *et al.* Beta1,6-N-acetylglucosamine-bearing N-glycans in human gliomas: implications for a role in regulating invasivity. *Cancer Res* **2000**;60:134-42
7. Padhiar AA, Fan J, Tang Y, Yu J, Wang S, Liu L, *et al.* Upregulated beta1-6 branch N-glycan marks early gliomagenesis but exhibited biphasic expression in the progression of astrocytic glioma. *Am J Cancer Res* **2015**;5:1101-16
8. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, *et al.* Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* **2000**;24:227-35
9. Gu J, Taniguchi N. Potential of N-glycan in cell adhesion and migration as either a positive or negative regulator. *Cell Adh Migr* **2008**;2:243-5
10. 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
11. Burger PC, Dubois PJ, Schold SC, Jr., Smith KR, Jr., Odom GL, Crafts DC, *et al.* Computerized tomographic and pathologic studies of the untreated, quiescent, and recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* **1983**;58:159-69
12. Contessa JN, Bhojani MS, Freeze HH, Rehemtulla A, Lawrence TS. Inhibition of N-linked glycosylation disrupts receptor tyrosine kinase signaling in tumor cells. *Cancer Res* **2008**;68:3803-9
13. Hudak JE, Bertozzi CR. Glycotherapy: new advances inspire a reemergence of glycans in medicine. *Chem Biol* **2014**;21:16-37
14. Granovsky M, Fata J, Pawling J, Muller WJ, Khokha R, Dennis JW. Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. *Nat Med* **2000**;6:306-12
15. Lee JK, Matthews RT, Lim JM, Swanier K, Wells L, Pierce JM. Developmental expression of the neuron-specific N-acetylglucosaminyltransferase Vb (GnT-Vb/IX) and identification of its in vivo glycan products in comparison with those of its paralog, GnT-V. *J Biol Chem* **2012**;287:28526-36
16. Clarion L, Jacquard C, Sainte-Catherine O, Decoux M, Loiseau S, Rolland M, *et al.* C-glycoside mimetics inhibit glioma stem cell proliferation, migration, and invasion. *J Med Chem* **2014**;57:8293-306
17. Clarion L, Jacquard C, Sainte-Catherine O, Loiseau S, Filippini D, Hirlemann MH, *et al.* Oxaphosphinanes: new therapeutic perspectives for glioblastoma. *J Med Chem* **2012**;55:2196-211
18. 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* **2008**;86:1916-26

19. Lemerrier G, Espiau B, Ruiz FA, Vieira M, Luo S, Baltz T, *et al.* A pyrophosphatase regulating polyphosphate metabolism in acidocalcisomes is essential for *Trypanosoma brucei* virulence in mice. *J Biol Chem* **2004**;279:3420-5
20. Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, Silvescu CI, Reinhold VN, Demetriou M, *et al.* Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell* **2007**;129:123-34
21. Janik ME, Litynska A, Vereecken P. Cell migration-the role of integrin glycosylation. *Biochim Biophys Acta* **2010**;1800:545-55
22. Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Pawling J, Cheung P, Granovsky M, *et al.* Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* **2004**;306:120-4
23. Son MJ, Woolard K, Nam DH, Lee J, Fine HA. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell* **2009**;4:440-52
24. Tucker-Burden C, Chappa P, Krishnamoorthy M, Gerwe BA, Scharer CD, Heimbürg-Molinario J, *et al.* Lectins identify glycan biomarkers on glioblastoma-derived cancer stem cells. *Stem Cells Dev* **2012**;21:2374-86
25. Ortensi B, Setti M, Osti D, Pelicci G. Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness. *Stem Cell Res Ther* **2013**;4:18
26. Babouri R, Rolland M, Sainte-Catherine O, Kabouche Z, Lecouvey M, Bakalara N, *et al.* alpha-Halogenated oxaphosphinanes: Synthesis, unexpected reactions and evaluation as inhibitors of cancer cell proliferation. *Eur J Med Chem* **2015**;104:33-41
27. Kim PJ, Lee DY, Jeong H. Centralized modularity of N-linked glycosylation pathways in mammalian cells. *PLoS One* **2009**;4:e7317
28. Guo P, Wang QY, Guo HB, Shen ZH, Chen HL. N-acetylglucosaminyltransferase V modifies the signaling pathway of epidermal growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* **2004**;61:1795-804
29. Tabu K, Ohnishi A, Sunden Y, Suzuki T, Tsuda M, Tanaka S, *et al.* A novel function of OLIG2 to suppress human glial tumor cell growth via p27Kip1 transactivation. *J Cell Sci* **2006**;119:1433-41
30. Farahani E, Patra HK, Jangamreddy JR, Rashedi I, Kawalec M, Rao Pariti RK, *et al.* Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. *Carcinogenesis* **2014**;35:747-59
31. Silginer M, Weller M, Ziegler U, Roth P. Integrin inhibition promotes atypical anoikis in glioma cells. *Cell Death Dis* **2014**;5:e1012
32. Han J, Alvarez-Breckenridge CA, Wang QE, Yu J. TGF-beta signaling and its targeting for glioma treatment. *Am J Cancer Res* **2015**;5:945-55
33. Iwadate Y, Matsutani T, Hirono S, Shinozaki N, Saeki N. Transforming growth factor-beta and stem cell markers are highly expressed around necrotic areas in glioblastoma. *J Neurooncol* **2016**;129:101-7

34. Mendelsohn R, Cheung P, Berger L, Partridge E, Lau K, Datti A, *et al.* Complex N-glycan and metabolic control in tumor cells. *Cancer Res* **2007**;67:9771-80
35. Lagana A, Goetz JG, Cheung P, Raz A, Dennis JW, Nabi IR. Galectin binding to Mgat5-modified N-glycans regulates fibronectin matrix remodeling in tumor cells. *Mol Cell Biol* **2006**;26:3181-93
36. Dennis JW. Many Light Touches Convey the Message. *Trends Biochem Sci* **2015**;40:673-86
37. De Franceschi N, Arjonen A, Elkhatib N, Denessiouk K, Wrobel AG, Wilson TA, *et al.* Selective integrin endocytosis is driven by interactions between the integrin alpha-chain and AP2. *Nat Struct Mol Biol* **2016**;23:172-9
38. Serrels B, Serrels A, Brunton VG, Holt M, McLean GW, Gray CH, *et al.* Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol* **2007**;9:1046-56
39. Ryczko MC, Pawling J, Chen R, Abdel Rahman AM, Yau K, Copeland JK, *et al.* Metabolic Reprogramming by Hexosamine Biosynthetic and Golgi N-Glycan Branching Pathways. *Sci Rep* **2016**;6:23043
40. Wellen KE, Lu C, Mancuso A, Lemons JM, Ryczko M, Dennis JW, *et al.* The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes Dev* **2010**;24:2784-99
41. Schachter H. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem Cell Biol* **1986**;64:163-81

Table 1. Effects of PST3.1a on invasion and migration of GIC and GBM cancer cell line on different substrates

*IC ₅₀ (nM)	FN	LN	VN	INV	PROLIF
SNB75	27	23 000	37	3 000	4 500
Gli4	1	1	5	7	1 800
Gli7	37	310	371	6	3 100
GliT	<1	1	30	5	1 800

Abbreviations : FN, fibronectin; LN, laminin; VN, vitronectin; INV, invasion; Prolif, proliferation

*IC₅₀ values for the antiproliferative effect (n=3) were measured on laminin coated plates (Gli4, Gli7 and GliT) and non-coated plates for SNB75. IC₅₀ were estimated with the Cells&Maps software. Error of estimate of each IC₅₀ was in the range of 0.1 %.

Figure legends

Figure 1.

PST3.1a inhibits the enzymatic activity of Mgat5 and affects cell surface glycans of GBM stem cells.

A, Glucose-like conformational representation of Single-crystal X-ray structure of PST3.1a. **B-C**, Enzymatic activities of Mgat5 (B) and Mgat3 (C) were measured in the presence of increasing concentrations of PST3.1a and at a fixed concentration of donor=UDP-GlcNac (5 mM for Mgat5 and 2 mM for Mgat3) and acceptor=pentasaccharide (0.5 mM). Mgat5 activity was decreased by PST3.1a with an IC_{50} of 2 μ M (n=3) calculated with the Cells&Maps software. (<http://www.bram.org/serf/CellsAndMaps.php>). Mgat3 activity was not affected by PST3.1a at the concentrations tested (n=3). **D**, GlycoProfile analysis of Gli4 treated by 2 μ M PST3.1a (grey bars) or DMSO controls (black bars) for 10 days in proliferative conditions. The bindings of the following lectins are shown: Maackia amurensis (MAA), Sambucus Nigra (SNA), Phytohaemagglutinin (PHA-L), Phaseolus Vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E) and Pisum Sativum lectin (PSA). Binding has been normalized to the Concavalin A (ConA) binding. ns, not significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. n=3 (unpaired t-test). **E**, PHA-L binding to Gli4 (top) and GliT (bottom) 48 h after siMgat5 transfection (or siCtrl) and in the presence or absence of 5 μ M PST3.1a. The histograms represent the relative binding of PHA-L in the different conditions as measured by flow cytometry and the quantification of binding was normalised to the siCtrl + DMSO condition (n=3).

Data information: Data are presented as mean +/- SEM.

Figure 2.

PST3.1a treatment (48 h) upregulates Mgat5 and OLIG2 expressions and disrupts Gli4 clonogenic potential. **A**, Amounts of Mgat5, SMAD2, OLIG2 proteins and SMAD2 phosphorylation were quantified by western blot after 48 h of treatment with 2 μ M PST3.1a and after 5 days for Mgat5 (quantifications on Figure S4). **B**, Gli4 were transfected with siCtrl or siMgat5 for 48h. Western blots for Mgat5, SMAD2, PSMAD2 and OLIG2 are shown 48 h post-transfection of siMgat5. Western blot

quantifications can be found in Supplementary Figure S4. **C**, Pictures of Gli4 cells transfected with siMgat5 (or siCtrl) and incubated with increasing concentrations of PST3.1a for 10 days. Gli4 generate smaller and more numerous spheres in the presence of PST3.1a or after Mgat5 inhibition. Scale bars = 200 μ m. **D**, The total number of neurospheres in siCtrl or siMgat5 transfected cells treated with PST3.1a is reported. Statistical analysis relative to siCtrl + 0 μ M PST3.1a: ns: not significant, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$. Relative to siMgat5 + 0 μ M PST3.1a: ns, not significant; #, $p < 0.05$. $n=6$ (one-way Anova). Two way Anova: siCtrl relative to siMgat5: \$\$\$\$ $, p < 0.0001$. **E**, After a 48 h pre-treatment with 2 μ M PST3.1a (or control), Gli4 cells were plated as single cells in 96 wells plates in proliferative medium containing 2 μ M PST3.1a (or DMSO control). The graph shows the number of colonies present in a total of 180 wells per condition (one experience over three is presented). **F**, Quantification by flow cytometry of the CD15+ population in Gli4 after Mgat5 knock-down and/or PST3.1a treatment. In siCtrl + DMSO window: the black line represents IgG control and the red line shows CD15 staining. In each window, the two values represent the percentage of CD15+ cells present in the population (top value) and the normalisation to the siCtrl + DMSO condition (bottom value).

Data information: Data are presented as mean +/- SEM.

Figure 3.

PST3.1a treatment down regulates the TGF β -R and FAK signaling and affects GBM GIC and cell lines proliferation, migration and invasion. **A,B**, PHA-L binding to GliT and Gli4 cells treated with 0.1 to 1 μ M of PST3.1a for 72 h. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$. $n=6$ (One way Anova). **C**, Western Blots (quantification on Supplementary Fig. S4) on Gli4 cells treated or not with PST3.1a (2 μ M, 48 h) and transfected or not with siMgat5 (48 h). **D**, Effect of siMgat5 or PST3.1a 3 μ M on Gli4DC cell viability. ***, $p < 0.001$, $n=5$ (Unpaired t-test).

Figure 4.

PST3.1a affects migrating cells by disrupting the actin cytoskeleton and down regulating DCX and galectin-3 expressions. **A**, Dissociated Gli4NS were seeded on fibronectin-coated plates ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and cultured in differentiation medium until they reach confluency. Then scratches were performed and pictures taken at different times in order to evaluate the healing of the wound under PST3.1a treatment. Bars = $200 \mu\text{m}$. **B**, Ratio of the percentage of treated cells on the percentage of control cells within the corresponding arc of migration ($n= 4$, see methods section). The percentage corresponds to the number of cells in an arc/number of total cells and the inset shows the arc intervals of migration and their distance from the sphere centre (bar = $100 \mu\text{m}$). **C**, Cytoskeleton of Gli4 cells treated or not with $2 \mu\text{M}$ PST3.1a (48 h) was labelled with Phalloïdin (green). **D**, DCX staining (green) and Hoechst (blue) labelling of Gli4 spheres plated on PDL/laminin-coated glass coverslips either in proliferation or in differentiation medium. In each case, the cells were treated with or without $2 \mu\text{M}$ of PST3.1a for four days. Bars = $200 \mu\text{m}$. **E**, Quantification of PST3.1a treatment on the expressions of DCX and galectin-3 in differentiation condition (Supplementary Fig. S4).

Data information: Data are presented as mean +/- SEM.

Figure 5.

In vivo effects of PST3.1a on xenotransplanted patient-derived GIC. **A**, Immunohistochemistry for HuNu is shown (green staining) on a representative brain section of each group (Gli4 xenografts $n=3$ to 5). The blue outline represents the surface of cell invasion and the white outline represents the total surface of the brain. Scale bars = $600 \mu\text{m}$. **B**, The percentage of invasion was calculated for each hemisphere. $n=3$ to 5, **** $p < 0.0001$ (Unpaired t-test). **C**, For each hemisphere, density of cancer cells (HuNu⁺) was counted in three different areas: Cortex (Ctx), Striatum (St) and Corpus Callosum (CC). $n=3$ to 5 *, $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ (unpaired t-test). **D**, GliT cells are less infiltrative than Gli4 and grow as a bulk under the meninges, crushing the brain in the dorso-ventral axis. The extent of crushing was used as a direct readout of tumor growth. Scale bars = $600 \mu\text{m}$. **E**,

The brains were measured on the dorso-ventral (vertical) and left-right (horizontal) axes and quantified in treated animals $n=3$ *, $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Unpaired t-test). **F**, PST3.1a treatment improves survival in a preclinical model. Antitumoral effect of PST3.1a was assessed on GLI4 orthotopic model of GBM. p values are indicated in the graph, $n=7$ (Log-rank (Mantel-Cox)).

Data are presented as mean +/- SEM.

Figure 6.

PST3.1a cytotoxic activity correlates with cell-cell adhesion genes in the NCI-60 cell lines panel. **A**, Percentage of Cell growth after PST3.1a treatment at 10 mM for 48 hours (data obtained from the NCI-60). **B**, Left panel shows the top 10 genes list highly and positively correlated with cell growth and right panel shows DAVID bioinformatics functional classification of 1453 genes positively correlated with cell growth. **C**, Left panel shows the top 10 genes highly and negatively correlated with cell growth and right panel shows DAVID bioinformatics Gene Functional ontology classification of 1120 genes negatively correlated with cell growth. **D**, Gli4 cells were transfected with an E-CADH-expressing plasmid (right hand bars, +E-CADH) or a control plasmid (Ctrl) and incubated with 0 to 10 μ M PST3.1a. Cell viability was assessed 48 h post-transfection and treatment. $n=6$ ns, not significant; ***, $p < 0.001$ (one-way Anova). **E**, Panc1 cells were transfected with a CRISPR-Cas9-E-CADH construction (right hand bars, Δ -E-CADH) or with a control construct (Ctrl). $n=6$, ****, $p < 0.001$ (two-way Anova) and ns, not significant and *, $p < 0.05$ (one-way Anova).

Supplementary Figure 1. Processing of N- glycans in the absence or presence of PST3.1a (5 μ M).

Cells were lysed in Tris buffer (100 mM, pH 7.4) with 1 % w/v SDS. The homogenate was dialysed in 12–14 kDa cut-off dialysis tubing in an ammonium hydrogen carbonate solution (50 mM, pH 7.4) during 48 h at 4°C, and lyophilised. The proteins/glycoproteins were reduced and carboxyamidomethylated followed by sequential tryptic and peptide N-glycosidase F digestion and Sep- Pak purification. Permethylated glycoproteins, sample clean-up, MALDI-TOF-MS of permethylated glycans, and linkage analysis before and after sequential exoglycosidase digestions were performed as described elsewhere (Morelle and Michalski, 2007) MS/MS data were acquired using a 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) mass spectrometer as previously described (Sabatte et al., 2011). **A**, Gli4NS cultivated during 10 days in proliferation

medium. **B**, Gli4NS cultivated during 10 days in proliferation medium in presence of 5 μ M of PST3.1a. Glycans presenting a relative reduced amount were highlighted.

1. Morelle W, Michalski JC. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nature protocols* 2007;2(7):1585-602.
2. Sabatte J, Faigle W, Ceballos A, *et al.* Semen clusterin is a novel DC-SIGN ligand. *J Immunol* 2011;187(10):5299-309.

Supplementary Figure 2. Gli4NS Glycoprofile in the absence or presence of PST3.1a (5 μ M). The glycoprofile was performed by GLYcoDIAG (Ref: R1507221 - Projet: PHO1503241). Gli4NS were cultivated without (CTL) or in presence of 5 μ M of PST3.1a for 10 days. Gli4NS were then dissociated as described (Guichet *et al.*, 2012) and labeled with CarboxyFluoresceinSuccinimidyl (CFSE). After PBS washes, cells were calibrated and plated on lectin functionalized wells. After washing fluorescence was quantified according to the technology developed by GLYcoPROFILETM. The lectin panel references and specificities are listed below:

Ref Short Name Common name Glycans structures specificity
 L1236 MAA *Maackia amurensis* Neu5Ac/Gca-3Gal β 4GlcNAc/Glc-
 L1237 SNA *Sambucus nigra* Neu5Aca-6Gal/GalNAc
 L1239 PHA L *Phaseolus vulgaris* Gal β 4GlcNAc β 6Man of branched structures of N-glycans, Gal β 4GlcNAc β 2Man.
 L1240 PHA E *Phaseolus vulgaris* Gal β 4GlcNAc β 2Man, the bisecting GlcNAc β 4man is essential.
 L1225 GSL II *Griffonia simplicifolia* Terminal GlcNAc
 L1227 PWM *Phytolacca americana* GlcNAc β 4GlcNAc oligomers, Gal β 4GlcNAc
 L1228 STA *Solanum tuberosum* GlcNAc β 4GlcNAc oligomers. Poly N-acetylglactosamine, keratan sulfates.
 L1229 UEA II *Ulex europeus* GlcNAc β 4GlcNAc oligomers ; Fuca2Gal β 4GlcNAc
 L1230 WGA *Triticum vulgare* GlcNAc; GlcNAc β 4 oligomers , core of Asn linked oligasacchide; Neu5Ac
 L1233 LTA, LTL *Lotus tetragonolobus* Fuc, LeX but not LeA, 2-FucaGal β 4Glc
 L1234 UEA I *Ulex europeus* Fuc
 L1209 BPA *Bauhinia purpurea* Gal β 3GalNAc (T-antigen) > GalNAc > Gal
 L1211 DBA *Dolichos biflorus* Terminal GalNAca, GalNAca3GalNAc (Forsman), blood group A trisaccharide
 L1212 ECA , ECL+ *Erythrina cristagalli* Galb4GlcNAc> Lactose > GalNAc > Gal
 L1220 MPA, MPL *Maclura pomifera* Gal β 3GalNAc (T antigen), Gala6Glc (melibiose)
 L1221 AIA / Jacalin *Artocarpus intergrifolia* Gala6 or Gal β 3GalNAc (T-antigen)>> lactose, more specific for T-antigen than PNA
 L1241 GSL-Ib4 *Griffonia simplicifolia isoB4* α Gal
 L1257 PA-IL *Pseudomonas aeruginosa lectin A (Lec A)* Gala, Globoside
 L1222 ABA *Agaricus bisporus* Gal-GalNAca-O-R, inhibited by O-linked glycans, not by N-linked glycans
 L1201 Con A *Canavalia ensiformis* Man > Glc ; branched mannoses a
 L1202 LcH *Lens culinaris* Mana/Glca > GlcNAca, enhanced by Fuca6 on the core GlcNAc-Asn N-glycopeptides1203 PSA, PEA *Pisum sativum* Man > Glc ; enhanced by Fuca8 on the core GlcNAc-Asn N-glycopeptides, IgM1A mouse
 L1205 ASA *Allium sativum* Mana, inhibited by α 3-linked mannosyl units but weakly by Mana6. Do not bind mannopentaose.
 L1206 GNL / GNA *Galanthus nivalis* Terminal mannoses. Mana3Man ; α 2-macroglobulin ; bind mannopentaose

5. Guichet PO, Bieche I, Teigell M, *et al.* Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. *Glia* 2012.

Supplementary Figure 3. Processing of O-glycans in the absence or presence of PST3.1a (5 μ M).

Cells were lysed in Tris buffer (100 mM, pH 7.4) with 1 % w/v SDS. The homogenate was dialysed in 12–14 kDa cut-off dialysis tubing in an ammonium hydrogen carbonate solution (50 mM, pH 7.4) during 48 h at 4°C, and lyophilised. The proteins/glycoproteins were reduced and carboxyamidomethylated followed by sequential tryptic and peptide N-glycosidase F digestion and Sep- Pak purification. Putative O-glycopeptides remaining after PNGase F digestion of the tryptic glycopeptides were subjected to reductive elimination. Permethylated of the freeze dried glycans, sample clean-up, MALDI-TOF-MS of permethylated glycans, and linkage analysis before and after sequential exoglycosidase digestions were performed as described in (1). MS/MS data were acquired using a 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) mass spectrometer as

previously described (2). **A**, Gli4NS cultivated during 10 days in proliferation medium. **B**, Gli4NS cultivated during 10 days in proliferation medium in presence of 5 μ M of PST3.1a.

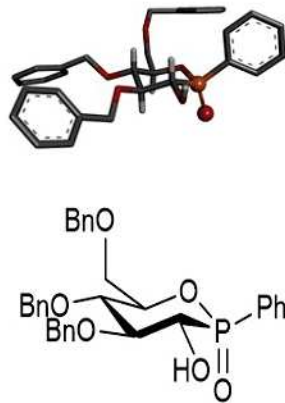
Supplementary Figure 4. Western blot quantification. Each western blot has been performed at least three times. Quantification has been performed relatively to GAPDH expression. Bands have been quantified using the Image Lab software (Bio-Rad) and the control value was set as 1 for normalization. Means +/- SEM are shown.

Supplementary Figure 5. Effect of PST3.1a on cell invasion in matrigel. Gli4NS were embedded in matrigel (Corning #354234)/differentiation medium (1/1). Pictures were taken after 48h in order to estimate Gli4 invasion.

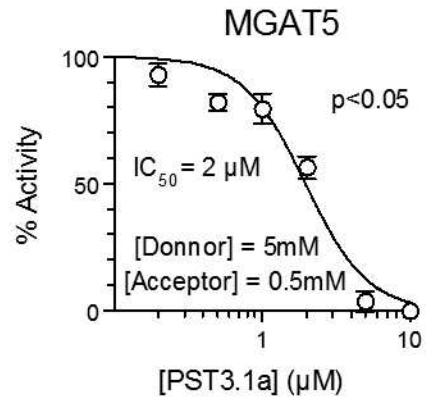
Supplementary Figure 6. PBMC cytotoxicity. 3×10^6 PBMC cultivated in RPMI (SVF 20%) were activated for 3 days by the addition of 5 μ g/mL of PHA-P. Cells were then seeded in 96 well plates for 24 h and then treated with different concentrations of PST3.1a for 48h. Cell viability was assessed by MTT.

FIGURE 1

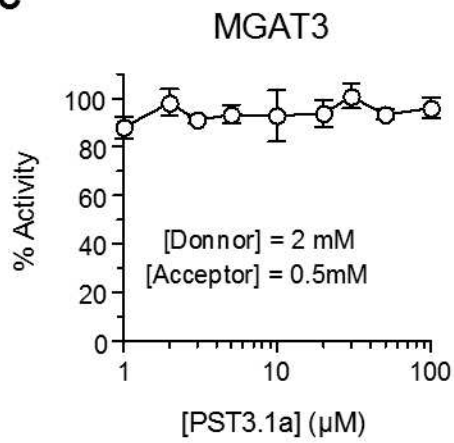
A



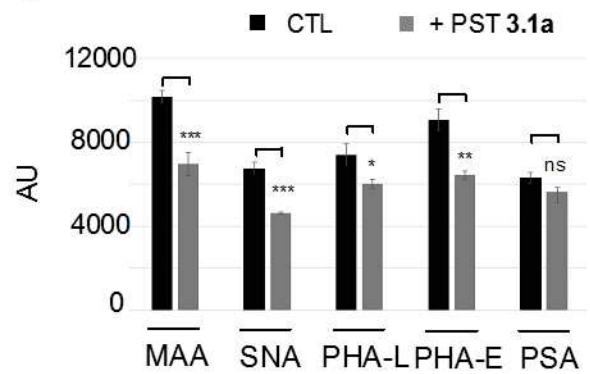
B



C



D



E

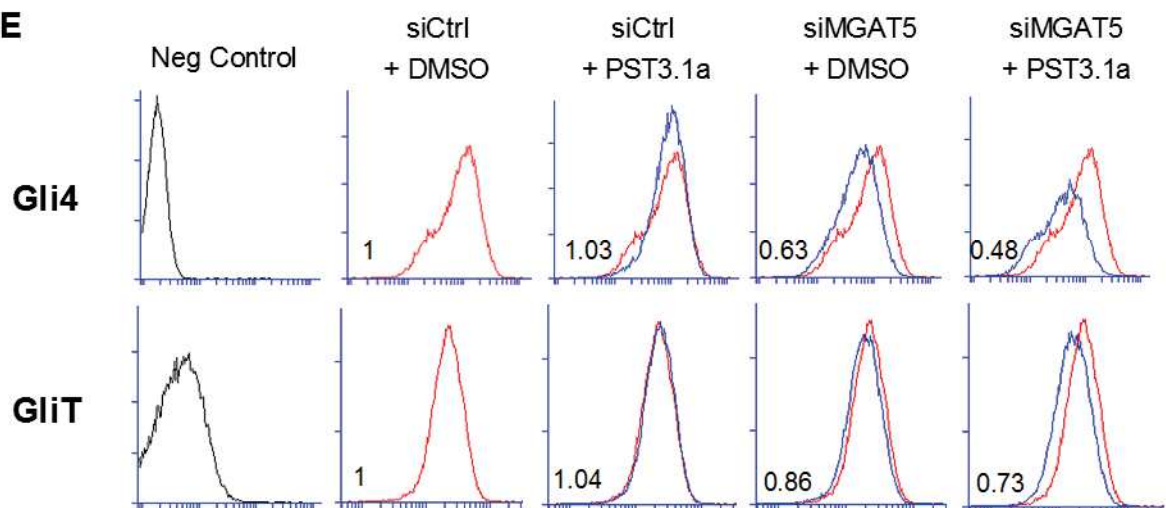


FIGURE 2

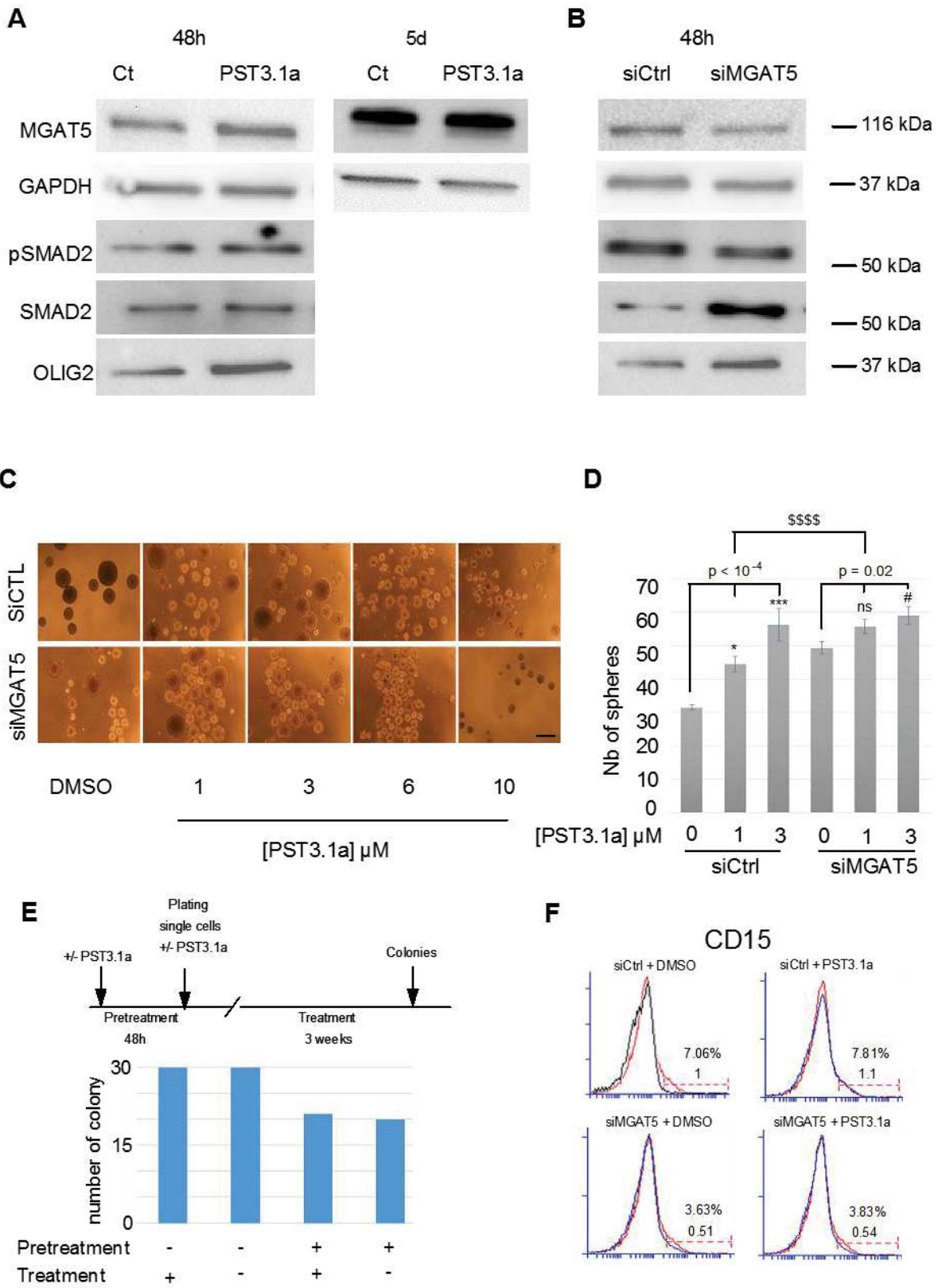


FIGURE 3

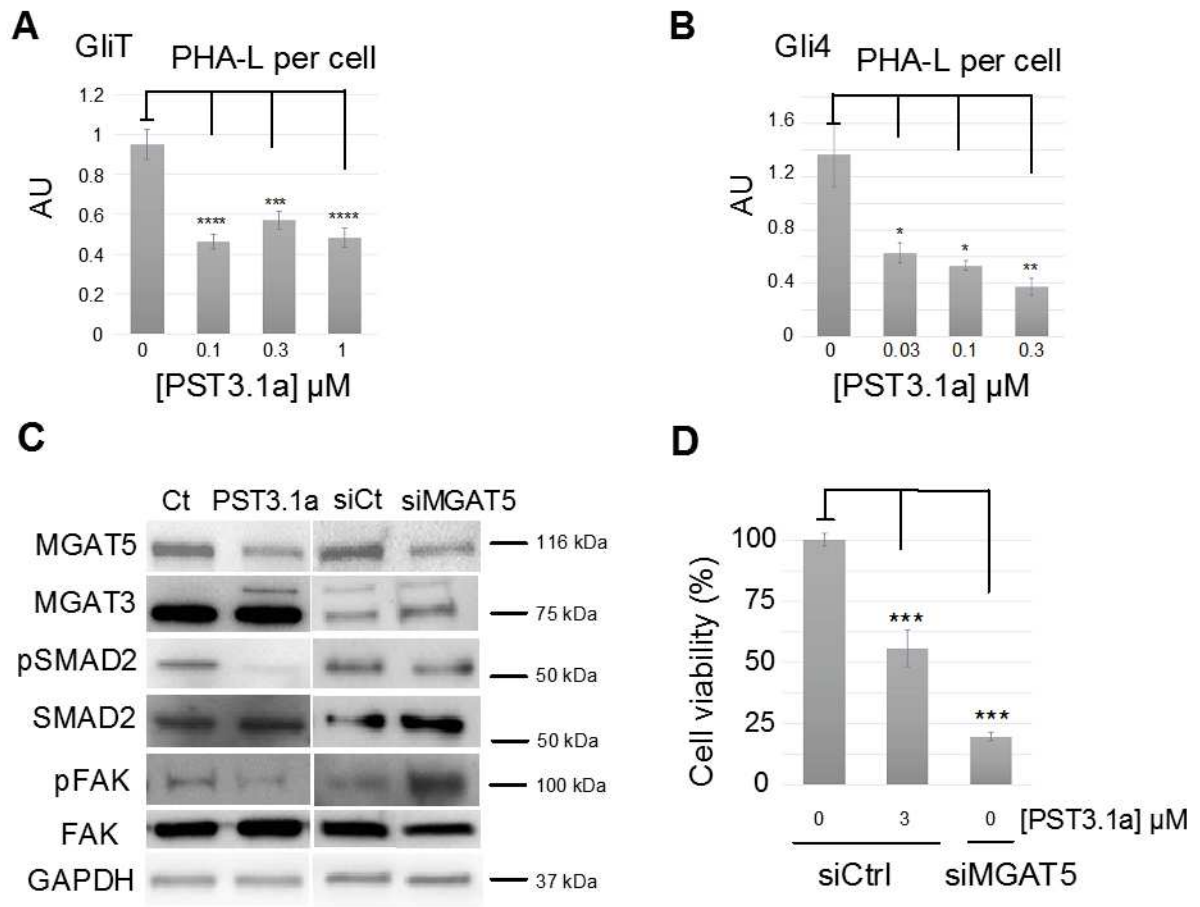


FIGURE 4

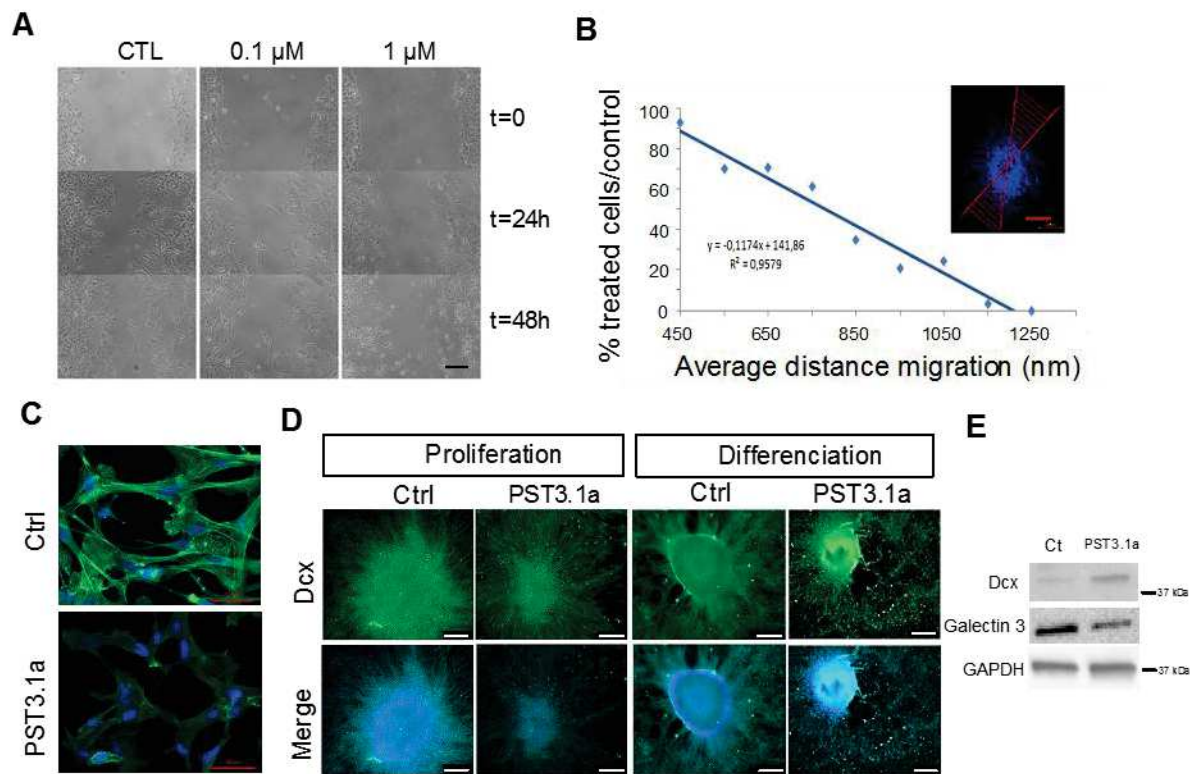


FIGURE 5

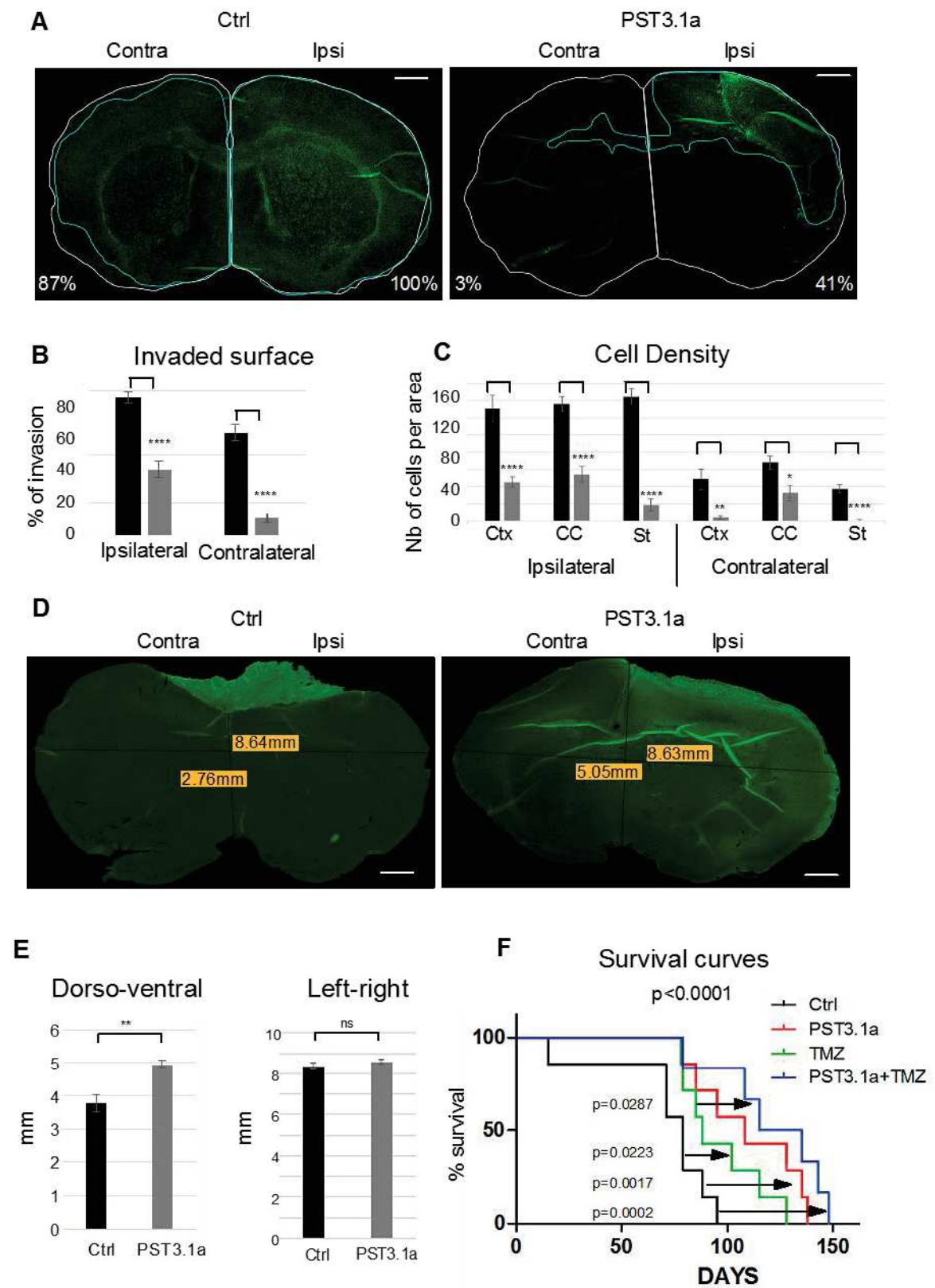
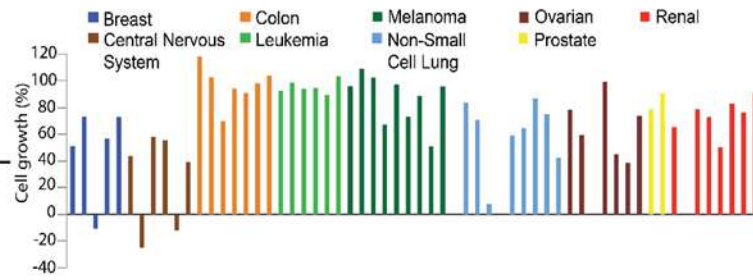
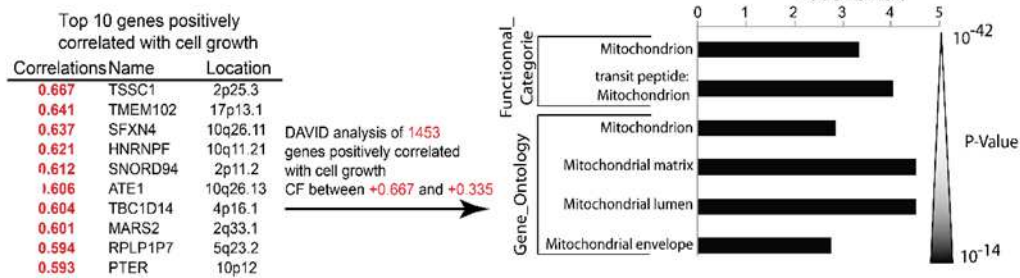


FIGURE 6

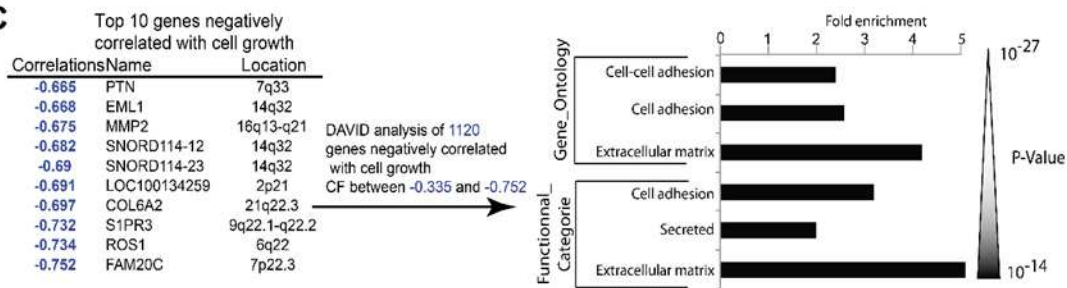
A



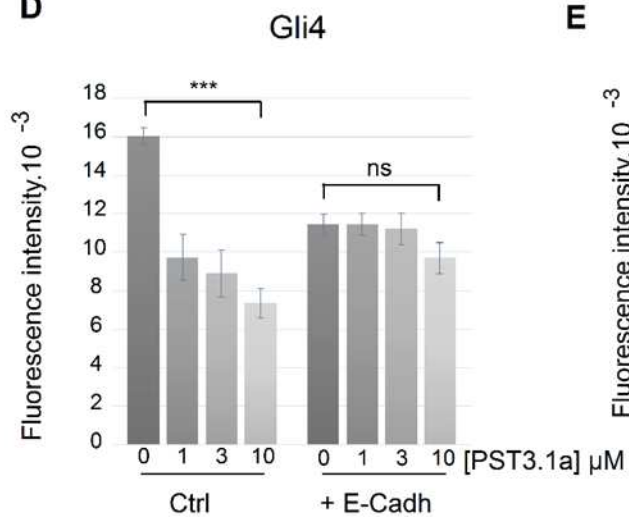
B



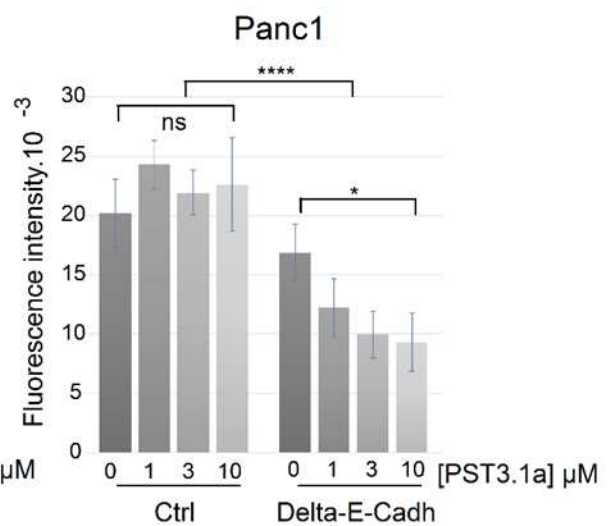
C



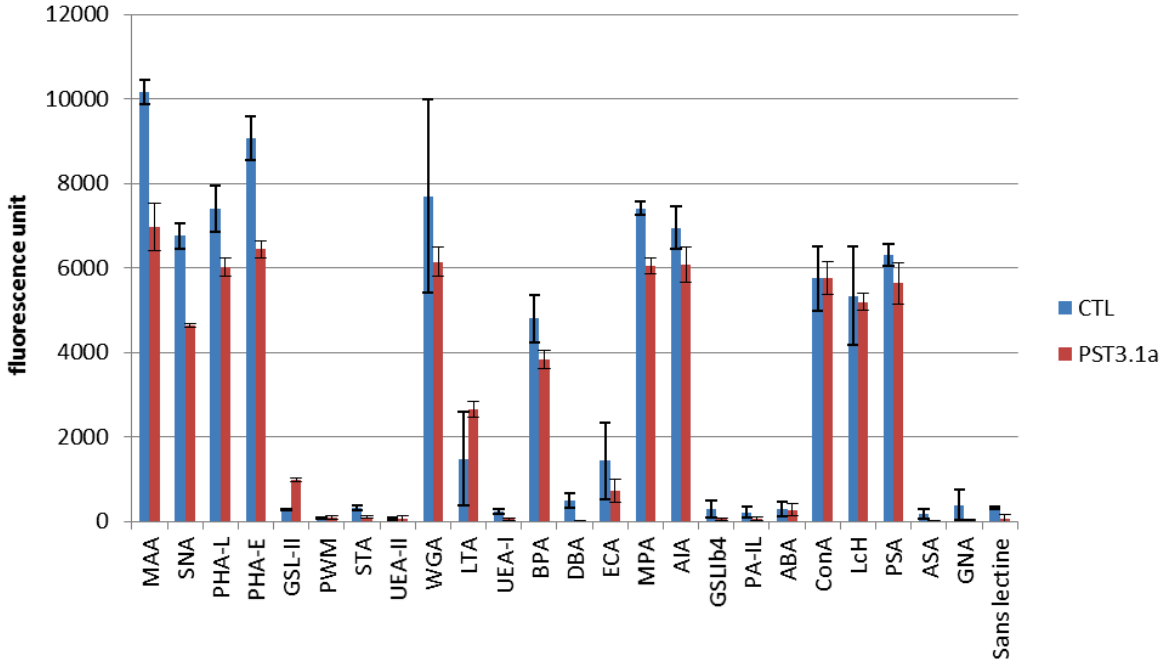
D



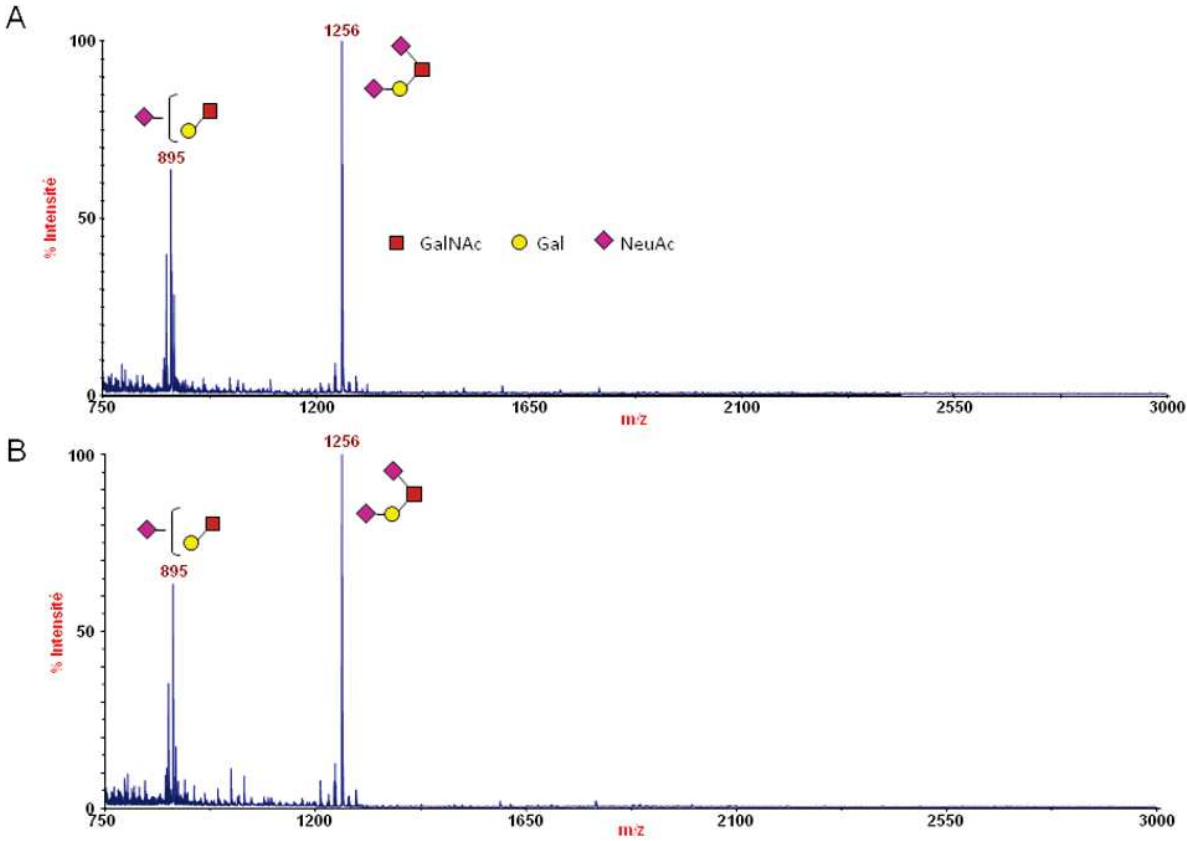
E



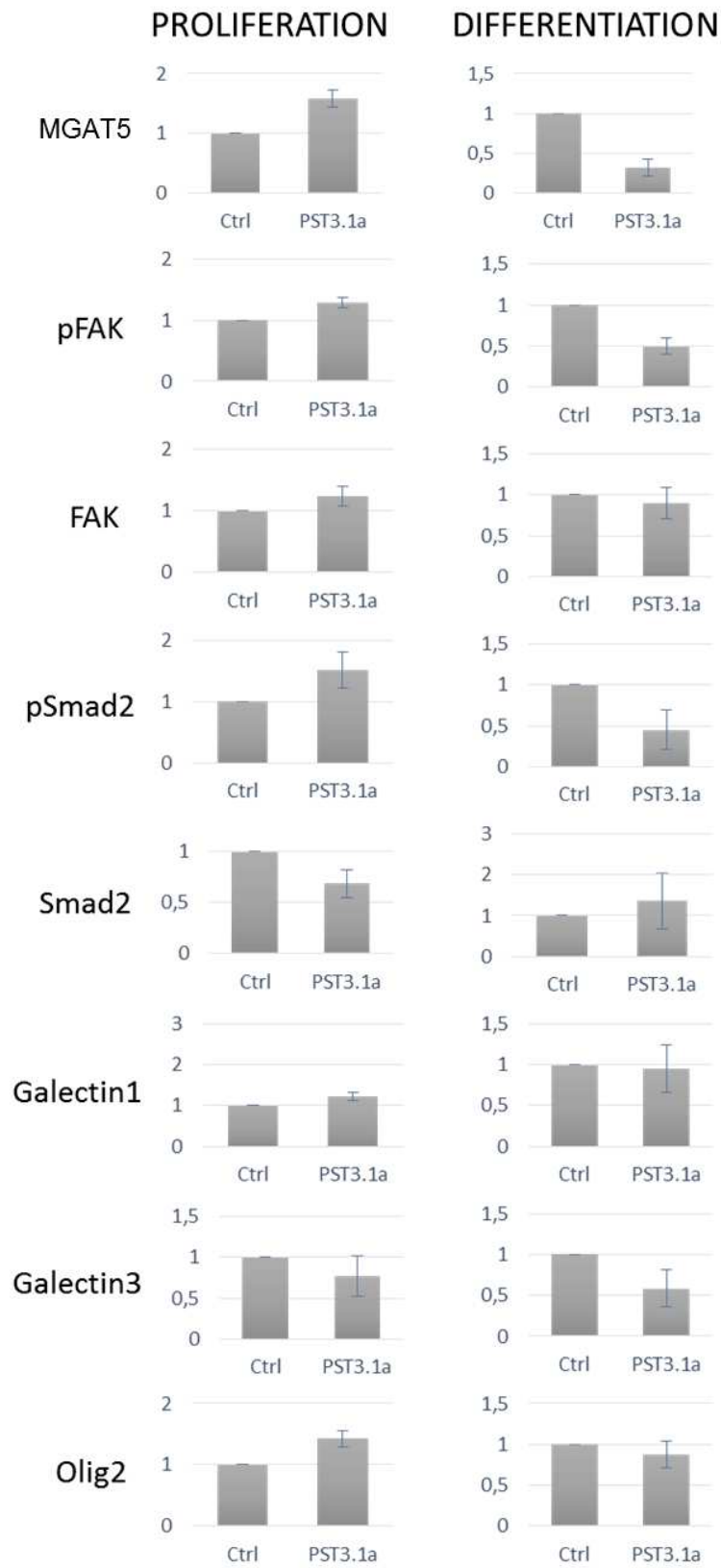
Supplementary Figure 2

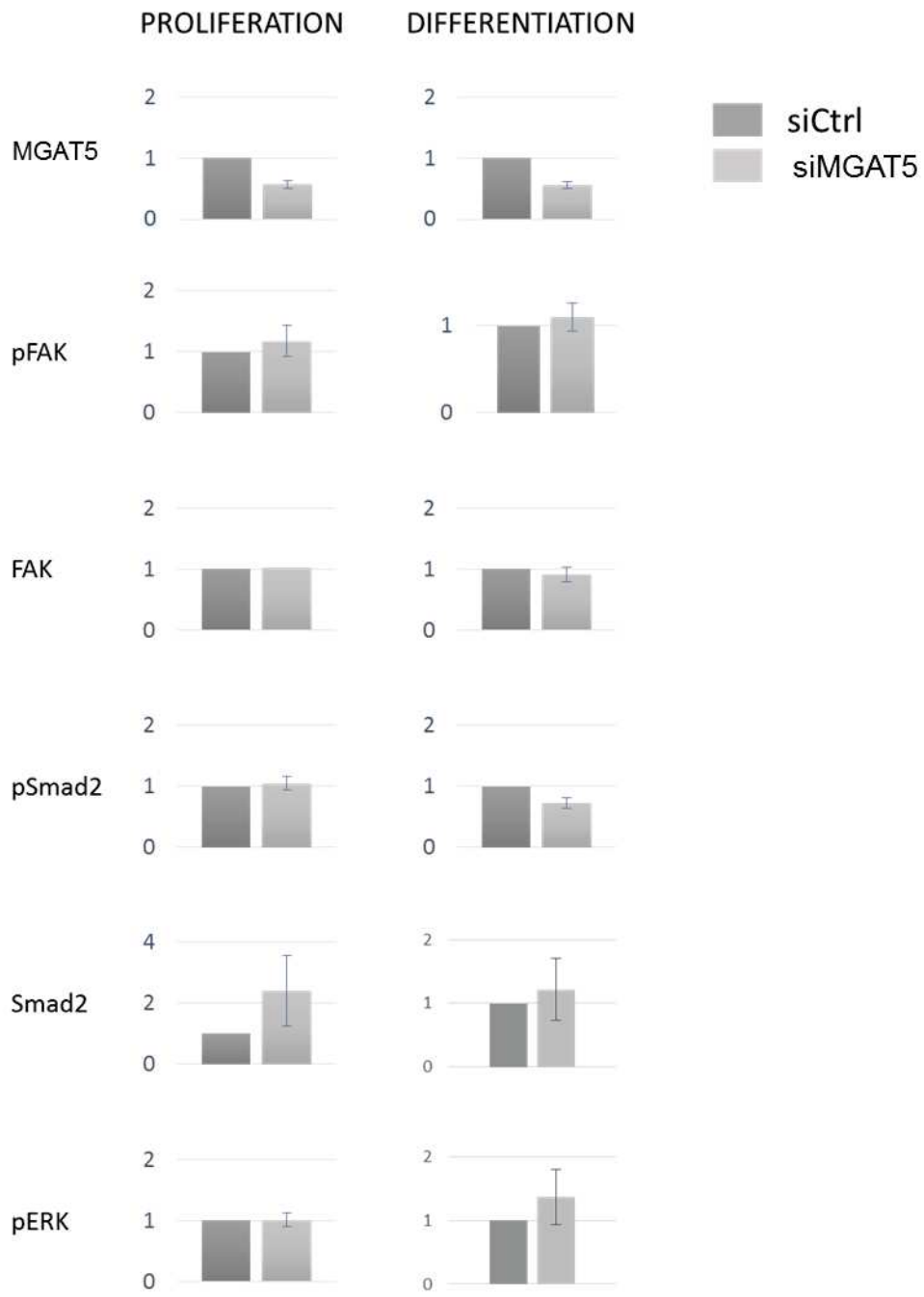


Supplementary Figure 3

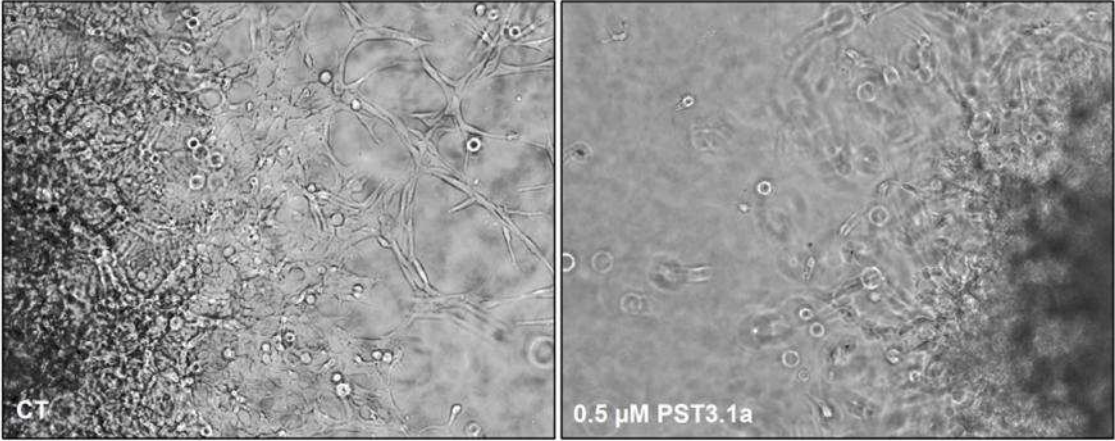


Supplementary Figure 4

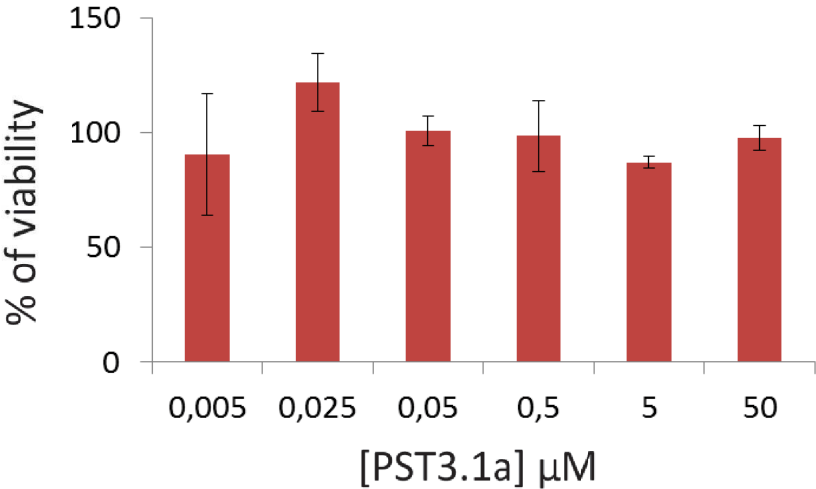




Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6



Partie II

Developpement d'une Matrice Tridimensionnelle de Nanofibres pour étudier le rôle de la Matrice Extracellulaire dans la Migration des Cellules Souches de Glioblastome

Introduction

Les progrès de ces dernières années ont montré que les caractéristiques physiques et biochimiques de la MEC modulent la progression tumorale. A l'intérieur du cerveau, les cellules de glioblastome migrent dans des environnements riches en laminine, fibronectine et collagène tels que l'espace périvasculaire, ou sont guidées par l'alignement des fibres myélinisées du corps calleux. Ces composantes de la MEC sont faiblement récapitulées par les modèles de culture classiques bidimensionnels (2D). Dans le but d'étudier le rôle de la MEC dans la migration des CSG, nous avons développé une nouvelle matrice composée de nanofibres (NF) et synthétisée à partir de XPX. Dans l'article suivant, nous avons démontré que les NF favorisent l'adhésion et la migration des CSG dans un environnement tridimensionnel (3D). Les modalités de l'interaction des CSG avec la MEC sur les NF sont similaires aux mécanismes observés *in vivo* dans le modèle murin de tumeurs xénogreffées et sont différentes des modèles 2D. Ce travail a montré que la constitution biochimique (laminine) et l'orientation (alignées ou enchevêtrées) des NF impactent sur la migration des CSG. La fonctionnalisation des NF avec la laminine augmente le nombre de cellules migratrices et change le mode migratoire d'une forme collective à une forme individuelle. D'un autre côté, l'orientation des NF détermine la direction de migration des CSG.

Publication 2

Laminin regulates migration rate and N-cadherin-mediated cell-cell adhesion promotes collective migration of Glioblastoma in a three dimension matrix

Ali Saleh, Emilie Marhuenda, Zahra Hassani, Soumaya Turpault, Christine Fabre, Igor Lima

Maldonado, Jean-Philippe Hugnot, Hugues Duffau, David Cornu and Norbert Bakalara

En cours de préparation

Laminin regulates migration rate and N-cadherin-mediated cell-cell adhesion promotes collective migration of Glioblastoma in a three dimension matrix

Ali Saleh, Emilie Marhuenda, Zahra Hassani, Soumaya Turpault, Christine Fabre, Igor Lima

Maldonado, Jean-Philippe Hugnot, Hugues Duffau, David Cornu and Norbert Bakalara

Key words: Glioblastoma multiforme, migration, extracellular matrix, nanofibers, laminin, collective migration

Abstract

Glioblastoma Multiforme invasivity renders complete surgical resection impossible. A subpopulation of Glioblastoma Initiating Cells is highly invasive and responsible for tumor recurrence. Glioblastoma dissemination occurs along preexisting brain structures comprising the aligned myelinated fibers of the corpus callosum and the laminin rich-basal lamina of blood vessels. The Extracellular Matrix of these environments regulates tumor cells migration, but the underlying mechanisms remain largely unknown. In order to recapitulate the cerebral Extra Cellular Matrix compositional and physical properties and to evaluate their role(s) in Glioblastoma Initiating Cells migration, we have set up a new aligned poly-acrylonitril nanofibers scaffold and functionalized it with laminin. The PAN matrix creates a tridimensional microenvironment suitable for Glioblastoma Initiating Cells proliferation, adhesion and migration. Integrin $\beta 1$ and galectin-3 mediated-adhesion to the extracellular matrix is improved on the nanofibers in comparison to the conventional bidimensional planar surfaces. In addition, focal adhesion dynamics during Glioblastoma Initiating Cells migration are different

between the bi- and tri-dimension. The focal adhesion component talin 1/2 cleavage induced by the cysteine-protease calpain-2 is reduced on nanofibers compared to planar surfaces. The mechanisms of Glioblastoma Initiating Cells interaction with the extracellular matrix on the nanofibers are similar to those observed in the brain of a murine model of glioblastoma. In this physiologically more relevant environment generated by the 3D nanofibers, the variation of the extracellular matrix biochemical and mechanical properties modulates Glioblastoma Initiating Cells migration. The addition of laminin increases the number of migratory Glioblastoma Initiating Cells and modulates the mode of migration. Glioblastoma Initiating Cells migrate collectively and establish N-cadherin membrane contacts in the absence of laminin, or individually in the presence of laminin on aligned NF. Moreover, the orientation of the nanofibers dictates the direction of migration. Glioblastoma Initiating Cells migrate equally in the different directions on non-aligned nanofibers, whereas they migrate predominantly in the same direction of the aligned nanofibers.

Introduction

Accumulating evidence of the last few years point to the involvement of the Extracellular Matrix (ECM) in the modulation of the hallmarks of cancer. The biophysical and biochemical cues stemming from the ECM inflect tumor growth, proliferation, apoptosis, angiogenesis, invasion and metastasis (Pickup et al., 2014). A collection of cell surface receptors converts altered ECM signals to abnormal intracellular responses during cancer progression, with $\beta 1$ integrins being pivotal contributors (Blandin et al., 2015; Multhaupt et al., 2016). Recently, an integrin adhesome was described containing a consensus core centered on four axes mediating the cell adhesion machinery with talin-vinculin representing one of the axes (Horton et al., 2015). Talin is a cytoskeletal protein linking integrins to the actin cytoskeleton and thereby involved in integrin outside-in and inside-out signaling (Das et al., 2014). Talin plays a crucial role in focal adhesion dynamics (Nayal et al., 2004; Parsons et

al., 2010) and is proteolytically cleaved by calpain-2, a calcium-dependent cysteine protease regulating adhesion turnover (Franco et al., 2004; Glading et al., 2002).

Scientific research has recently demonstrated unequivocally that cellular malignant modifications are inseparable from the surrounding microenvironment, making bidimensional traditional cell culture models clearly deficient. These 2D models do not reproduce the *in vivo* conditions of biochemical gradients, surface nanotopography, rigidity or polarity (Akhmanova et al., 2015; Shologu et al., 2016). This could explain the results discrepancy observed between *in vitro* studies and pre-clinical trials during drug development. Therefore, different tridimensional culture models have been established to overcome these limitations such as hydrogels, sponges, decellularized tissues or cell layers and fibers. For example, Beliveau and co-workers demonstrated that polycaprolactone aligned nanofibers increase the migratory potential of glioblastoma multiforme tumor cells compared to randomly aligned nanofibers by upregulating key migratory genes and downregulating key proliferative genes (Beliveau et al., 2016). In another elegant study, glioblastoma stem cells (GSC) migration mode, distance, velocity and morphology were modulated as a function of the matrix biochemical composition including hyaluronan, collagen or matrigel and mechanical properties such as the microenvironment topography (Herrera-Perez et al., 2015). In this study, the authors showed that GSCs migrate by expansive growth on matrigel matrices, as multicellular extensions on rigid surfaces, mesenchymal single-cell migration in collagen matrices and adopt collective migration on the matrigel coated microfibers (Herrera-Perez et al., 2015).

Nevertheless, some obstacles remain impassable as for instance the unspecified composition of the matrix (matrigel); the absence of tissue nanotopography (hydrogels); the physiological microporosity, a poor cellular infiltration or restricted ingrowth and cytotoxicity (fibers) (Shologu et al., 2016).

Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly invasive primary brain tumor. Glioblastoma Initiating Cells (GICs) are guided by fibrous nerve tracks or blood vessels during their migration in the brain. In the cerebral white matter, Glioblastoma initiating cells (GIC) migrate on myelinated fibers. For the latter

situation, GIC migrate along inner or outer laminin-containing basement membranes of the Blood-Brain Barrier (BBB) or in the fluid-filled perivascular space surrounding the blood vessels (Cuddapah et al., 2014; Gritsenko et al., 2012) and rich in ECM proteins such as collagen, fibronectin and laminin (Wong and Kumar, 2014).

In order to mimic the topology of the white matter tracts and blood vessels and the biochemical composition of the brain ECM, we developed and functionalized with laminin a new aligned nanofibers (NF) scaffold composed of poly-acrylonitril (PAN). We investigated the interaction with the ECM and compared the focal adhesion dynamics and turnover of GIC migrating on conventional 2D planar surfaces (PS) or on the 3D PAN NF. We correlated our results with *in vivo* xenografts of human GIC into the brain of Nude mice. We then explored the impact of the modulation of the biophysical and biochemical components of the NF ECM on the migration of GIC. Especially, we analyzed the migration mode adopted by GIC in the presence or absence of laminin on the NF. Finally, we tested the role of the NF orientation and organization in the determination of the direction of migration of GIC.

Materials and Methods

Cell culture

Tumor processing, GBM cells isolation and culture were realized using the classical non-adherent NS protocol elaborated by Guichet et al (Guichet et al., 2013) based on the work of Dromard *et al* (Dromard et al., 2008). Gli4 and GliT cells are two different patient-derived glioblastoma primary cultures. 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-HEMA, 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 Ca²⁺ and Mg²⁺) and reseeded. In the “differentiation” condition, the DMEM/F12 medium was supplemented with the same components as for the proliferation medium except from growth factors and heparin; instead, fetal bovine serum (0.5%) was added to the differentiation medium. For this latter condition, GBM cells were cultured in adherence on 2D planar surfaces (PS) or 3D nanofibers (NF) without poly-HEME. Prior to cell seeding, PS or NF were functionalized or not with poly-D-lysine – Laminin: poly-D-lysine 25µg/ml in borate buffer at 37°C overnight, then Laminin 5.2µg/ml in sterile water during 4 hours at 37°C. PS and NF were washed twice with sterile water before Gli4 and GliT NS were seeded. The NS remained in culture during 6 days at 37°C/5%CO₂. 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 5 000 cells per well. The cells sedimented and the corresponding NS were harvested 24 hours later.

Nanofibers production

The aligned and non-aligned nanofibers were produced by electrospinning using a solution of 10% poly-acrylonitril dissolved in DMF. For the fabrication of the NF scaffold, a needle was used to eject the polymer jet 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 mandrel spinning at a speed of 2000 RPM, whereas, non-aligned NF were collected on an immobile mandrel.

GBM orthotopical xenotransplantation

Gli4 and GliT GBM cells were dissociated enzymatically using trypsin 0.25% and then resuspended in PBS at 0.5×10^5 cells per μL . Three microliters (1.5×10^5 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 anesthesia. A Hamilton syringe connected to a pump was used to inject the cell suspension at a flow rate of $0.3 \mu\text{l}/\text{min}$. At the end of the surgery, the remaining cells were seeded to check for cell viability. After 3 months, the animals were sacrificed using pentobarbital terminal anesthesia and fixed by intracardiac PFA perfusion. Brains were removed and post-fixed ON in PFA 4% and then immersed successively in 7%, 15% and 30% sucrose solutions. Afterward, the brains were included in an optimal cutting temperature (OCT) compound, snap-frozen and cryosectioned. The thickness of the coronal brain sections is $14 \mu\text{m}$.

Nanofibers cryosectioning

For cryosectioning, the nanofibers were included in an optimal cutting temperature (OCT) compound before freezing. The thickness of the lateral sections is $14 \mu\text{m}$.

Immunofluorescence and 3D image reconstitution

After 6 days of culture, Gli4 and GliT on NF or PS were fixed by PFA 4%. Cells (on NF or PS) 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 are: N-Cadherin (abcam ab12221), Calpain-2 (abcam ab155666) and Human Nuclei (Millipore MAB1281). Fluorochrome-coupled secondary antibodies were incubated 2 hours at room temperature (dilution 1/500). The sections were mounted in fluoromount medium and dried before observation. The actin cytoskeleton was stained with phalloidin green and cell nuclei with Hoechst 33342.

Image capturing and Z-stack acquisition were performed using Confocal 2 Zeiss LSM 5 Live DUO and Widefield 1 – Zeiss Axioimager Z1/ Zen (equipped with an apotome) microscopes. Imaris x64 8.1.2 software has been used for image 3D reconstitution.

The Quantifications were done using ZEN 2012 software.

Scanning Electron Microscopy

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

Western blot

Proteins were extracted directly by submerging the NF in RIPA buffer (+ phosphatase/protease inhibitors). Twenty µg of 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: 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) 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.

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 AF and N-AF which were done twice). All the values are expressed as mean +/- SEM. Statistical tests were done using graphpad prism software.

Results

1. Nanofibers network production and physical characterization

The corpus callosum which connects both hemispheres is the favourite route for the contralateral hemisphere invasion by glioblastoma cells (Kallenberg et al., 2013). The trunk of the corpus callosum prepared with the Klinger's technique highlights the three-dimensional anatomic organization of the heterotypic fibers (Fig. 1A, B) on which glioblastoma cells migrate. To better understand, characterize and target these migrating cells on the corpus callosum we imagined a 3D migration system constituted of synthetic biocompatible nanofibers. This 3D migration system is made of polyacrylonitrile and is generated by electrospinning. The diameter of the nanofibers estimated at $0.68 \pm 0.28 \mu\text{m}$ (Fig. 1C) is similar to the diameter of the axons present in the corpus callosum ($0.64 \pm 0.42 \mu\text{m}$) (Liewald et al., 2014). The nanofiber network could be generated either aligned or randomly organized (Fig. 1C). The aligned nanofiber network displays a more general orientation rather than strictly parallel fibers. When submitted to high energy light, NF appear fluorescent. They emit in red, green and at a much lower extent in blue and infrared (Fig. 1D). Finally, in order to modify the microenvironment, the NF could be functionalized with laminin. The laminin deposits are discontinuously distributed on the NF (Fig. 1E and F, white arrows).

2. The aligned nanofibers constitute a 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 (Guichet et al., 2013). *In vitro*, they generate NS when cultivated in growth factor-containing medium (proliferative medium). When seeded on a 2D planar surface (PS) and cultivated in the absence of growth factors and in the presence of serum (differentiation medium), NS adhere to the support and Gli4 cells differentiate and migrate away from the NS (Guichet et al., 2013), (Filipovic et al., 2012). Also, when seeded on 3D aligned NF and cultivated in differentiation medium, Gli4 NS adhere to the surface and penetrate the fiber network (Fig. 2A). Gli4 cells proliferate and migrate away from the NS (Fig. 2A-C). Analysis of Gli4 cells repartition within the fiber

network shows that cells migrate deeply inside it (Fig. 2D). In this environment, Gli4 cells form cellular extensions in different directions to attach to several fibers in a tridimensional manner (Fig. 2E and F, yellow arrows). Gli4 cells have a diameter almost forty times larger than the fiber (20 μM versus 0.5 μM) and encircle the nanofibers to adhere and migrate (Fig. 2E and F, white arrow). This encirclement allows Gli4 cells to interact ventrally, laterally and dorsally within the network. In addition, the heterogeneous fiber interspaces are distributed from 0.1 to 10 μm^2 with maximal distribution between 1 and 2 μm^2 . This spacing forces cells to deform in order to penetrate the nanofiber network (Fig. 2D), reminiscent of the natural cellular confinement observed *in vivo* (Friedl and Alexander, 2011). Altogether, these data show that PAN nanofibers are permissive for glioblastoma cell adhesion and migration in a tridimensional microenvironment.

3. Cellular adhesion to the ECM and focal adhesion dynamics are different between the 2D conventional planar surfaces and the 3D aligned nanofibers in Gli4 cells

Focal adhesions (FA) play a central role in the migration process by controlling the dynamic cycles of attachment and detachment to the ECM (Parsons et al., 2010). FA are considered as prototypical integrin-mediated cell-ECM contact sites that link cellular actin cytoskeleton to the ECM scaffold (Manninen and Varjosalo, 2017). Galectin-3 has been shown to control FA turnover and cell migration (Goetz et al., 2008). Also, galectin-3 stimulates fibronectin polymerization, FAK and PI3K activation, and integrin $\alpha 5\beta 1$ translocation to fibrillar adhesions in mammary carcinoma cells (Lagana, Molecular and Cellular Biology, 2006). Therefore, our next aim was to compare both the interaction of Gli4 cells with the ECM and their FA turnover on either 2D PS or 3D NF functionalized or not with PDL/LN (thereafter, +/- LN). Integrin $\beta 1$, $\alpha 6$ and galectin-3 expressions were analyzed. Between coated plates (PS + LN) and coated fibers (NF + LN), the protein levels of galectin-3 and integrin $\beta 1$ were increased by 6 and 2.6 fold respectively and the protein level of integrin $\alpha 6$ was decreased by 2.5 fold (Fig. 3A and Supp. Fig. 2). Galectin-3 expression level increases also on non-coated NF in comparison to non-coated PS (Fig. 3A and Supp. Fig. 2). On the contrary, between non-

coated plates (PS) and non-coated fibers (NF), no difference in integrin $\beta 1$ and $\alpha 6$ protein levels were observed (Fig. 3A and Supp. Fig. 2). By immunofluorescence, we show that integrin $\beta 1$ localized at the membrane of migrating Gli4 on NF + LN (Fig. 3B, white arrowheads), while it is distributed in the cytoplasm and around the nucleus in Gli4 growing on PS + LN (Fig. 3B, yellow arrowheads). Additionally, on NF + LN, integrin $\beta 1$ membrane staining is localized in the attachment points with the nanofibers (Fig. 3B, white arrowheads). It is reported that subsequently to integrins engagement with the ECM ligands, their conformational changes induce the autophosphorylation of the Focal Adhesion Kinase (FAK), a key player in integrin signaling transduction pathway (Zhao and Guan, 2011). Thus, we asked whether or not the phosphorylation of FAK on Tyrosine 397 is different between the NF and the PS pretreated or not with PDL/LN. Our data indicate that FAK phosphorylation increases when PS or NF are coated with LN (Fig. 3A). However, by calculating the ratio of pFAK (Y397)/FAK on NF+/- LN and PS+/- LN, we do not find a significant difference (Supp. Fig. 2), suggesting that the 3D environment does not modify the regulation of FAK on Y397.

Focal adhesion dynamics are different between 2D and 3D environments (Fraleigh et al, Nature Cell Biology, 2010). Knowing that GICs migrate in a tridimensional microenvironment on the NF (Fig. 2 and Supplementary Fig. 4), and that they express higher levels of adherent molecules on this matrix (Fig. 3A and Supp. Fig. 2), we decided to test the expression of talin 1/2, vinculin and calpain-2 in Gli4 cells on the NF +/- LN and PS +/- LN supports. Intact and cleaved forms have been detected in Gli4 cells plated on PS +/- LN with the highest level of talin cleavage observed on PS + LN (Fig. 3A and Supp. Fig. 2). On the contrary, talin is not cleaved in Gli4 cells on NF +/- LN (Fig. 3A and Supp. Fig. 2) and the highest level of intact talin1/2 is observed when Gli4 are cultivated on NF + LN (Fig. 3A). The expression level of vinculin remained invariable between NF +/- LN and PS +/- LN (Fig. 3A and Supp. Fig. 2). In addition, the talin1/2 cleavage is known to be regulated by the cysteine-protease, calpain-2 (Franco et al., 2004). We therefore quantified the level of expression of calpain-2 in the different support conditions. Figure 3A shows that calpain-2 expression level decreased by 2 fold in Gli4 cells plated on NF + LN in comparison to PS + LN (Fig. 3A and Supp. Fig. 2). No difference of calpain-2

expression was observed between Gli4 cells plated on NF - LN or on PS - LN (Fig. 3A and Supp. Fig. 2). We observed the expression of calpain-2 by immunofluorescence and confirm that it is less expressed in NF + LN as compared to PS + LN (Fig. 3B). Altogether, our results show that integrin β 1- and galectin-3- mediated adhesion to the ECM was enhanced on the nanofibers. Also, the focal adhesion dynamics regulated by calpain-2 expression and talin cleavage was different between the PS and NF systems.

4. GliT cells adherence and interaction with the ECM are not improved on NF

After the demonstration of the increase of cell adhesion molecules expression and Gli4 cells interaction with the ECM on the NF and the subsequent dissimilarity in focal adhesions dynamics compared to PS, we decided to examine another glioblastoma primary cell line: GliT. GliT is also patient-derived but is less invasive than Gli4 *in vivo* (Hassani. Z *et al*, accepted). Our transcriptomic analysis shows that 1049 genes have a different expression profil between Gli4 and GliT cells in proliferation non-adherent conditions (Supp. Fig. 5). Among these genes, several ECM related genes are differentially expressed between Gli4 and GliT cells. Laminin chains α 2, and β 3 coding genes: *LAMA2*, and *LAMB3* are highly expressed in Gli4 whereas collagen type II α 1 chain (*COL2A1*) and collagen type VI α 2 chain (*COL6A2*) genes are overexpressed in GliT cells (Supp. Fig. 5). Additionally, integrin ECM receptors genes: *ITGA8* (α 8 chain) and *ITGA10* (α 10 chain) are upregulated in Gli4, while *ITGA6* (α 6 chain) and *ITGB5* (β 5 chain) in GliT (Supp. Fig. 5). GliT also differ from Gli4 for the protein expression levels of galectin-3, integrin β 1 and integrin α 6 on the different migration systems and conditions (Fig. 4A and Supp. Fig. 2). For instance, galectin-3 protein level decreased by 1.7 fold in GliT when plated on NF + LN in comparison to PS + LN (Fig. 4A and Supp. Fig. 2), whereas we found a 6-fold increase between the same conditions with Gli4. In addition, integrin α 6 expression slightly increases on NF +/- LN relatively to PS +/- LN (Fig. 4A and Supp. Fig. 2) and integrin β 1 protein level was not different between NF +/- LN and PS +/- LN for (Fig. 4A and Supp. Fig. 2). However, similarly to Gli4, the ratio of pFAK (Y397)/FAK did not vary according to the different culture systems and

conditions (Supp. Fig. 2). Finally, talin 1/2 cleavage differs between Gli4 and GliT. No difference is observed between the protein levels of intact and cleaved talin 1/2, and calpain2 expression for GliT plated either on NF +/- LN or PS +/- LN (Fig. 4A and Supp. Fig. 2). Interestingly, talin 1/2 seems to be mainly un-cleaved in all conditions with GliT, whereas it was mostly cleaved in Gli4 grown in 2D. These quantifications are confirmed by immunofluorescence observations (Fig. 4B) which show a strong expression of calpain-2 in 2D and in 3D, contrarily to Gli4. Altogether, our results show that Gli4 and GliT cells express different subsets of ECM related genes and that integrin β 1- and galectin-3- mediated adhesion to the ECM was not enhanced on the nanofibers for GliT cells. Moreover, the focal adhesion dynamics regulated by calpain-2 expression and talin cleavage was not different between the two systems for GliT cells (PS *versus* NF).

5. Integrin β 1 and galectin-3 are upregulated in Gli4 cells in the corpus callosum whereas calpain-2 is down-regulated in invasive Gli4 and GliT cells in vivo

When transplanted in the brain of nude mice, Gli4 GICs have shown to be highly invasive (Guichet et al., 2013) (Fig. 5A). They invade the cortex, proceed through the fibrous white matter tracts of the corpus callosum and reach the contro-lateral hemisphere (Fig. 5A). On the contrary, GliT GICs are less invasive and form a bulky tumor (Fig. 5A, area delineated by dashed line). They form a delimited extracranial or intracranial tumor mass. The expression of integrin β 1 (Fig. 5B) and galectin-3 (Fig. 5C) is upregulated in invasive Gli4 cells migrating along the aligned myelinated fibers of the corpus callosum (Fig. 5C, yellow arrow) in comparison to the cerebral cortex (white arrow) or the striatum. Human nestin and human nuclei (HuNu) specific immunostaining was used to identify the human glioblastoma cells inside the mice brain (Fig. 5B and C). Calpain-2 is not expressed in Gli4 invasive cells in the corpus callosum, nor in the cortex (Fig. 5D). Interestingly, GliT which localise inside the tumor bulk express calpain-2 (Fig. 5D) while GliT migrating away from the tumor mass and invading the cerebral cortex and the corpus callosum do not express calpain-2 (Fig. 5D). This set of data indicate that integrin β 1 and galectin-3 expressions in Gli4 is dependent on the cerebral

microenvironment and that calpain-2 expression seems to be inversely correlated to the invasive potential of GICs *in vivo*.

6. Gli4 GICs migrate individually or collectively in the presence or absence of laminin on PAN aligned nanofibers

Our previous results demonstrated that Gli4 cells interact more with the ECM on NF than on 2D PS (Fig. 3). Also, *in vivo* data showed that Gli4 cells are more invasive than GliT (Fig. 5A). Accordingly, we decided to focus on the Gli4 cell line to evaluate the effects of the variation of the ECM compositional and physical properties on GIC migration on the NF *in vitro*. Using fluorescence microscopy, 3D image reconstitution and electron microscopy, we have demonstrated that in the absence of laminin (native NF), Gli4 cells migrate collectively by forming aggregates composed of two to dozens of cells tightly associated together (Fig. 6A-C). On the contrary, on laminin-functionalized NF, Gli4 GICs are separated from each other (Fig. 6D-F) and migrate in an individual manner. Therefore, in the differentiation conditions, GICs adopt two different migratory modes, collective or individual, depending on the functionalization of the NF with PDL/LN. We further characterized these two migration modes (i) by analyzing the organization of the actin cytoskeleton and the N-cadherin-mediated adherens junctions and (ii) by quantifying the number of cell aggregates on native and functionalized fibers. On the native NF, the actin cytoskeleton-specific phalloidin staining showed that most of the cells are rounded (Fig. 6B). Nevertheless, inside the aggregates, the actin cytoskeleton is continuous between the cells (Fig. 6B). At the center of the cell mass, the cells are rounded (Fig. 6A, yellow star), while at the border they are bipolar and have a lamellipodium (Fig. 6A, yellow arrowheads). On the contrary, on PDL/LN functionalized NF, Gli4 GICs are individual, bipolar, asymmetric and each of them possesses a lamellipodium at the front edge (Fig. 6D-E, red arrowheads). We observed that collectively migrating GICs express N-Cadherin at the cell membrane level (Fig. 6C). Thus N-Cadherin-mediated adherens junctions are maintained during Gli4 collective migration. Whereas, during Gli4 individual migration on NF + LN, we observe that the N-Cadherin

staining is present mainly in the cytoplasm (Fig. 6F). Taken together, our results show that NF functionalization with laminin modulates the migration mode of Gli4 cells. In fact, Gli4 GICs migrate collectively or individually respectively in the absence or presence of laminin. Furthermore, the continuous actin cytoskeleton and N-Cadherin-mediated cell-cell adherens junctions are responsible for the coordination between the cells during Gli4 collective migration on native NF. On the other hand, in the presence of laminin, N-cadherin junctions are absent at the membrane level.

In order to validate the effects of laminin presence on the migration mode of Gli4 cells, we have quantified the number of collective migration events per neurosphere on both native and functionalized fibers (Fig. 6G). To perform such quantification, we seeded NS of the same size and containing the same number of cells (Supp. Fig. 1). We noticed a significant decrease ($****p < 0.0001$) in the mean number of collective migration per NS after the functionalization of the NF with PDL/LN. The number of collective migration unit per NS decreases from 80 to 20 (Fig. 6B) when the fibers are functionalized.

7. Gli4 GICs respond to a topoinduction signal resulting from the orientation and organization of the NF.

In order to study the impact of the mechanotransduction signals generated by the ECM topology on GIC migration, we compared the direction of migration of Gli4 cells on aligned (AF) or non-aligned NF (N-AF) functionalized or not with laminin. First of all, our results show that the addition of laminin increases the number of migrating cells outside the NS on AF as well as on N-AF (Fig. 7A). In addition, we observed that on N-AF, Gli4 cells migrate away from the NS in all the directions in the presence or absence of laminin (Fig. 7A). However, on AF, Gli4 cells migrate predominantly in the direction of the nanofibers than in the perpendicular direction, and this effect is mainly observed in the presence of laminin (Fig. 7A) (the direction of the NF is indicated by the orange arrows). To consolidate our observations, we quantified the number of migrating cells in function of the migration distance on N-AF and in the parallel or perpendicular direction of AF in the presence or absence of laminin. The

length of the area of migration was demarcated between the NS border and a distance of 2 mm in the direction of migration (Supp. Fig. 3). Our results show a significant increase (**** $p < 0.0001$) in the number of Gli4 migratory cells on N-AF in the presence of laminin in comparison to native NF (Fig. 7B). Similarly, the addition of laminin increases the number of Gli4 cells migrating in the parallel direction of AF (**** $p < 0.0001$) (Fig. 7C) as well as in the perpendicular direction (**** $p < 0.0001$) (Fig. 7D). In the parallel direction of AF and in the presence of laminin, the number of Gli4 cells increases significantly in the distance between 200 μm and 800 μm from the border of the NS compared to non-functionalized NF (**** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, Fig. 7C). The same result was observed in the perpendicular direction of AF where the number of cells increases also significantly in the area between 200 μm and 600 μm from the border of the NS in the presence of laminin (**** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$) (Fig. 7D). On the contrary, no significant difference was observed in the number of migratory cells near the border of the NS (0-200 μm) in the parallel and perpendicular directions of AF in the presence or absence of laminin (Fig. 7C and D). The presence of cells adjacent to the NS results from proliferation more than migration in what is known as expansive growth (Friedl et al., 2012). Accordingly, in order to analyze the direction of migration of Gli4 cells on AF, we decided to quantify the total number of cells in the parallel or perpendicular direction of the NF in the distance comprised between 200 μm and 2000 μm (Fig. 7E). We observed a significant increase in the number of migratory cells in the parallel direction of AF in comparison to the perpendicular direction in the absence of laminin (* $p < 0.1$) and in the presence of laminin (** $p < 0.01$) (Fig. 7E). Taken together, our results show that the presence of laminin increases the migration of Gli4 cells on AF and N-AF. Moreover, the NF orientation dictates the direction of migration of Gli4 GIC. On non-oriented NF, Gli4 cells migrate in all the directions, while on AF, they migrate more in the parallel direction than in the perpendicular one.

Discussion

After decades of fundamental and clinical research, glioblastoma multiform remains incurable. While this cancer is rarely metastatic, the highly invasive capacity of glioblastoma cells inside the brain makes total surgical resection practically impossible. Therefore, new therapies targeting specifically the migrating cells are urgently needed. However an extensive comprehension of the mechanisms involved in glioblastoma invasion is a mandatory prerequisite. Inspired by this requirement, we decided to set up a new NF scaffold to study the migration of glioblastoma initiating cells and their interaction with the surrounding ECM in a tridimensional microenvironment.

It has been very well documented that glioblastoma cells adapt outstandingly to various environment during their migration inside the brain. By employing myosin II contraction, glioblastoma cells push their bulky nucleus and cell body inside submicrometer pores in the ECM of the brain parenchyma in a manner similar to neural progenitors (Beadle et al., 2008). One considerable problem encountered in the use of electrospun nanofibers is the poor cellular infiltration or in-growth (Shologu et al., 2016). This is explained by the inability of the cells to insinuate their nucleus and cell body in the pores or spaces separating adjacent nanofibers. To overcome this inconvenience, several techniques have been developed such as the production of nanoyarn scaffolds composed of nanofibers. On aligned nanoyarn scaffolds, L929 mouse fibroblasts proliferation, morphology and infiltration were improved in comparison to randomly oriented nanofibrous scaffolds (Wu. J et al, Materials Letters, 2012). In our study, the PAN electrospun NF do not require to be aligned to create interstitial spaces permissive to cellular infiltration (Supp. Fig. 4). This is likely explained by the material chemical nature and NF spacing.

Another challenge confronted during electrospinning was to obtain NF possessing a diameter similar to that of the human brain neuronal axons. In our study, the values ranged between 0.4 μm and 1 μm with an average diameter of 0.68 μm . In comparison, Liewald. D and co-workers found that the average axons diameter in the corpus callosum of three different human brains is between 0.64 μm

and 0.74 μm (Liewald et al., 2014). Gli4 GICs surround the NF and at the same time penetrate profoundly inside the tissue (Fig. 2). In these conditions, Gli4 cells are fully embedded in a tridimensional microenvironment.

The GIC neurosphere culture *per se*, is tridimensional. Inside the NS, cancerous cells are closely packed. They form cell-cell junctions and interact with the surrounding ECM at the entire cell surface. However, when seeded on a 2D planar surface, a dorso-ventral polarity is imposed to the NS as well as migrating cells and the interaction with the ECM is exclusively at the basal or ventral side. On the 3D NF, this interaction is not restricted to the cell ventral side and the dorso-ventral asymmetry is abolished. Additionally, other physical and spatial aspects of the ECM such as elasticity, stiffness, porosity, dimensionality and epitopes arrangement as defined by Akhmanova. M *et al* (Akhmanova et al., 2015) are presumably distinct between the planar surfaces and 3D models. Last but not least, the matrix nanotopography is also radically different. Hence, the biophysical and biochemical cues generated by the extracellular milieu are differently integrated on the PS and the NF. Accordingly, we show that several FA components and cell-ECM interface proteins are dissimilarly expressed in Gli4 GICs on the PS and into the NF including integrins, galectins and other adhesion modulating proteins. First, our data show an increase in the expression of integrin $\beta 1$ and galectin-3 in Gli4 cells on the NF (Fig. 3). Integrins play a cardinal role in ECM sensing and transduce intracellular signals regulating cell adhesion, proliferation, migration and survival (Hynes, 2002) (Pan et al., 2016). Notably, integrin $\alpha 6\beta 1$ is a receptor for laminin (Belkin and Stepp, 2000). As well, galectin-3 is a multifunctional modulator of cell-cell and cell-ECM adhesion (Hughes, 2001) and promotes adhesion to laminin (Babouri et al., 2015). Thus, we suggest that Gli4 cells adhere more to the ECM on the NF than on PS. Integrin $\alpha 6$ expression was found to be decreased on the NF. Interestingly, integrin $\alpha 6$ has been identified as a new enrichment marker for glioblastoma stem cells (Lathia et al., 2010). The expression of Olig2 and Nestin, other well-identified markers of GSC, decrease on the NF in

comparison to PS (data not shown). Taking into consideration these results, we can hypothesize that more Gli4 GICs engage into differentiation in the NF 3D microenvironment.

We have shown that calpain-2 expression is diminished on the NF support. Consequently, talin 1/2 was no more cleaved in this culture context (Fig. 3). The opposite was observed on 2D PS (Fig. 3). Mechanistically, talin cooperates with vinculin to provide the link between ECM-bound integrins and intracellular F-actin during cell adhesion and migration (Atherton et al., 2015). In addition, talin proteolysis by calpain-2 regulates adhesion dynamics and the disassembly of FA components paxillin, vinculin and zyxin (Franco et al., 2004). Although the role of FA components has been very well characterized on 2D supports, it remains controversial in 3D. On 2D matrices, the cell migration speed is controlled by the FA turn-over. In 3D-embedded cells, migration is regulated by stabilization of lamellipodial protrusions, and both generation of traction force against the substratum and the regulated release of adhesions at the cell rear (Lauffenburger and Horwitz, 1996) (Fraley et al., 2010).

Conjointly, knockdown of the two focal adhesion proteins vinculin and NEDD9 increased migration rates on 2D surfaces but significantly reduced it in 3D matrices (Mierke et al., 2010; Zhong et al., 2012). Indeed, while the focal adhesions are continuously regenerated during migration on 2D supports, 3D migration requires more stable cell-ECM adhesions. In this context, we propose that 3D-embedded cells exert a traction force on the ECM allowing them to penetrate inside a crosslinked meshwork. To do so, Gli4 GICs migrating in 3D NF might delay their adhesions disassembly by downregulating calpain-2. Gli4 cells can thus apply more traction force and subsequently can insinuate their nucleus and cell body in the fibers network.

We then decided to examine the expression of calpain-2 in the two different human glioblastoma primary cultures Gli4 and GliT xenografted in the brain of Nude mice. We found that calpain-2 is exclusively expressed by GliT cells staying inside the bulky tumor. Migrating GliT or Gli4 cells do not express calpain-2 (Fig. 5). The role of calpain-2 in the invasion of glioblastoma cells has not been extensively studied. Although, Greenwood. JA and co-workers have demonstrated that calpain-2 is

necessary for glioblastoma invasion *in vitro* by controlling the activity of MMP-2 (Jang et al., 2010) and *in vivo* in the zebrafish brain (Lal et al., 2012). However, the diminution of the invasive capacity of calpain-2–knockdown glioblastoma cells has been observed only in the barrier-free region along blood vessels. Further investigation is needed to determine whether GBM invasion is compromised also along axonal nerve tracts and in the narrow, tortuous routes inside the brain parenchyma where the migration is more dependent on acto-myosine contraction and traction forces.

Interestingly, the expression of calpain-2 decreased for Gli4 grown on NF in comparison to planar surfaces but this was not the case for GliT. According to our transcriptomic data, Gli4 and GliT cells express different amounts of ECM related genes coding for laminin (*LAMA2*, *LAMB3*), collagen (*COL2A1*, *COL6A2*) and ECM receptors integrins (*ITGA6*, *ITGB5*, *ITGA8*, *ITGA10*) in the proliferation non adherent conditions (NS culture) (Supp. Fig. 5). We have demonstrated also that integrin β 1, integrin α 6 and galectin-3 protein expression levels are different between Gli4 and GliT cells on the different migration systems (NF *versus* PS) in differentiation adherent conditions (Fig. 3 and 4 and Supp. Fig. 2). ECM secretion, sensing and dependent signal transduction pathways could be different between Gli4 and GliT cell lines. Our data show that Gli4 cells hold the ability to respond to physical extracellular cues and in the present case can translate the sensing of the 3D environment into the repression of calpain-2 on the NF. This repression ultimately leads to a better adhesion of Gli4 cells to the substrate, potentially explaining their invasive properties as compared to GliT cells. Additional GIC cells should be tested to make a potential link between talin cleavage, GBM invasivity and GBM subgroups.

Finally, we have evaluated the effects of the modulation of the biochemical and mechanical properties of the ECM of the NF on the migration of GIC. We have determined that Gli4 GICs migrate individually in the presence of laminin but collectively in its absence (Fig. 6). Correspondingly, it has been demonstrated that when ErbB2-Positive Breast Cancer Cells detach from the ECM, the MAPK signaling pathway activated after cell-cell junction formation promotes their survival (Rayavarapu et

al., 2015). This strategy is used also by circulating tumor cells (CTC) to survive after the separation from the initial tumor and during the circulation in the blood stream. In this case, collective aggregates are more metastatic than individual cells (Aceto et al., 2014). Thus, the shift from a migration mode to another is related to the microenvironment and is associated with an increase in the invasive and metastatic capacities of tumor cells. Therefore, we hypothesize that the switch from an individual migration mode to a collective movement in the absence of laminin promotes the survival and migration of Gli4 cells.

To study the implication of the ECM topology in GIC migration, we have produced aligned (AF) and non-aligned NF (N-AF). Our results showed that the addition of laminin on AF or N-AF increases the migration of Gli4 cells (Fig. 7B-D). This is in accordance with previous results demonstrating the induction of the migration of glioblastoma cells by laminin *in vitro* (Tysnes et al., 1996) or in the perivascular space *in vivo* (Lathia et al., 2012). We have demonstrated also that the orientation of the NF governs the direction of migration of Gli4 cells. On N-AF, Gli4 cells migrate in different directions, whereas they migrate mostly in the direction of the NF on AF. Once again, our results are in accordance with *in vivo* observations where glioblastoma cells are guided by the alignment of the myelinated fibers in the corpus callosum.

In summary, we have developed a new electrospun NF scaffold suitable for glioblastoma adhesion and migration in a 3D microenvironment. This system highlights the importance of the N-cadherin-mediated cell-cell adhesion in the collective migration process and the role of laminin in accelerated migration of glioblastoma cells. The PAN NF matrix represents a valuable tool to study the role of the ECM in GIC migration and might serve as a relevant platform for anti-migratory drugs screening *in vitro*.

Acknowledgments

We thank Gliomatrack: INCA/INSERM for the financial support.

References

- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., *et al.* (2014). Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* *158*, 1110-1122.
- Akhmanova, M., Osidak, E., Domogatsky, S., Rodin, S., and Domogatskaya, A. (2015). 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.
- Atherton, P., Stutchbury, B., Wang, D. Y., Jethwa, D., Tsang, R., Meiler-Rodriguez, E., Wang, P., Bate, N., Zent, R., Barsukov, I. L., *et al.* (2015). Vinculin controls talin engagement with the actomyosin machinery. *Nat Commun* *6*, 10038.
- Babouri, R., Rolland, M., Sainte-Catherine, O., Kabouche, Z., Lecouvey, M., Bakalara, N., Volle, J. N., Virieux, D., and Pirat, J. L. (2015). alpha-Halogenated oxaphosphinanes: Synthesis, unexpected reactions and evaluation as inhibitors of cancer cell proliferation. *Eur J Med Chem* *104*, 33-41.
- Beadle, C., Assanah, M. C., Monzo, P., Vallee, R., Rosenfeld, S. S., and Canoll, P. (2008). The role of myosin II in glioma invasion of the brain. *Mol Biol Cell* *19*, 3357-3368.
- Beliveau, A., Thomas, G., Gong, J., Wen, Q., and Jain, A. (2016). Aligned Nanotopography Promotes a Migratory State in Glioblastoma Multiforme Tumor Cells. *Sci Rep* *6*, 26143.
- Belkin, A. M., and Stepp, M. A. (2000). Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech* *51*, 280-301.
- Blandin, A. F., Renner, G., Lehmann, M., Lelong-Rebel, I., Martin, S., and Dontenwill, M. (2015). beta1 Integrins as Therapeutic Targets to Disrupt Hallmarks of Cancer. *Front Pharmacol* *6*, 279.
- Cuddapah, V. A., Robel, S., Watkins, S., and Sontheimer, H. (2014). A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci* *15*, 455-465.
- Das, M., Subbayya Ithychanda, S., Qin, J., and Plow, E. F. (2014). Mechanisms of talin-dependent integrin signaling and crosstalk. *Biochim Biophys Acta* *1838*, 579-588.
- Dromard, C., Guillon, H., Rigau, V., Ripoll, C., Sabourin, J. C., Perrin, F. E., Scamps, F., Bozza, S., Sabatier, P., Lonjon, N., *et al.* (2008). Adult human spinal cord harbors neural precursor cells that generate neurons and glial cells in vitro. *J Neurosci Res* *86*, 1916-1926.
- Filipovic, R., Santhosh Kumar, S., Fiondella, C., and Loturco, J. (2012). Increasing doublecortin expression promotes migration of human embryonic stem cell-derived neurons. *Stem Cells* *30*, 1852-1862.

- Fraley, S. I., Feng, Y., Krishnamurthy, R., Kim, D. H., Celedon, A., Longmore, G. D., and Wirtz, D. (2010). A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility. *Nat Cell Biol* 12, 598-604.
- Franco, S. J., Rodgers, M. A., Perrin, B. J., Han, J., Bennin, D. A., Critchley, D. R., and Huttenlocher, A. (2004). Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol* 6, 977-983.
- Friedl, P., and Alexander, S. (2011). Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 147, 992-1009.
- Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., and Segall, J. E. (2012). Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 14, 777-783.
- Glading, A., Lauffenburger, D. A., and Wells, A. (2002). Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol* 12, 46-54.
- Goetz, J. G., Joshi, B., Lajoie, P., Strugnell, S. S., Scudamore, T., Kojic, L. D., and Nabi, I. R. (2008). Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. *J Cell Biol* 180, 1261-1275.
- Gritsenko, P. G., Ilna, O., and Friedl, P. (2012). Interstitial guidance of cancer invasion. *J Pathol* 226, 185-199.
- Guichet, P. O., Bieche, I., Teigell, M., Serguera, C., Rothhut, B., Rigau, V., Scamps, F., Ripoll, C., Vacher, S., Taviaux, S., *et al.* (2013). Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. *Glia* 61, 225-239.
- Herrera-Perez, M., Voytik-Harbin, S. L., and Rickus, J. L. (2015). Extracellular Matrix Properties Regulate the Migratory Response of Glioblastoma Stem Cells in Three-Dimensional Culture. *Tissue Eng Part A* 21, 2572-2582.
- Horton, E. R., Byron, A., Askari, J. A., Ng, D. H., Millon-Fremillon, A., Robertson, J., Koper, E. J., Paul, N. R., Warwood, S., Knight, D., *et al.* (2015). Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat Cell Biol* 17, 1577-1587.
- Hughes, R. C. (2001). Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 83, 667-676.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.
- Jang, H. S., Lal, S., and Greenwood, J. A. (2010). Calpain 2 is required for glioblastoma cell invasion: regulation of matrix metalloproteinase 2. *Neurochem Res* 35, 1796-1804.
- Kallenberg, K., Goldmann, T., Menke, J., Strik, H., Bock, H. C., Stockhammer, F., Buhk, J. H., Frahm, J., Dechent, P., and Knauth, M. (2013). Glioma infiltration of the corpus callosum: early signs detected by DTI. *J Neurooncol* 112, 217-222.
- Lal, S., La Du, J., Tanguay, R. L., and Greenwood, J. A. (2012). Calpain 2 is required for the invasion of glioblastoma cells in the zebrafish brain microenvironment. *J Neurosci Res* 90, 769-781.
- Lathia, J. D., Gallagher, J., Heddleston, J. M., Wang, J., Eyler, C. E., Macswords, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2010). Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 421-432.

- Lathia, J. D., Li, M., Hall, P. E., Gallagher, J., Hale, J. S., Wu, Q., Venere, M., Levy, E., Rani, M. R., Huang, P., *et al.* (2012). Laminin alpha 2 enables glioblastoma stem cell growth. *Ann Neurol* 72, 766-778.
- Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.
- Liewald, D., Miller, R., Logothetis, N., Wagner, H. J., and Schuz, A. (2014). Distribution of axon diameters in cortical white matter: an electron-microscopic study on three human brains and a macaque. *Biol Cybern* 108, 541-557.
- Manninen, A., and Varjosalo, M. (2017). A proteomics view on integrin-mediated adhesions. *Proteomics* 17.
- Mierke, C. T., Kollmannsberger, P., Zitterbart, D. P., Diez, G., Koch, T. M., Marg, S., Ziegler, W. H., Goldmann, W. H., and Fabry, B. (2010). Vinculin facilitates cell invasion into three-dimensional collagen matrices. *J Biol Chem* 285, 13121-13130.
- Mulhaupt, H. A., Leitinger, B., Gullberg, D., and Couchman, J. R. (2016). Extracellular matrix component signaling in cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 97, 28-40.
- Nayal, A., Webb, D. J., and Horwitz, A. F. (2004). Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 16, 94-98.
- Pan, L., Zhao, Y., Yuan, Z., and Qin, G. (2016). Research advances on structure and biological functions of integrins. *Springerplus* 5, 1094.
- Parsons, J. T., Horwitz, A. R., and Schwartz, M. A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 633-643.
- Pickup, M. W., Mouw, J. K., and Weaver, V. M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* 15, 1243-1253.
- Rayavarapu, R. R., Heiden, B., Pagani, N., Shaw, M. M., Shuff, S., Zhang, S., and Schafer, Z. T. (2015). The role of multicellular aggregation in the survival of ErbB2-positive breast cancer cells during extracellular matrix detachment. *J Biol Chem* 290, 8722-8733.
- Shologu, N., Szegezdi, E., Lowery, A., Kerin, M., Pandit, A., and Zeugolis, D. I. (2016). Recreating complex pathophysiologies in vitro with extracellular matrix surrogates for anticancer therapeutics screening. *Drug Discov Today* 21, 1521-1531.
- Tysnes, B. B., Larsen, L. F., Ness, G. O., Mahesparan, R., Edvardsen, K., Garcia-Cabrera, I., and Bjerkgvig, R. (1996). Stimulation of glioma-cell migration by laminin and inhibition by anti-alpha3 and anti-beta1 integrin antibodies. *Int J Cancer* 67, 777-784.
- Wong, S. Y., and Kumar, S. (2014). Matrix regulation of tumor-initiating cells. *Prog Mol Biol Transl Sci* 126, 243-256.
- Zhao, X., and Guan, J. L. (2011). Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev* 63, 610-615.

Zhong, J., Baquiran, J. B., Bonakdar, N., Lees, J., Ching, Y. W., Pugacheva, E., Fabry, B., and O'Neill, G. M. (2012). NEDD9 stabilizes focal adhesions, increases binding to the extra-cellular matrix and differentially effects 2D versus 3D cell migration. PLoS One 7, e35058.

Figure legends

Figure 1. **Nanofibers physical characterization and functionalization with laminin.** The polyacrylonitril (PAN) NFs were produced by electrospinning. The NF tissue mimics the organization and the alignment of the myelinated fibres of the corpus callosum. (A) Upper posterior view and (B) Antero-superior view of the dorsal aspect of the trunk of the corpus callosum showing the organization, alignment and diameter of its constituent fibers (Scale bar = 4 mm). Each fiber is formed by the assembly of different axons. The black arrows indicate the heterotypic fibers in the corpus callosum. (C) Scanning electron microscopy images showing the alignment of the PAN NF (left). We have produced also non-aligned NF (right) (scale bar = 50 μ m). (D) Fluorescence microscopy images show that the NFs are autofluorescent in green (488nm), red (594nm) but less in far red (647nm) and blue (350 nm) (scale bar = 50 μ m). To mimic the biochemical composition of the perivascular space and the basal lamina surrounding the blood vessels in the brain, we have functionalized the NF with laminin. (E) Image acquisition and (F) the corresponding z-stack 3D reconstitution of the immunostaining showing the laminin deposits (blue/false color green) on the NF. Laminin deposits are discontinuously distributed on the NF (white arrows). The NFs are autofluorescent and appear in green (false color red) (scale bar = 20 μ m).

Figure 2. **The PAN NFs create a tridimensional microenvironment convenient for GIC adhesion and migration.** The adhesion and migration of Gli4 cells were analyzed on aligned NF and in differentiation conditions. The NFs were functionalized with laminin. The actin cytoskeleton was stained with phalloidin (green) and the nucleus with Hoechst 33342 (blue). The PAN NFs are autofluorescent and emit in green or red. (A) Image showing the adherence and the penetration of the NS in the NF network (scale bar = 500 μ m). (B) Image of Gli4 NS captured at five hours after seeding on the NF and (C) after six days (scale bar = 200 μ m). At the time of seeding, the NS contained 5000 cells. (D) A lateral view of the repartition of Gli4 migratory cells (away from the NS) deep inside

the NF network (scale bar = 20 μ m). (E) Image acquisition and (F) the corresponding z-stack 3D reconstitution showing the adhesion of Gli4 cells to the NF (scale bar = 10 μ m). Gli4 cells form protrusions in variable directions to attach to several NF during their movement (yellow arrows). They migrate also by encircling the fibers (white arrow).

Figure 3. Gli4 cells adhesion to the ECM is improved on the 3D PAN NF and FA turnover is delayed in comparison to the conventional 2D PS. The expression, localization and activation of the cell surface receptors for ECM and the intracellular downstream effectors implicated in cell-ECM interactions on the PAN NF were compared to PS. The aligned NF and the PS were functionalized or not with laminin. Gli4 cells were maintained in culture on the NF or on PS during six days and in differentiation conditions. (A) Western blot for galectin-3, integrin β 1, integrin α 6, FAK, p-FAK (Y397), intact/cleaved talin 1/2, vinculin, calpain-2 in Gli4 cells. GAPDH was used as a loading control for protein normalization. (B) Immunostaining for integrin β 1 (green) and calpain-2 (green) of Gli4 cells (scale bar = 20 μ m). On the NF, integrin β 1 is expressed at the membrane and co-localize with the fibres at the sites of attachment (white arrow head), while on PS, it is located in the cytoplasm and around the nucleus (yellow arrow head). Gli4 cells nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue) and the NF are autofluorescent in red and green. Data are representative of three independent experiments.

Figure 4. GliT cells adhesion to the ECM is not improved on the PAN NF and FA turnover is similar to PS. The expression and activation of the different proteins linking the cytoskeleton to the ECM during adhesion and migration were compared between the NF and the PS for GliT cells. The aligned NF and the PS were functionalized or not with laminin. GliT cells were maintained in culture on the NF or PS during six days and in differentiation conditions. (A) Western blot for galectin-3, integrin β 1, integrin α 6, FAK, p-FAK (Y397), intact/cleaved talin 1/2, calpain-2. (B) Immunostaining for calpain-2

(green) of GliT cells (scale bar = 20 μ m). GliT cells nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue) and the NF are autofluorescent in green. Data are representative of three independent experiments.

Figure 5. Integrin β 1 and galectin-3 are upregulated in Gli4 cells in the corpus callosum while calpain-2 is downregulated in invasive Gli4 and GliT cells. The Gli4 and GliT primary lines were transplanted by stereotaxic injection into the striatum of nude mice. Three months after transplantation, the animals were sacrificed and the brains removed for analysis. (A) Immunostaining for human nuclei (green) showing the distribution of Gli4 and GliT cells inside the mice brain (scale bar = 300 μ m). Gli4 cells are invasive, whereas GliT cells form a bulky tumor *in vivo* (white dotted area). (B) Immunostaining for integrin β 1 (green) (human specific antibody) and nestin (red) (human specific antibody) of Gli4 cells. The images represent different areas of the brain (corpus callosum, cortex) (scale bar = 20 μ m). (C) Immunostaining for galectin-3 (green) and human nuclei (red) of Gli4 cells migrating in the cortex (white arrow) and in the corpus callosum (yellow arrow). (D) Immunostaining for calpain-2 (green) and human nuclei (red) of Gli4 and GliT cells. The images represent different areas of the brain (corpus callosum, cortex) and GliT bulky tumor (scale bar = 20 μ m). Gli4, GliT cells and mice brain cells nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue).

Figure 6. Gli4 cells migrate individually or collectively in the presence or absence of laminin respectively. The migration mode of Gli4 cells was analyzed in the presence or absence of laminin on aligned NF. At the time of the seeding, the NSs contained 5000 cells (more details about the control of the cell number and volume of the NS are given in supplementary figure 1 and in the methods). The images were captured after six days of culture in differentiation conditions. The Gli4 migratory cells were visualized using scanning electron microscopy (A and D) or after the staining of the actin cytoskeleton with green phalloidin (B and E) (scale bar = 20 μ m). The yellow arrowheads indicate the lamellipodia extensions in the peripheral cells, whereas the yellow star shows the rounded cells at

the center 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. Cell nuclei appear in blue (Hoechst 33342). The NFs are autofluorescent and appear in red. (C and F) Cell-cell junctions were stained using anti N-cadherin specific antibody (green) (scale bar = 20 μ m). (G) The number of collective migration was quantified in the presence or absence of laminin on aligned NF. The aggregates formed by at least 2 cells and separated physically from the NS were considered as a collective migration. Data are representative of three independent experiments, **** $p < 0.0001$ (Student-test).

Figure 7. The orientation of the NF regulates the direction of migration of GIC. The direction of migration of Gli4 cells was analyzed on aligned (AF) or non-aligned NF (N-AF) and in the presence or absence of laminin. At the initial time, the NS are formed by 5000 cells. The images were captured after six days of culture in differentiation conditions. (A) The actin cytoskeleton was stained with phalloidin (green) and the nucleus with Hoechst 33342 (blue) (scale bar = 200 μ m). The direction of the AF is indicated by the orange arrows. (B) Quantification of the number of Gli4 migratory cells in function of the distance on N-AF in the presence or absence of laminin. (C) Quantification of the number of Gli4 cells migrating in the direction of the AF in presence or absence of laminin. (D) Quantification of the number of Gli4 cells migrating in the perpendicular direction of the AF in presence or absence of laminin. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ (two way anova). The number of cells was counted in the parallel or the perpendicular direction of the AF from the border of the NS to a distance of 2000 μ m (interval of 200 μ m). (E) Quantification of the total number of Gli4 migratory cells in the parallel or perpendicular direction of AF and in the presence or absence of laminin. The number of cells was counted in the distance comprised between 200 μ m and 2000 μ m from the border of the NS. This area was chosen in order to exclude the migration related to expansive growth near the NS. * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$ (Student test). All Data are representative of two independent

experiments. Further details about the quantification procedure are present in supplementary figure 3.

Supplementary figure 1. **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) Quantification of the NS volume (mm³) in function of the cell number after 24 hours of seeding (N=12 NS). We noted the homogeneity of the volume of the NS comprised of 100-20 000 cells. The NS containing 50 000 and more are less homogenous.

Supplementary figure 2. **Western Blot quantification.** Each western blot has been performed three times (except for FAK and pFAK in GliT cell line, which has been done one time). Quantification has been performed relatively to GAPDH expression. Bands has been quantified using the Bio-rad chemidoc and the image lab software. Data are presented as mean +/- SEM.

Supplementary figure 3. **The procedure used to quantify the migration distance of Gli4 cells in the parallel or the perpendicular direction of the aligned NF.** Images were captured after six days of culture in differentiation conditions, on non-functionalized NF (A) or functionalized NF with laminin (B) (scale bar = 200µm). The direction of the NF is indicated by the orange arrow. The actin cytoskeleton was stained with phalloidin (green) and nuclei with Hoechst 33342 (blue). The length of the area of migration was demarcated between the NS border and a distance of 2000 µm, and the width was defined corresponding to the NS diameter (white lines). The cell number was counted in an interval of 200µm (red circles) from the border of the NS.

Supplementary figure 4. **Gli4 cells infiltrate non-aligned nanofibers.** Image showing Gli4 cells migrating inside the NF network (scale bar = 10 μ m). Cell nuclei were stained with Hoechst 33342. The NFs are autofluorescent in green.

Supplementary figure 5. **Transcriptomic analysis of Gli4 and GliT cells.** Heatmap showing a different gene expression profile between Gli4 and GliT cells in proliferation non-adherent conditions (NS = neurosphere). 1049 genes have different expression level between Gli4 and GliT (> 2 fold change). Red color bands indicate the upregulation of expression and green color the downregulation. Selected genes are marked by a star. Data are representative of two independent experiments.

Figure 1

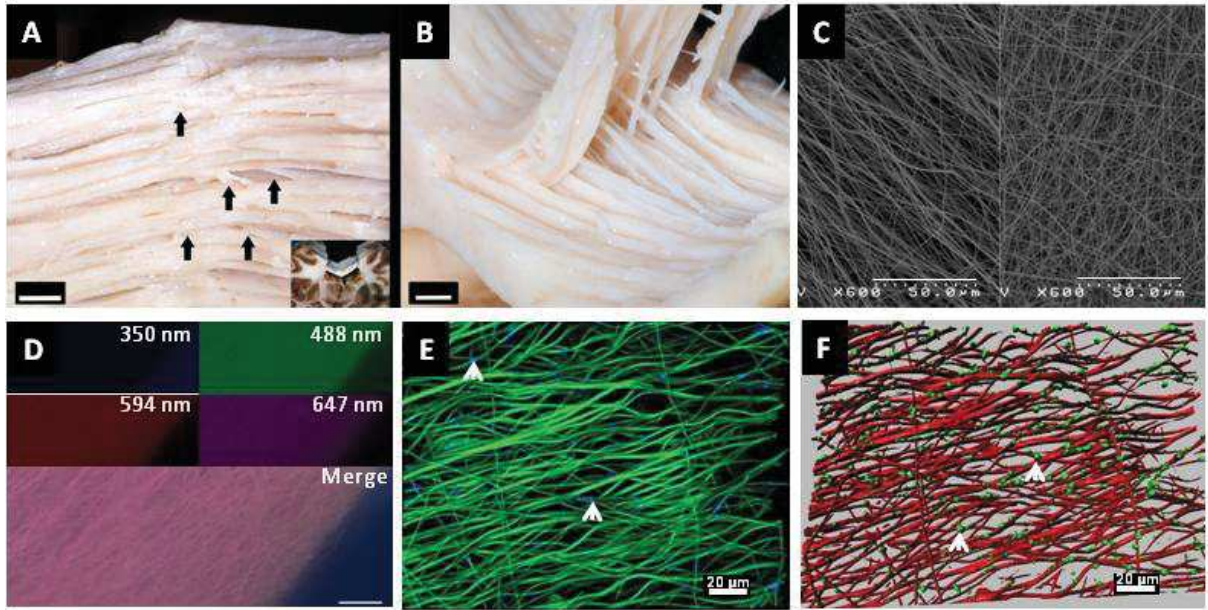


Figure 2

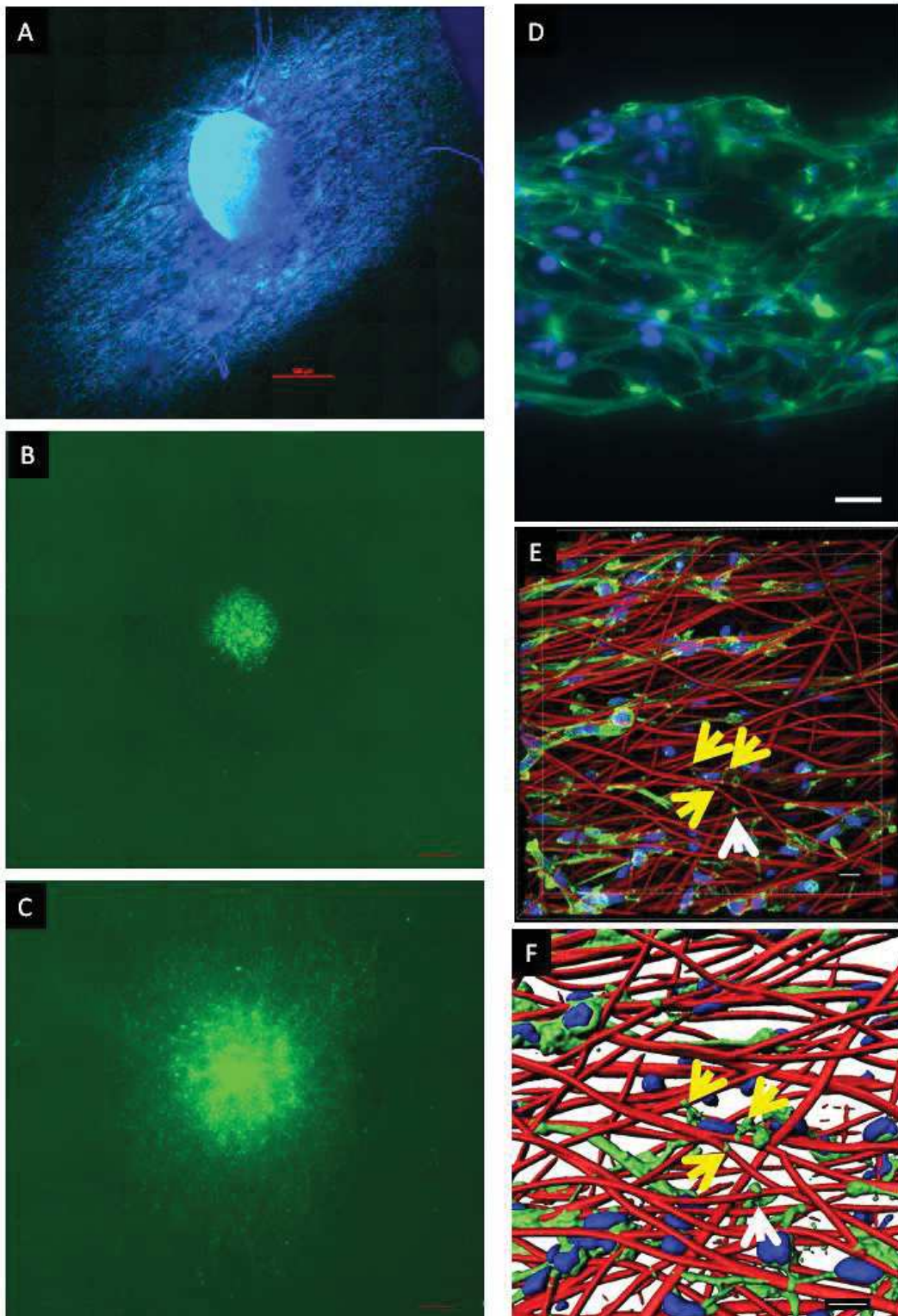


Figure 3

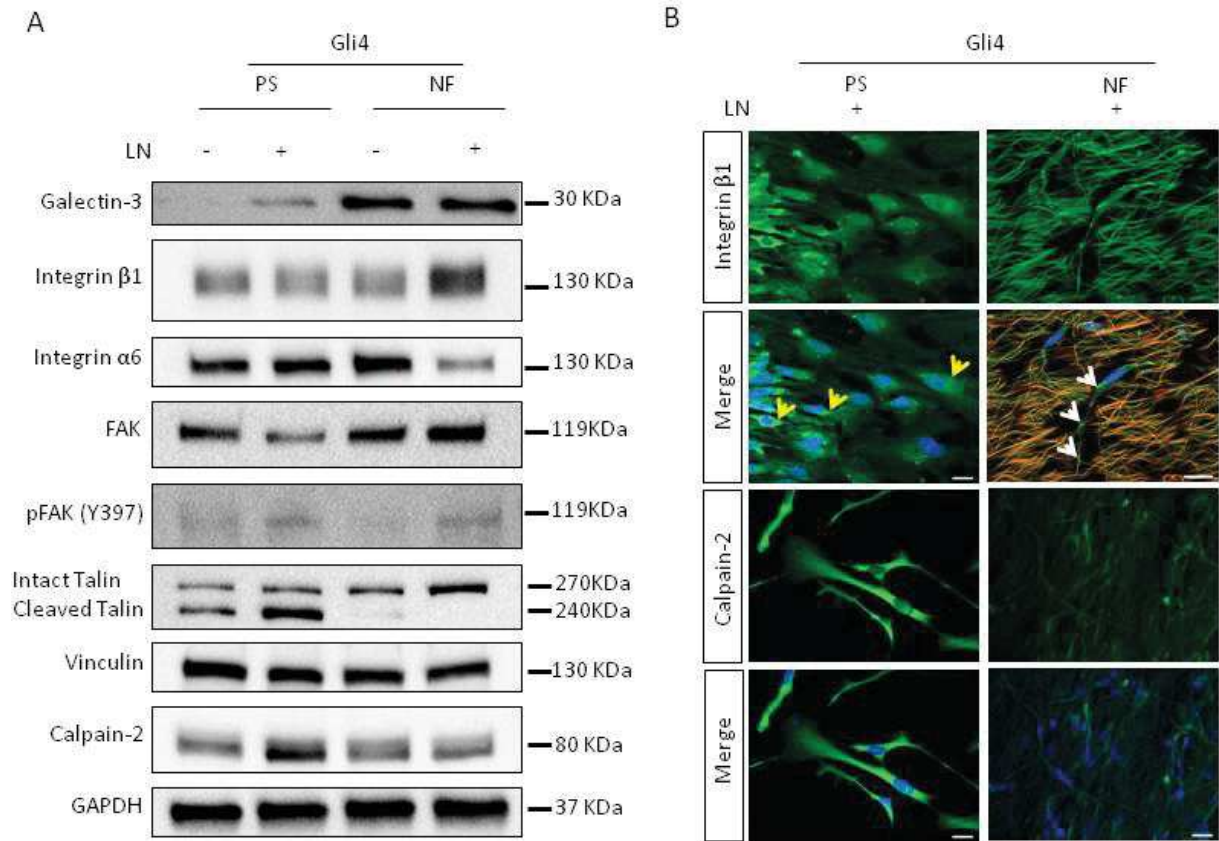


Figure 4

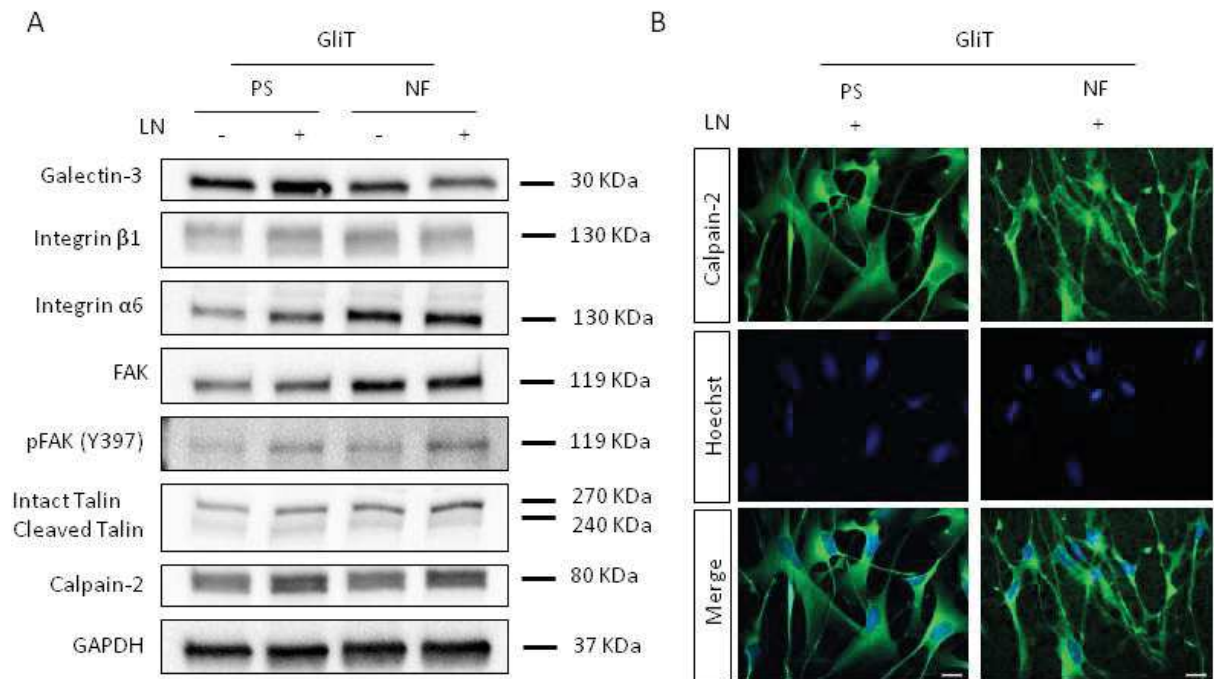


Figure 5

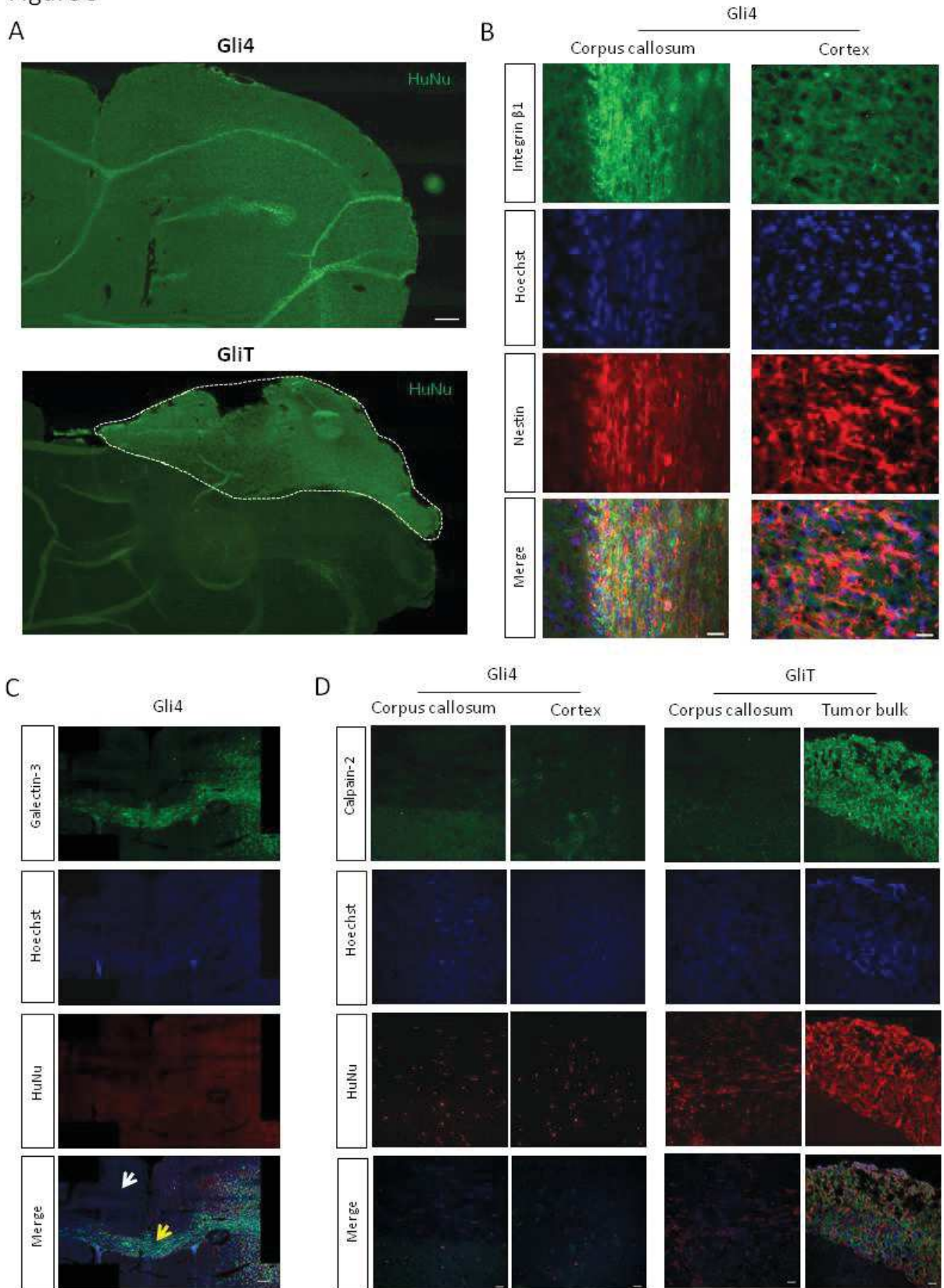


Figure 6

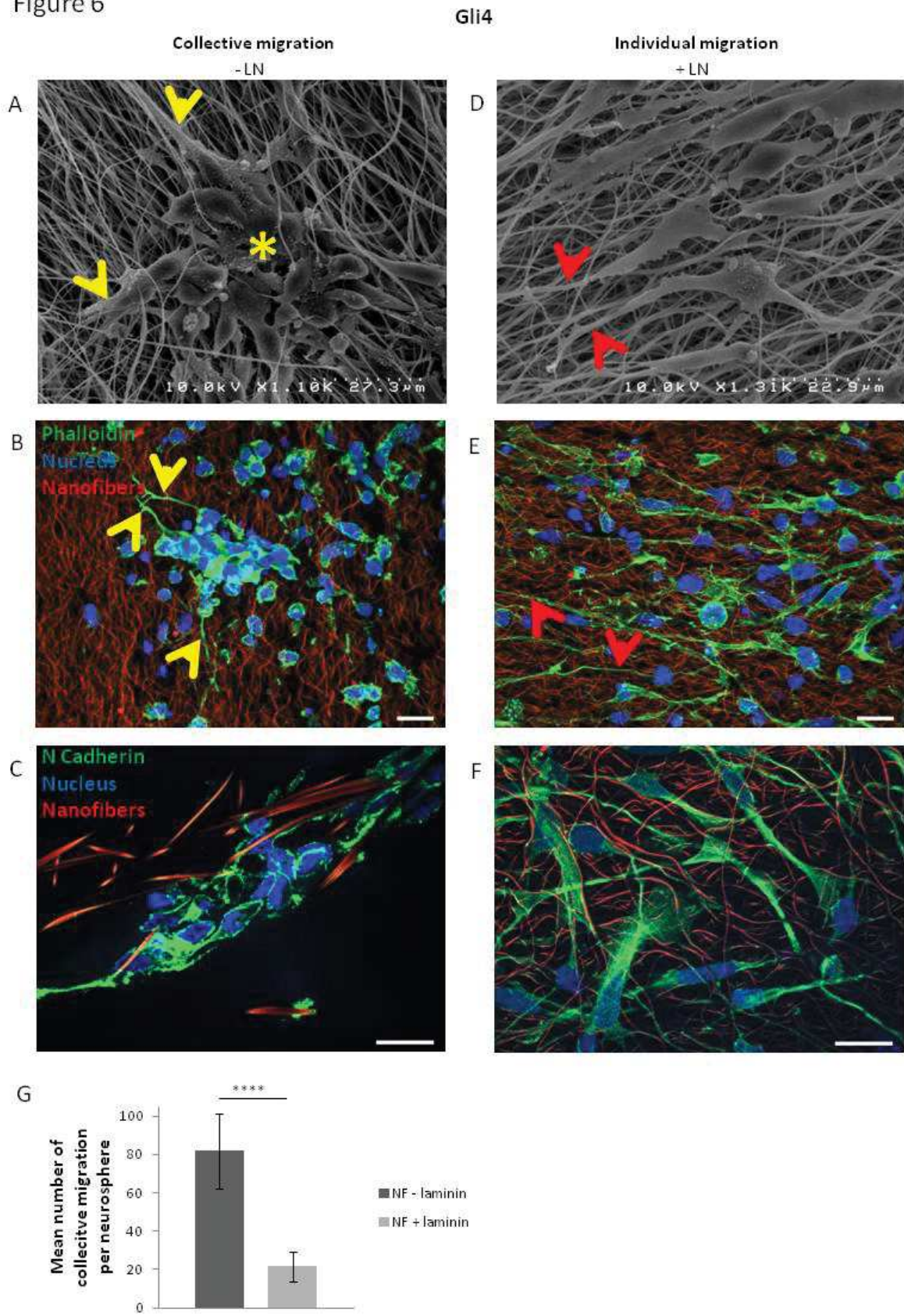
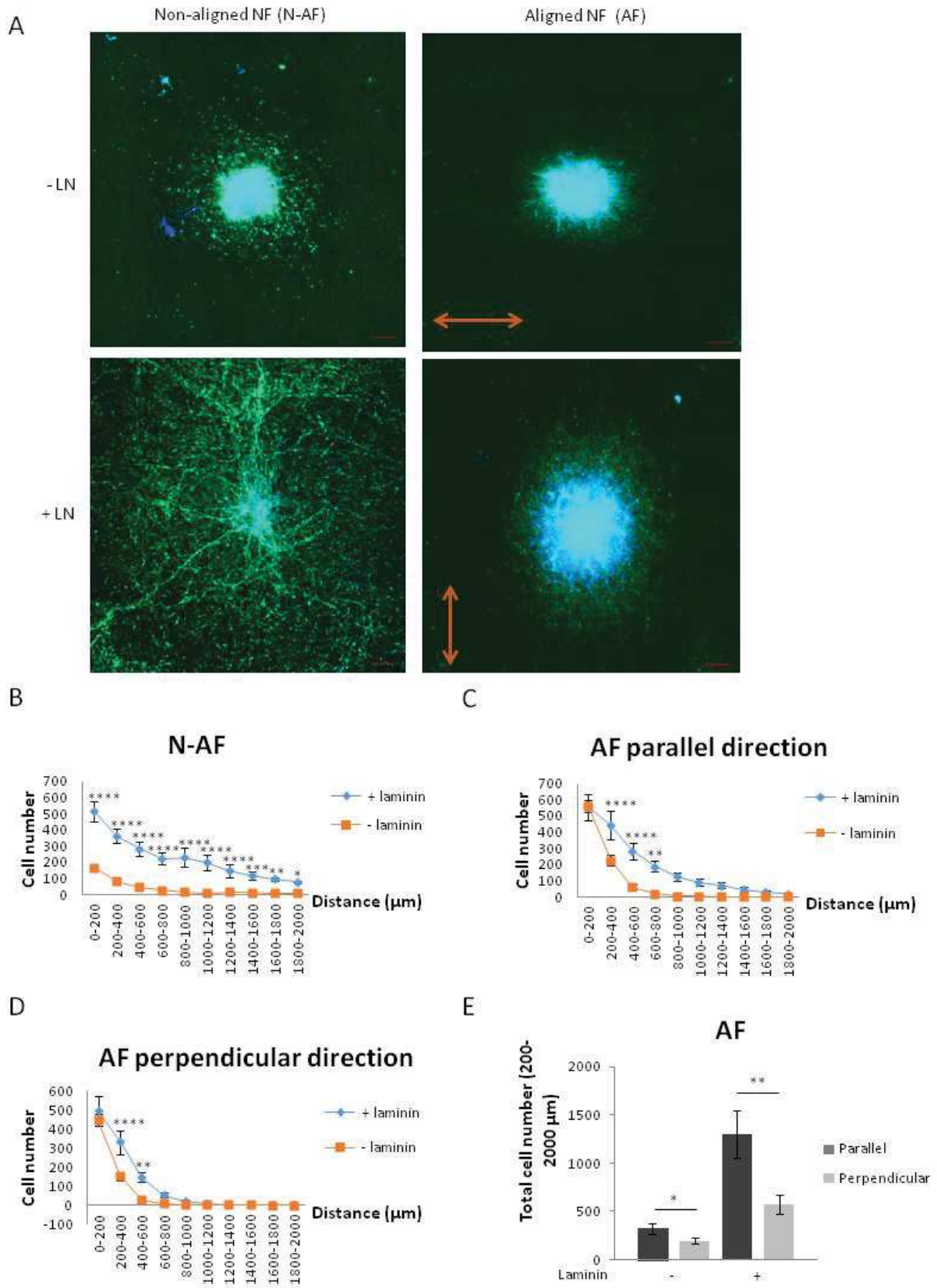
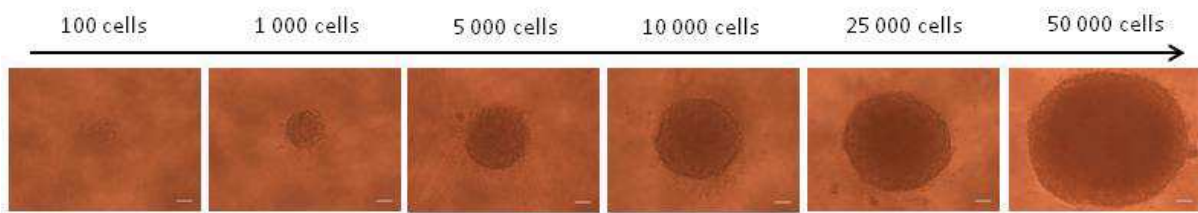


Figure 7

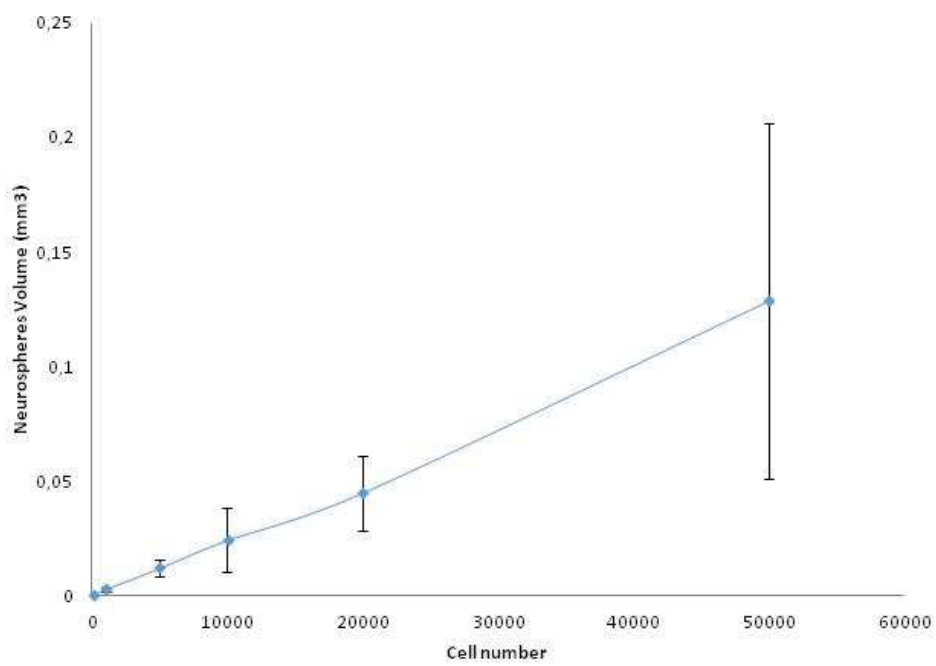


Supplementary figure 1

A

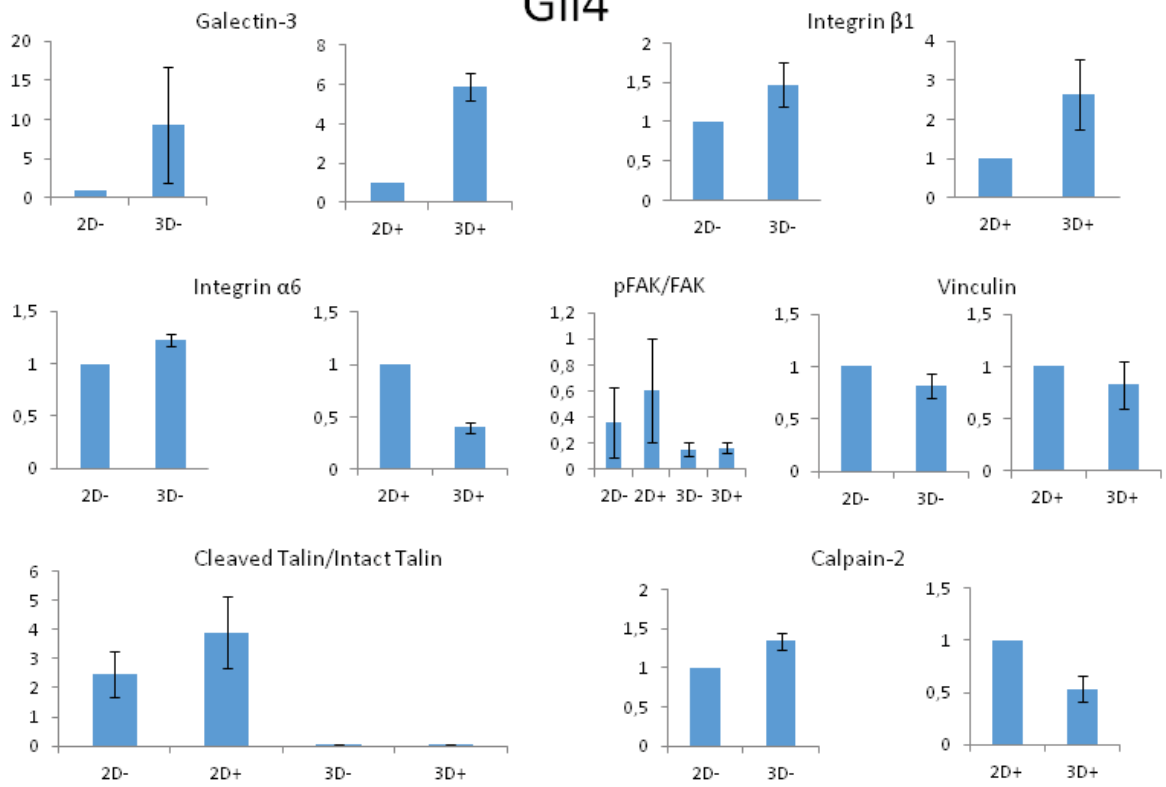


B

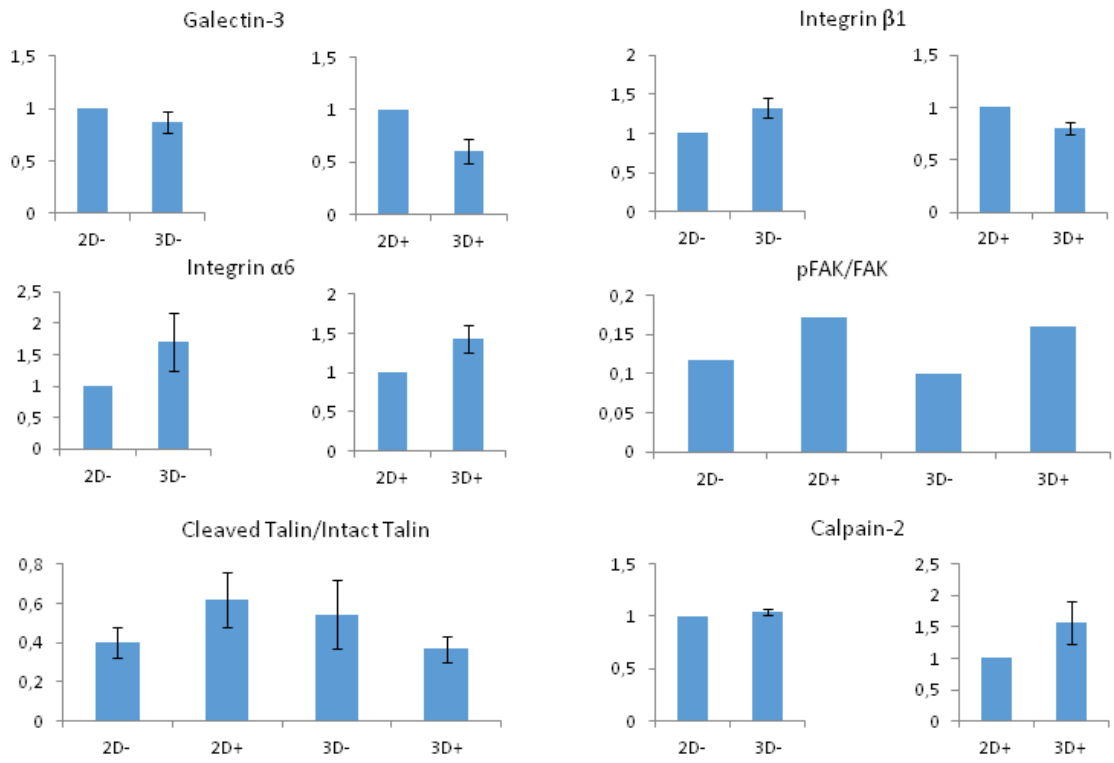


Supplementary figure 2

Gli4

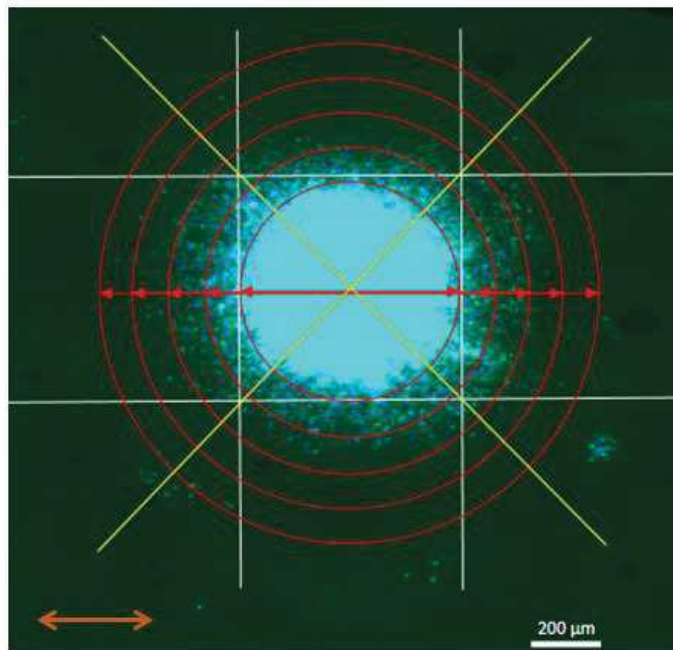


GliT

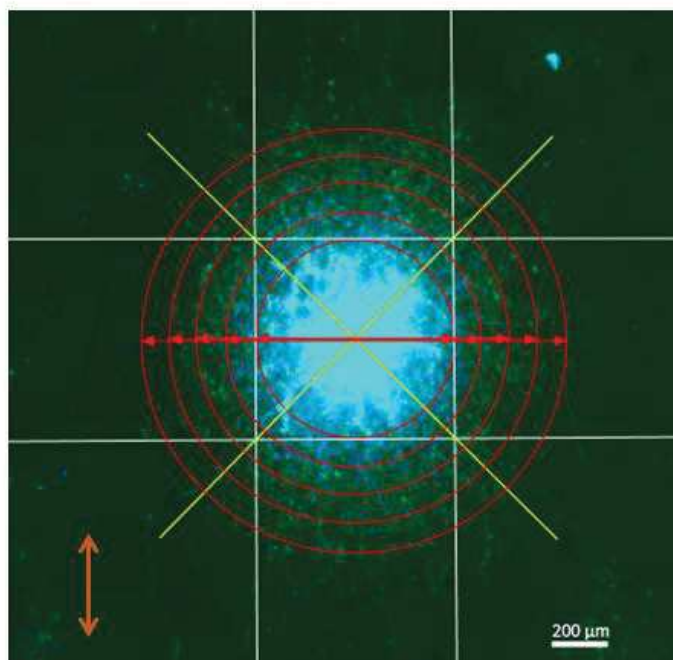


Supplementary figure 3

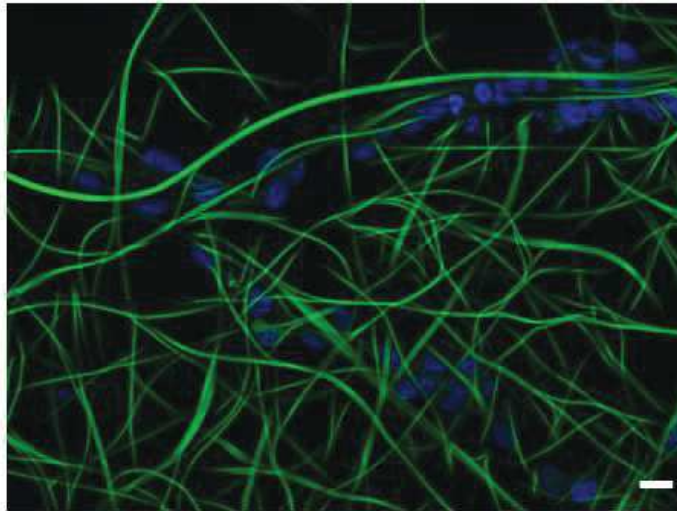
A



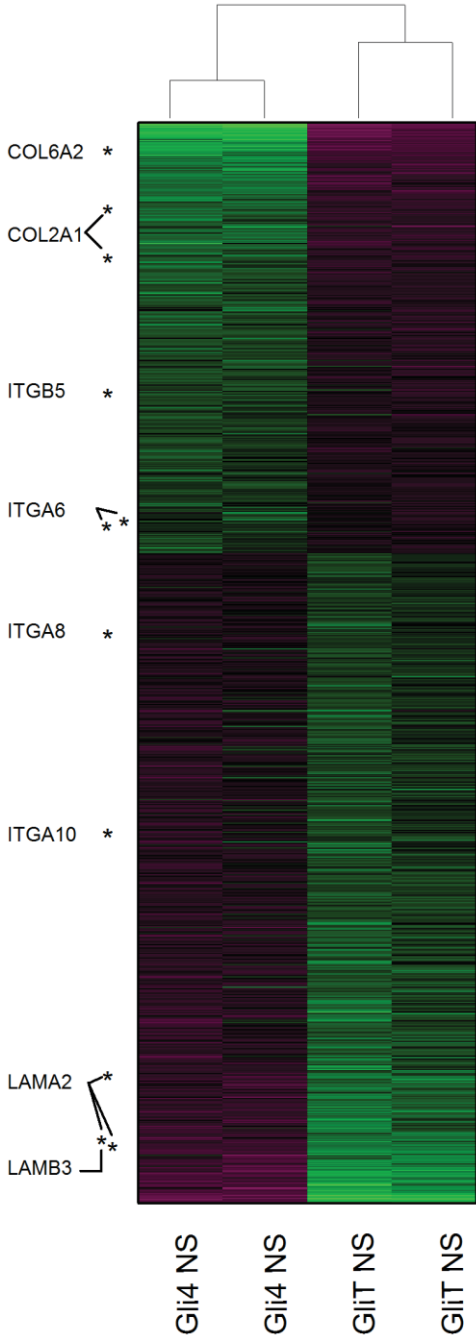
B



Supplementary figure 4



Supplementary Figure 5



Discussion et perspectives

La diffusion des gliomes à l'intérieur du tissu cérébral sain est comparable à une guérilla. Cette métaphore étonnante a été utilisée pour la première fois par Claes. *et al* dans leur revue décrivant le comportement invasif des cellules tumorales du cerveau (Claes et al., 2007). Ainsi, comme des combattants de guérilla, les cellules de gliomes se déplacent individuellement ou en petits groupes dans des territoires étrangers en profitant des structures préexistantes telles que les trajets fibreux et myélinisés de la matière blanche ou la membrane basale des vaisseaux sanguins. De même, la visualisation du front infiltratif des gliomes avec les techniques actuelles d'imagerie à résonance magnétique n'est pas nette. Par ailleurs, ces cellules ont tendance à se mélanger avec les autres composants et cellules du microenvironnement cérébral ce qui rend toute attaque impossible sans dommage collatéral.

Dans ces conditions, la meilleure stratégie est de limiter l'avancement des guériers et de les attaquer quand ils sont encore rassemblés. La même stratégie est valable pour les cellules de glioblastome. Cependant, comme dans les exercices militaires, pour comprendre la migration des cellules tumorales, il faut travailler dans des conditions qui miment parfaitement leur environnement naturel.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de thèse. L'objectif principal a été de mettre en œuvre un système qui récapitule les conditions physiques et biochimiques de la matrice extracellulaire du cerveau et d'étudier leur rôle dans la régulation de la migration des glioblastomes. Notre étude est à la fois fondamentale quand elle vise à élucider les mécanismes qui gouvernent la migration des glioblastomes, mais se positionne aussi parfaitement dans une perspective plus appliquée à intérêt thérapeutique. Cet intérêt occupe une place majeure dans la réflexion de notre équipe. Le but étant de développer une nouvelle molécule anti-migratrice ciblant les glioblastomes et de l'examiner dans des conditions physiologiques pertinentes.

Ainsi, nous recherchons à évaluer la validité biomimétique de notre nouvelle matrice synthétique de nanofibres (NF). Pour ce faire, nous avons utilisé la lignée primaire Gli4 de cellules souches de glioblastomes. Cette lignée a été isolée à partir d'un patient humain et a été caractérisée préalablement. Elle exprime les principaux marqueurs de cellules souches neuronales tels que CD133, nestin et Sox2 (Guichet

et al., 2013). De plus, cette lignée est fortement migratrice en 2D et invasive à l'intérieur du cerveau des souris xénotransplantées (Hassani. Z et al, accepted Molecular Cancer research). Nos premiers résultats montrent que les nanofibres de XPX créent un environnement permissif pour la migration des cellules souches de glioblastome (Publi 2. Fig. 2). En effet, ces cellules adhèrent et s'attachent aux NF, forment des structures migratrices telles que des pseudopodes ou des filopodes et migrent loin de la neurosphère (Publi 2. Fig. 2). Elles ne se cantonnent pas à l'intérieur de la neurosphère, mais envahissent la matrice et se déplacent sur plusieurs millimètres durant la période de culture (Publi 2. Fig. 2).

Au cours de leur migration sur les NF XPX, les cellules souches de glioblastome perçoivent-elles leur environnement de la même manière que lorsqu'elles migrent sur un support planaire (SP) classique ? En d'autres termes, les composantes de la MEC, sont-elles similaires entre les NF XPX et les supports bidimensionnels ? Ces caractéristiques de la MEC des NF, ressemblent-elles à celles de la matrice naturelle du cerveau ? Ce sont les premières questions que nous avons posées au début de l'élaboration de notre projet.

Premièrement, la topologie des NF est radicalement différente de celle des supports plans. D'un côté, l'aspect est fibreux (Publi 2. Fig. 1), alors que de l'autre, il est plat. Cette topologie fibreuse récapitule fidèlement la MEC cérébrale expérimentée par les cellules de glioblastome au cours de leur migration et qui est constituée de fibres myélinisées (Publi 2. Fig. 1), de prolongements axoniques et dendritiques ainsi que de trajets dessinés le long des vaisseaux sanguins. De même, le diamètre moyen des NF est comparable à celui des axones du corps calleux ou de la région du fascicule supérieur longitudinal ou occipitofrontal (Liewald et al., 2014), et a une valeur approximative de $0.5 \mu\text{m}$ (Publi 2. Fig. 1). Néanmoins, le calibre des fibres du cerveau humain est hétérogène. Certaines fibres ont un diamètre de l'ordre du sous-micromètre alors que pour d'autres, il atteint une dizaine de micromètres et devient équivalent à celui d'une cellule de glioblastome (Liewald et al., 2014). Cette hétérogénéité n'est pas aussi importante sur les NF où les diamètres ne dépassent pas le micromètre. D'un côté, ceci permet aux cellules tumorales Gli4 de s'enrouler sur les NF et de s'engager avec la MEC aussi bien du côté basal que dorsal ou latéral (Publi 2. Fig. 2), comme c'est le cas dans les conditions naturelles. Au contraire, les contacts cellule-MEC sont asymétriquement répartis sur une matrice en

deux dimensions et ne concernent que le coté basal de la cellule. Néanmoins, une partie de l'information est nécessairement perdue sur les NF, puisque des contacts asymétriques avec la MEC, localisés d'un seul coté cellulaire pourraient exister *in vivo* le long des vaisseaux sanguins larges ou des fibres épaisses. Afin de mettre l'accent sur ce type d'interaction, l'utilisation de microfibres XPX plus épaisses pourra être envisagée. Par exemple, dans leur étude, Herrera-Perez *et al* ont étudié la migration des glioblastomes sur des microfibres de PDS II- polydioxanone ayant un diamètre allant de 100 à 150 μm (Herrera-Perez et al., 2015). Le mode migratoire adopté par les cellules de glioblastomes ainsi que leur vitesse de migration seront comparés entre les nanofibres et les microfibres.

De plus, la topologie des NF XPX est décrite par leur agencement. Ces NF sont alignées ou enchevêtrées (Publi 2. Fig. 1). Au niveau technique, l'alignement des fibres est déterminé par la vitesse de rotation du cylindre collecteur au cours de l'électrospinning (Publi 2. Matériels et Méthodes). Les fibres enchevêtrées sont obtenues à vitesse faible sur un cylindre dit « plan » alors que l'obtention de fibres alignées demande une vitesse supérieure sur un cylindre « rotatif ». A titre comparatif, les fibres myélinisées de la matière blanche du corps calleux sont parfaitement alignées (Fig. 23) (Bellail et al., 2004). Les cellules de glioblastome s'infiltrèrent entre ces fibres au cours de leur migration à l'intérieur du corps calleux du cerveau humain (Fig. 23).

Une autre caractéristique de l'environnement péritumoral généré par les NF XPX est la présence des pores ou espacements permettant aux cellules de pénétrer à l'intérieur du réseau et de ne pas rester seulement en surface (Publi 2. Fig. 2). Cette infiltration donne lieu à des interactions cellule-cellule et cellule-MEC également réparties sur la surface cellulaire et non restreintes à un seul coté comme dans les cultures planaires. Nos résultats montrent que les espacements entre les NF varient entre 0.1 et 10 μm^2 (Marhuenda. E *et al*, communication personnelle). Or, des données récentes ont affirmé que le diamètre des pores de la MEC du cerveau est compris entre 38 et 64 nm (Thorne and Nicholson, 2006). La production de NF ayant des pores de diamètre physiologique reste toujours limitante. Pourtant, la pénétration des cellules de glioblastome Gli4 à travers les espacements entre les fibres XPX n'est pas complètement permissive et met en jeu des mécanismes similaires à ceux utilisés *in vivo*. Parmi les scénarios envisagés, un rôle prépondérant pourrait être

attribué à la myosine II, qui génère des forces de contraction permettant au noyau et au corps cellulaire de s'insinuer dans les espaces étroits entre les fibres. Cette hypothèse mérite une investigation plus approfondie sur les NF XPX. De même, parmi les travaux envisagés, une partie est consacrée à la variation de la taille des pores et à sa diminution afin de se rapprocher des conditions physiologiques. Techniquement, ceci pourrait être atteint par diverses voies, dont l'une serait de diminuer la vitesse de rotation du collecteur afin d'obtenir un tissu plus dense. Dans ce contexte, l'un des objectifs sera de déterminer la taille limite à partir de laquelle les cellules de glioblastome ne pourront plus pénétrer à l'intérieur du réseau. De plus, ceci permettra d'examiner les effets de la variation de la taille des pores sur le mode migratoire des cellules et de mettre en évidence les différents mécanismes moléculaires mis en jeu.

Egalement, la rigidité de la MEC est déterminante au cours de la progression des glioblastomes. La signalisation intracellulaire induite suite à l'altération de la rigidité de la MEC est corrélée à la migration et à l'invasion de ses tumeurs (Wong and Kumar, 2014). Nos résultats montrent que la rigidité des fibres XPX est de 200 Pa (Marhuenda. E *et al*, publication en cours). D'un autre côté, la rigidité de la MEC du cerveau sain est comprise entre 0.5 et 1 KPa (Akhmanova et al., 2015). Mais, celle des cultures 2D en plastique ou en verre est beaucoup moins physiologique et est de l'ordre de 100 KPa (Rao et al., 2014). La rigidité de l'environnement tumoral naturel est donc mieux récapitulée sur les NF XPX que sur les supports 2D. Mais, elle reste encore plus faible que celle du parenchyme cérébral normal. Des données cliniques indiquent par ailleurs que les tumeurs de glioblastome créent un espace plus rigide que le tissu sain environnant (Ulrich et al., 2009). Ainsi, nous cherchons actuellement à augmenter la rigidité des NF. Des travaux actuels d'examination et de quantification de ces modifications sont en progression au laboratoire. Cette étude permettra d'étudier le phénotype migratoire des cellules de glioblastome dans un environnement plus rigide.

En somme, les propriétés physiques de la MEC des NF XPX sont différentes des matrices bidimensionnelles classiques. Ces propriétés récapitulent mieux les conditions naturelles dans lesquelles les glioblastomes croissent et migrent. Néanmoins, certains aspects restent encore limitants et méritent une investigation plus approfondie.

Dans l'étape suivante, nous avons comparé les mécanismes moléculaires impliqués dans l'adhésion et la migration des cellules souches de glioblastome Gli4 entre la matrice de NF et la culture 2D traditionnelle. Nous avons choisi de travailler sur des NF alignées mimant les fibres du corps calleux. Aussi, nous avons fonctionnalisé les matrices 2D et 3D avec de la laminine afin de mimer la composition biochimique de l'espace périvasculaire et de la membrane basale des vaisseaux sanguins du cerveau (Publi 2. Fig. 1). Mais aussi, l'ajout de la laminine favorise l'adhésion des cellules à la matrice et active une batterie de récepteurs et différentes voies de signalisation sous-jacentes. La laminine utilisée est l'isoforme 511 issue de la MEC de sarcome de souris. En comparaison, la membrane basale vasculaire du cerveau contient les chaînes de laminine $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ et $\gamma 1$ (Jucker et al., 1996). L'usage principal de la laminine 511 par rapport aux autres isoformes est expliqué par sa facilité d'extraction et son abondance. De plus, la laminine 511 est sécrétée par les glioblastomes et promeut leur migration (Kawataki et al., 2007). Nous avons analysé la signalisation induite suite à l'adhésion des cellules aux fibres natives en absence de laminine. Ceci nous a permis de tester les effets de la chimie de surface des NF sur l'adhésion cellulaire.

Nos résultats ont démontré une augmentation significative de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ sur les NF fonctionnalisées en comparaison avec la culture 2D (Publi 2. Fig. 3 et Supp. Fig. 2). L'intégrine $\beta 1$ est localisée au niveau membranaire et permet l'interaction des cellules souches de glioblastome avec la MEC sur les NF, tandis qu'elle est cytoplasmique sur les surfaces planes (Publi 2. Fig. 3). De même, la galectine-3 est surexprimée sur les NF (Publi 2. Fig. 3 et Supp. Fig. 2). Or, l'intégrine $\beta 1$ joue un rôle clé dans l'adhésion cellule-MEC et la transduction des signaux extracellulaires gouvernant la prolifération, la migration, la survie et l'invasion (Hynes, 2002). La galectine-3 module également l'interaction cellule-MEC (Hughes, 2001) et facilite l'association des intégrines avec les macromolécules extracellulaires (Friedrichs et al., 2008). Les cellules souches de glioblastome semblent donc mieux adhérer à la MEC *via* l'intégrine $\beta 1$ et la galectine-3 sur les NF que sur le support classique en 2D.

D'un autre côté, la nature de la glycosylation impacte l'expression des galectines. Nous avons démontré que l'inhibition de la MGAT5 diminue le niveau d'expression

de la galectine-3 dans les cellules Gli4 en migration sur une SP 2D fonctionnalisée avec la laminine (Publi 1). Ainsi, la différence de niveau d'expression de la galectine-3 entre la matrice 2D et les NF pourrait être associée à une différence dans l'expression et l'activité de l'enzyme MGAT5. Le rôle de la glycosylation des protéines de surface cellulaire sur l'interaction des cellules avec la MEC est bien référencé (Hughes, 2001). Pourtant, l'effet de la MEC sur le glycome reste encore largement inconnu. L'examen de l'expression et de l'activité de l'enzyme MGAT5 ainsi que d'autres enzymes impliquées dans la glycosylation telle que la MGAT3 sur les deux supports est nécessaire. De plus, l'utilisation d'une lignée cellulaire de glioblastome déficiente en MGAT5 (ou MGAT5^{-/-}) et la comparaison de son adhésion et migration en 2D ou sur les NF, nous permettra de valider notre hypothèse. En effet, ceci pourrait ressembler à un cycle de rétrocontrôle dans lequel l'interaction avec la MEC induirait l'activité des enzymes de glycosylation, qui à leur tour modifieraient les protéines de surface cellulaire et stimuleraient l'expression des galectines. La fixation des galectines sur ces motifs glycosylés renforcerait l'adhésion cellule-MEC.

Nous avons montré par ailleurs que l'expression de l'intégrine $\alpha 6$ diminuait sur les NF fonctionnalisées par rapport à la culture planaire (Publi 2. Fig. 3 et Supp. Fig. 2). Or, la sous-unité $\beta 1$ forme un dimère avec la sous-unité $\alpha 6$ et le récepteur $\alpha 6\beta 1$ reconnaît la laminine 511 (Belkin and Stepp, 2000; Pouliot and Kusuma, 2013). Ce résultat est donc contradictoire avec l'augmentation de l'expression de la sous-unité $\beta 1$. Cependant, d'autres dimères contenant la sous-unité $\beta 1$ sont spécifiques à la laminine tels que $\alpha 7\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ (Belkin and Stepp, 2000). L'intégrine $\alpha 7\beta 1$ est plus répertoriée dans les muscles alors que l'expression de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ est plus liée à la migration et à l'invasion des glioblastomes (Kawataki et al., 2007). De plus, cette dernière reconnaît l'isoforme 511 de la laminine (Pouliot and Kusuma, 2013). Ainsi, l'augmentation de l'expression de la sous-unité $\beta 1$ pourrait être accompagnée par une surexpression de la sous-unité $\alpha 3$ sur les NF.

D'un autre côté, l'intégrine $\alpha 6$ a été nouvellement identifiée comme étant un nouveau marqueur d'enrichissement des cellules souches de glioblastome (Lathia et al., 2010). La diminution de son expression sur les NF XPX est accompagnée par un abaissement des expressions de la nestine et d'olig2, deux autres marqueurs établis

de cellules initiatrices des glioblastomes (Data not shown). En même temps, les signaux générés par la MEC sur les matrices tridimensionnelles sont mieux intégrés par les cellules que sur des matrices bidimensionnelles et modulent donc plus efficacement certaines fonctions biologiques comme la différenciation. Par exemple, l'environnement 3D favorise la différenciation adipogénique des cellules souches mésenchymateuses d'une manière plus prononcée que l'environnement 2D (Jung et al., 2016). De même, la différenciation neuronale et gliale des cellules souches embryonnaires est mieux stimulée sur les matrices 3D que 2D (Kothapalli and Kamm, 2013). Ainsi, la perte de ces marqueurs par les cellules souches de glioblastome sur les NF XPX serait associée à un engagement dans la différenciation. Cette différenciation pourrait être liée au phénotype migratoire et invasif observée sur les NF, comme cela a été observé par Ortensi *et al* (Ortensi et al., 2013).

Après avoir démontré l'amélioration de l'adhésion des cellules souches de glioblastome à la MEC sur les NF par rapport au 2D, nous avons testé l'activation de la kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) qui est induite à la suite de l'interaction cellule-MEC. Nos résultats montrent un rapport de phosphorylation de la tyrosine 397 de FAK semblable entre les matrices 2D et 3D fonctionnalisées avec la laminine (Publi 2. Supp. Fig. 2). L'autophosphorylation sur la tyrosine 397 survient après la modification conformationnelle de FAK induite par les intégrines et permet son exposition à d'autres kinases telles que celles de la famille Src résultant en l'activation de différentes voies de signalisation sous-jacentes (Zhao and Guan, 2011). Or, la phosphorylation de la tyrosine 397 n'est pas la seule à être stimulée suite à l'activation des intégrines membranaires. Par exemple, la phosphorylation des tyrosines 407, 576 et 577 dépend aussi de l'adhésion à la MEC et joue un rôle dans la signalisation liée aux kinases Src (Calalb et al., 1995). Donc, malgré l'indifférence du niveau de phosphorylation de la tyrosine 397, d'autres modifications de la protéine FAK résulteraient de l'adhésion des cellules aux fibres XPX.

Nous avons également évalué les mécanismes moléculaires de l'adhésion et de la migration des cellules Gli4 sur les NF et le support 2D non fonctionnalisés avec la laminine. Sur les NF, l'expression de l'intégrine $\beta 1$ diminue en absence de la laminine (Publi 2. Fig. 3 et Supp. Fig. 2). Conjointement, la phosphorylation de FAK sur la tyrosine 397 s'affaiblit aussi (Publi 2. Fig. 3 et Supp. Fig. 2). Par contre, l'expression de la sous-unité $\beta 1$ n'est pas liée à la présence de la laminine en 2D

(Publi 2. Fig. 3 et Supp. Fig. 2), pourtant la phosphorylation de FAK diminue en son absence (Publi 2. Fig. 3 et Supp. Fig. 2). En somme, ces résultats démontrent que l'absence de la laminine sur les NF provoque une diminution de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ ce qui induirait un affaiblissement de l'adhésion à la MEC. D'autres intégrines ou récepteurs membranaires pourraient médier l'interaction des cellules avec les fibres natives. Ce résultat ne démontre donc pas de façon certaine une diminution de l'adhésion aux fibres en absence de laminine puisque les cellules continuent à migrer et s'attacher à la MEC. L'examen de l'expression d'autres récepteurs est nécessaire pour valider cette hypothèse.

La diminution de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ observée seulement sur les NF et non en 2D en absence de laminine montre que la signalisation transduite dans les cellules Gli4 à la suite de l'interaction avec la laminine est plus importante sur les NF XPX que sur le support 2D. Cette observation pourrait être liée à une présentation différentielle des épitopes de laminine aux cellules par les NF et le SP (Silva et al., 2004). En effet, l'arrangement des épitopes, leur organisation, densité et espacements sont différents entre des matrices 2D et 3D (Akhmanova et al., 2015). L'ensemble de ces caractéristiques affecte l'activation du récepteur par son ligand.

D'un autre côté, l'adhésion à la MEC est primordiale pour l'intégration des signaux externes induisant la migration cellulaire. Cette adhésion est assurée par une batterie de protéines membranaires et intra-cytoplasmiques constituant les plaques d'adhésion focale. Parmi ces protéines, taline et vinculine assurent la consolidation du lien physique entre les intégrines et le cytosquelette d'actine. Cette connexion permet la transmission des forces de contraction de l'acto-myosine vers la MEC et inversement la mécanotransduction des signaux externes de la MEC à l'intérieur de la cellule. La dynamique d'attachement et de détachement des adhésions focales à la MEC joue un rôle important durant la migration. Elle permet la prolongation des extensions membranaires et la rétraction de l'arrière cellulaire. Toutefois, plusieurs études ont démontré que cette dynamique est régulée différemment dans des environnements 2D ou 3D. Sur des supports 2D, les plaques d'adhésion focale sont continuellement régénérées permettant l'augmentation de la vitesse de migration (Fraleigh et al., 2010; Mierke et al., 2010; Zhong et al., 2012). Ceci est dû à un clivage permanent des composants des adhésions focales dont taline par la protéase calpaïne-2 (Franco et al., 2004). Au contraire, dans un environnement 3D, cette

régénération est retardée et le lien entre le cytosquelette d'actine et les intégrines est maintenu. Ceci permet à la cellule d'exercer une force de traction nécessaire pour sa pénétration dans les pores étroits de la MEC (Fraley et al., 2010).

Puisque l'adhésion des cellules Gli4 est renforcée sur les fibres XPX par rapport au modèle 2D en présence de la laminine et étant donné que ces cellules sont imprégnées dans un environnement tridimensionnel sur les fibres, nous avons décidé de tester la dynamique des composants des points d'adhésion focale sur notre nouveau support afin d'élucider le mécanisme migratoire mis en jeu. Nos résultats montrent l'absence du clivage de la taline 1/2 sur les NF fonctionnalisées accompagnée par une diminution de l'expression de calpaïne-2 (Publi 2. Fig. 3 et Supp. Fig. 2). Au contraire, la taline 1/2 est clivée sur le SP fonctionnalisé et la calpaïne-2 est fortement exprimée (Publi 2. Fig. 3 et Supp. Fig. 2). Le niveau de l'expression de vinculine ne change pas (Publi 2. Fig. 3 et Supp. Fig. 2). Ainsi nous concluons que les mécanismes d'adhésion à la MEC sont différents entre les NF et le support 2D. Sur les NF XPX, les cellules Gli4 maintiennent des adhésions plus durables leur permettant d'exercer des forces de traction afin de s'insinuer entre les mailles du réseau. L'absence de la calpaïne-2 est nécessaire pour ce mouvement dans un environnement tridimensionnel. L'évaluation de la migration des cellules Gli4 sur les NF XPX après l'induction de la surexpression de la calpaïne-2 permettra de valider notre hypothèse. De même, l'observation du niveau d'expression de l'inhibiteur endogène des calpaïnes, la calpastatine (Todd et al., 2003) à l'intérieur de ces cellules est nécessaire. Egalement, la localisation et l'origine des forces de traction restent encore à découvrir. Fraley. *SI et al* ont détecté ces forces au niveau des pseudopodes de cellules de fibrosarcome (Fraley et al., 2010). Beadle. *C et al* ont démontré que le passage des cellules de glioblastome dans les espacements étroits de la MEC du cerveau dépend de la contraction médiée par la myosine II (Beadle et al., 2008). Ces mécanismes pourraient être impliqués dans le mouvement des cellules Gli4 à l'intérieur du réseau des fibres XPX. Au contraire, dans la condition 2D en présence de laminine, les cellules Gli4 ont une dynamique de renouvellement des adhésions focales plus rapide leur permettant d'avancer dans un environnement dépourvu d'obstacles.

En absence de laminine, l'expression de la calpaïne-2 n'est pas différente entre les NF et le support 2D (Publi 2. Fig. 3 et Supp. Fig. 2). Ce résultat est en continuité avec l'hypothèse de la diminution de l'interaction avec la MEC sur les fibres natives.

En somme, l'ensemble de ces résultats montre que les mécanismes d'adhésion à la MEC et de migration des cellules souches de glioblastome sont complètement différents entre les NF et le SP traditionnel. Les cellules Gli4 adhèrent mieux aux NF fonctionnalisées et ont une dynamique de migration caractéristique des environnements tridimensionnels.

Nous avons ensuite comparé ces résultats avec le modèle de xélogreffe orthotopique de cellules humaines chez des souris immunodéprimées. Ce modèle récapitule au mieux la complexité de l'environnement cérébral humain et sert de référence pour évaluer la pertinence des mécanismes observés sur les NF. Ainsi, nous avons démontré que les cellules Gli4 expriment exclusivement l'intégrine $\beta 1$ et la galectine-3 à l'intérieur du corps calleux des souris (Publi 2. Fig. 5). Ces deux marqueurs sont absents dans les cellules Gli4 envahissant le cortex ou le striatum (Publi 2. Fig. 5). Ces observations sont donc en concordance avec les augmentations d'expression de l'intégrine $\beta 1$ et de la galectine-3 observées *in vitro* sur les NF fonctionnalisées avec la laminine (Publi 2. Fig. 3). Bien sûr, la laminine exprimée au niveau du corps calleux se localise principalement autour des vaisseaux sanguins (Espitia Pinzon et al., 2017). Néanmoins, des souris déficiente pour la laminine $\gamma 1$ présentent au niveau du corps calleux des axones myélinisés anormalement branchés (Chen et al., 2009). Ces mutants montrent également une migration neuronale anormale et un dérèglement de la signalisation liée aux intégrines (Yoshimura et al., 2005). De manière plus générale il est suggéré que la laminine régule la génèse ordonnée des cellules souches neurales (Relucio et al., 2012). Il n'est donc pas surprenant que les cellules souches de glioblastomes soient impactées dans leur migration par la présence de laminine. Par ailleurs il est à rappeler que ces mêmes cellules souches sécrètent de la laminine en grande quantité et nous pouvons suggérer qu'elles peuvent aussi impacter l'environnement pour favoriser la production de laminine (Kawataki et al., 2007).

De plus, l'alignement des NF rappelle celui des fibres myélinisées du corps calleux (Publi 2. Fig. 1). Par ailleurs, l'espace extracellulaire est plus volumineux et tortueux

au niveau du corps calleux que du cortex cérébral chez le rat (Nicholson and Sykova, 1998), et ressemble en ce sens à l'environnement stérique créé par les NF.

Au sein du cortex cérébral, les prolongements axoniques et les ramifications dendritiques génèrent des espaces très étroits remplis de matrice extracellulaire sans une topologie particulièrement alignée. Pour vérifier cette hypothèse, les niveaux d'expression de l'intégrine $\beta 1$ et de la galectine-3 par les cellules Gli4 doivent être testés sur des fibres enchevêtrées et comparés aux fibres alignées. En conclusion, l'expression de l'intégrine $\beta 1$ et de la galectine-3 par les cellules Gli4 xénogreffées varie en fonction des caractéristiques du microenvironnement *in vivo* et est mieux récapitulée par les NF fonctionnalisées que les cultures 2D *in vitro*.

De plus, l'étude de l'expression de la calpaïne-2 *in vivo* montre que les cellules Gli4 invasives n'expriment la calpaïne ni dans le corps calleux ni dans le cortex cérébral (Publi 2. Fig. 5). Ce résultat est aussi en accord avec les observations faites *in vitro* sur les NF XPX. Le rôle de la calpaïne-2 dans l'invasion des glioblastomes n'a pas été suffisamment étudié dans la littérature. Dans une première étude en 2010, Jang Sang. H et al ont démontré que la calpaïne-2 stimule la migration des glioblastomes *in vitro* en induisant la production de MMP2 (Jang et al., 2010). Plus tard, la même équipe a montré que la calpaïne-2 est nécessaire à l'invasion des glioblastomes dans des cultures organotypiques de souris et dans le cerveau de poisson zèbre *in vivo* (Lal et al., 2012). Cette apparente contradiction dans les résultats pourrait être liée aux différences entre les modèles utilisés et l'environnement dans lequel les cellules migrent. Mais est à il noter que la dépendance des cellules de glioblastome à la calpaïne-2 pour l'invasion a été étudiée seulement au voisinage des vaisseaux sanguins dans le cerveau du poisson zèbre (Lal et al., 2012). Cette région est remplie de liquide cébrospinal et ne présente pas d'obstacles à la migration cellulaire. L'inhibition de la calpaïne-2 dans des cellules envahissant le corps calleux ou le cortex cérébral n'aurait probablement pas le même effet. Dans notre étude, une évaluation plus précise de l'expression de la calpaïne-2 dans l'espace périvasculaire est nécessaire. De plus, d'autres calpaïnes pourraient être impliquées dans l'invasion des glioblastomes. Notamment, la calpaïne-1 qui est homologue à la calpaïne-2 et qui joue un rôle dans l'invasion en clivant certains composants des adhésions focales (Moretti et al., 2014). Finalement, l'examen de la capacité invasive des

cellules Gli4 xénotransplantées dans le cerveau de souris à la suite de l'induction de la surexpression de la calpaïne-2 validerait notre hypothèse.

A la suite des résultats observés chez la lignée Gli4 invasive, nous avons décidé de tester l'expression de la calpaïne-2 dans une autre lignée moins invasive *in vivo*. La lignée GliT est une lignée primaire issue de patient humain et a tendance à former une masse tumorale mieux délimitée que Gli4 *in vivo* et est moins invasive (Hassani. Z *et al*, papier accepté *Molecular Cancer Research*) (Publi 2. Fig. 5). Nos résultats montrent que les cellules GliT expriment la calpaïne-2 au sein de la masse tumorale (Publi 2. Fig. 5). Par contre, elles ne l'expriment plus quand elles envahissent le cortex et le corps calleux (Publi 2. Fig. 5).

A l'issue de ces résultats, nous avons décidé de comparer le niveau de l'expression de calpaïne-2 par les cellules GliT entre les NF et le SP. Nous n'avons pas observé de différences entre les deux supports fonctionnalisés ou pas avec la laminine (Publi 2. Fig. 4). De même, le clivage de taline ne varie pas (Publi 2. Fig. 4 et Supp. Fig. 2). Ces cellules expriment par ailleurs moins de galectine-3 sur les NF fonctionnalisées et la même quantité d'intégrine $\beta 1$ que sur le support 2D (Publi 2. Fig. 4 et Supp. Fig. 2). Or, les observations *in vivo* montrent que ces cellules sont moins invasives que les cellules Gli4 et en conséquence, elles interagissent moins avec la MEC. En conclusion, l'ensemble de ces observations indique que les cellules GliT sont faiblement adhésives à la MEC et n'ont pas la même dynamique des adhésions focales que les cellules Gli4. Ceci est un exemple de l'hétérogénéité inter-tumorale dans les glioblastomes. La comparaison des transcriptomes de Gli4 et GliT concorde avec les différences de comportement migratoire et d'interaction avec la MEC observées *in vivo* et *in vitro* (Publi 2. Supp. Fig. 5). En effet, nos résultats montrent que 1049 gènes sont différemment exprimés entre ces deux lignées. Parmi ces gènes, plusieurs codant pour la laminine (*LAMA2*, *LAMA5*, *LAMB3*), le collagène (*COL2A1*, *COL6A2*) et pour les intégrines (*ITGA6*, *ITGA7*, *ITGA8*, *ITGA10*, *ITGB5*) ont un profil d'expression différent entre Gli4 et GliT (> 2 fold change). Toutefois, cette analyse n'est pas exhaustive. Des travaux en cours permettront de sélectionner de nouveaux gènes et voies de signalisation impliqués dans la migration et l'interaction avec la MEC et qui sont différents entre les deux lignées de glioblastome testées.

En somme, la deuxième partie de ma thèse a permis de démontrer la validité du support de NF. Sur ce support, les cellules de glioblastome migrent dans un environnement tridimensionnel. Elles adhèrent mieux à la MEC qu'en 2D et intègrent plus efficacement les signaux externes. En conséquence, cette nouvelle matrice est valable pour étudier les effets de la variation des composantes de la MEC sur la migration des glioblastomes.

Dans cette deuxième partie, l'ensemble des expérimentations ont été faites sur la lignée primaire Gli4 car celle-ci possède un phénotype migratoire plus important que la lignée GliT *in vivo*. Au début, et dans le but d'examiner l'effet de la composition biochimique de la MEC des NF sur la migration des glioblastomes, nous avons comparé le mode migratoire adopté par les cellules Gli4 en présence ou absence de laminine. Ce travail a été fait sur des fibres alignées récapitulant l'alignement des fibres myélinisées du corps calleux.

Nous avons identifié deux modes migratoires différents utilisés par les cellules Gli4 en présence ou absence de laminine. En effet, en absence de laminine les cellules restent associées les unes aux autres au cours de la migration et migrent collectivement (Publi 2. Fig. 6). Les contacts cellule-cellule sont maintenus *via* les N-cadhérines membranaires (Publi 2. Fig. 6). Tandis qu'en présence de laminine, les cellules Gli4 migrent individuellement et ne forment pas de jonctions intercellulaires stables (Publi 2. Fig. 6). Dans cette dernière condition, la N-cadhérine est cytoplasmique (Publi 2. Fig. 6). Ces deux modes migratoires ont été référencés dans les glioblastomes. La migration collective des glioblastomes a été répertoriée *in vitro* et est favorisée en présence de la fibronectine (Serres et al., 2014). Aussi, sa présence a été démontrée *in vivo* dans l'espace périvasculaire (Travail non publié, présenté par Peter Friedl lors du sixième congrès « integrated mechano-chemical signals in invasion, 2015). De même, La migration individuelle des glioblastomes a été détectée *in vitro* sur des matrices constituées de collagène et d'acide hyaluronique (Herrera-Perez et al., 2015) et *in vivo* (Lefranc et al., 2005). Ainsi, la composition biochimique de la MEC détermine le mode migratoire des glioblastomes.

Sur les NF XPX, nos résultats précédents montrent qu'en absence de laminine, l'adhésion à la MEC *via* les intégrines $\beta 1$ diminue (Publi 2. Fig. 3). Or, dans des conditions de faible attachement à la MEC, une mort cellulaire programmée de type

anoikis se déclenche. Par exemple, ceci se produit après le détachement de la tumeur primaire au cours de la cascade métastatique et lors de l'invasion de la circulation sanguine et du site secondaire. Pour résister à l'anoikis, les cellules du cancer du sein renforcent leur cohésion intercellulaire *via* les cadhérines induisant l'activation de la voie de survie MAPK (Rayavarapu et al., 2015). De même, la cohésion des cellules tumorales circulantes (CTC) améliore leur survie après le détachement de la tumeur primaire et l'entrée dans la circulation sanguine, induisant une augmentation de leur potentiel métastatique en comparaison avec les cellules individuelles (Aceto et al., 2014; Guan, 2015). De plus, des agrégats de cellules de glioblastomes sont détectés à l'intérieur du liquide cébrospinal déficient en composants de la MEC (Travail non publié, présenté par Peter Friedl lors du sixième congrès « integrated mechano-chemical signals in invasion, 2015). L'augmentation de la cohésion intercellulaire des cellules Gli4 en absence de la laminine favoriserait ainsi la survie et la migration. L'inhibition de cette cohésion sur les NF XPX *via* l'utilisation d'un anticorps ciblant la N-cadhérine ou *via* la diminution de son expression sera nécessaire pour valider cette hypothèse.

En absence de laminine sur les NF, les cellules Gli4 ont une morphologie ronde ressemblant à celle décrite lors du mouvement amiboïde (Publi 2. Fig. 6). Dans cette condition, l'interaction avec la MEC est faible et l'expression de l'intégrine $\beta 1$ diminue (Publi 2. Fig. 3). Tandis qu'en présence de la laminine, les cellules produisent plus d'intégrines $\beta 1$ (Publi 2. Fig. 3). Elles sont étalées, bipolaires et ont un aspect mésenchymateux (Publi 2. Fig. 6). La migration mésenchymateuse des glioblastomes a été décrite *in vitro* sur des matrices 3D et des cultures organotypiques et *in vivo* (Friedl and Wolf, 2003) alors que la présence de la migration amiboïde a été démontré exclusivement *in vitro* (Friedl and Wolf, 2003; Weeks et al., 2012). Sur les NF XPX, la vérification de la transition amiboïde-mésenchymateuse après l'ajout de la laminine pourra être accomplie en analysant les différentes voies de signalisation impliquées dans cette transformation telles que la voie Rho/ROCK ou Rac/CDC42 (Pankova et al., 2010).

Pour étudier le rôle de la topologie de la MEC dans la migration des glioblastomes, nous avons évalué la direction de migration des cellules Gli4 sur des fibres alignées ou enchevêtrées en présence ou absence de la laminine. Premièrement, nos résultats montrent que la présence de laminine sur les fibres alignées et

enchevêtrées augmente significativement la migration des cellules (Publi 2. Fig. 7). Cette observation est en accordance avec d'autres travaux montrant le rôle de la laminine dans l'induction de la migration des glioblastomes *in vitro* (Tysnes et al., 1996) et le long des vaisseaux sanguins de la niche périvasculaire *in vivo* (Lathia et al., 2012). De plus, la diminution de la migration des cellules Gli4 en absence de laminine est en accord avec nos résultats précédents indiquant une baisse de l'expression de la calpaïne-2 sur les NF non fonctionnalisées.

Sur les NF alignées, la migration des cellules suit la direction des fibres (Publi 2. Fig. 7) mimant ainsi la traversée du corps calleux par les cellules de glioblastome *in vivo* (Bellail et al., 2004). En revanche, sur les fibres enchevêtrées, les cellules sortent de la sphère et migrent dans toutes les directions (Publi 2. Fig. 7). Or, *in vivo*, la topologie des fibres myélinisées du corps calleux n'est pas le seul facteur influençant la migration des cellules de glioblastome. D'autres signaux tels que ceux résultant des gradients chimiotactiques de cytokines ou de facteurs de croissance jouent un rôle important dans la détermination de la direction de migration. L'addition de molécules chimioattractives provenant de sources placées dans l'alignement des NF XPX ou dans une direction perpendiculaire, permettra d'étudier l'interaction de ces facteurs *in vitro*. Pour cela, l'inclusion des NF dans un système microfluidique sera nécessaire pour assurer un contrôle spatio-temporel du gradient biochimique.

En somme, la présence de la laminine et la topologie des NF XPX modulent la migration des cellules souches de glioblastome. Par conséquent, ces composantes de la MEC constituent de nouvelles cibles thérapeutiques contre ces tumeurs. Des thérapies anti-laminine sont déjà en développement, comme le transporteur polycefine qui délivre des oligonucléotides morpholinos pour inhiber l'expression de la laminine-8 associée à l'angiogenèse *in vivo* (Fujita et al., 2006).

Les résultats précédents ont permis de démontrer que la matrice de NF XPX favorise l'intégration des signaux externes de la MEC modulant la migration des cellules souches de glioblastome. Etant donné que ces signaux de la MEC contrôlent aussi la réponse des glioblastomes aux thérapies actuelles, la matrice de NF XPX représente un outil valable pour évaluer l'efficacité de ces traitements. Par exemple, les traitements qui ciblent des voies de signalisation telles que MEK-ERK ou PI3K-AKT impliquées dans la chimiorésistance sont dépendants de la MEC (Fernandez-Fuente

et al., 2014) et méritent donc d'être évalués sur le support de NF. De même, géfitinib inhibant sélectivement l'activité tyrosine kinase du récepteur EGFR *in vitro* et diminuant la migration des glioblastomes (Parker et al., 2013) est un candidat idéal à tester sur notre nouveau support.

L'effet anti-migratoire de la phostine (PST) est 300 fois plus efficace que son effet cytotoxique (Clarion et al., 2014). Cette activité anti-migratrice varie en fonction de la composition biochimique de la MEC en 2D et est différente sur du matrigel en 3D (Clarion et al., 2014). En présence des conditions favorables d'interaction avec la MEC sur les NF XPX, l'effet anti-migratoire de la PST serait éventuellement modifié et mérite d'être examiné.

L'ensemble de ce travail met en évidence les avantages du système de NF par rapport à la culture classique. Cette nouvelle matrice favorise l'échange avec la MEC, elle permet d'examiner le rôle des différents composants extracellulaires dans la progression des glioblastomes, et elle constitue une plateforme valable pour tester l'efficacité des thérapies actuelles. Néanmoins, ce système présente des limites. Premièrement, la modification d'un paramètre donné, d'ordre physique ou biochimique, pourrait altérer d'autres propriétés du matériau. Cet obstacle rend difficile l'évaluation de la variation d'un seul paramètre sur le comportement cellulaire. Des innovations techniques dans le futur proche permettront de contrôler plus spécifiquement la modulation de ces propriétés.

D'un autre côté, l'approche utilisée est réductionniste. Selon ce concept, la connaissance du fonctionnement individuel des composants permettrait de prévoir le fonctionnement général. Or, ce paradigme est erroné et ceci a été observé dans plusieurs phénomènes tels que la superconductivité et la superfluidité dans le domaine de la condensation de la matière en physique (Anderson, 1972). Une compréhension réelle des phénomènes biologiques mis en jeu nécessite l'intégration de l'ensemble des fonctions générées *in vivo* incluant les gradients biochimiques spatio-temporels, les signaux mécaniques et les échanges hétérotypiques avec les différentes cellules du stroma (Tanner and Gottesman, 2015).

Le développement de systèmes microfluidiques contenant des NF, destinés pour des applications potentielles en biologie, a vu le jour (Cho et al., 2011; Matlock-Colangelo et al., 2012). Ces systèmes permettront d'inclure les variations spatio-temporelles

des gradients biochimiques dans l'analyse de différentes fonctions biologiques sur les NF. Concernant les glioblastomes, ceci permettra par exemple d'examiner l'adhésion et la migration en présence d'un flux de liquide récapitulant le drainage du liquide cébrospinal à l'intérieur de l'espace périvasculaire *in vivo*. La culture de cellules souches de glioblastome avec d'autres cellules du stroma telles que des neurones, des astrocytes, des oligodendrocytes ou des cellules endothéliales aidera par ailleurs à identifier le rôle des sécrétions paracrines et des contacts cellule-cellule dans la croissance et la migration de ces tumeurs. De plus, l'ajout d'autres macromolécules de la MEC du cerveau telles que l'acide hyaluronique, la ténascine et les protéoglycanes est nécessaire pour mimer la complexité du microenvironnement naturel.

Au-delà des limites encore présentes vis-à-vis de l'utilisation des NF *in vitro*, leur implantation *in vivo* à l'intérieur du cerveau des souris, a permis de guider les cellules de glioblastome du site tumoral vers une localisation extracorticale contenant un agent pro-apoptotique, la cyclophosphamide (Jain et al., 2014). Ceci a été rendu possible en utilisant des fibres de polycaprolactone biocompatibles. Ainsi, les NF pourraient être implantées au sein de la cavité postopératoire des patients afin d'attirer les cellules résiduelles et les éliminer. Leur fonctionnalisation avec différentes molécules chimioattractives faciliterait la capture des cellules tumorales. Par contre, l'utilisation des fibres XPX *in vivo* nécessitera de tester préalablement leur biocompatibilité et biodégradabilité.

De même, ces NF pourraient être utilisées pour la régénération tissulaire. Par exemple, l'injection d'un hydrogel formé à partir d'une MEC cérébrale décellularisée diminue la neurodégénération et améliore les fonctions cognitives des souris après un traumatisme du cerveau (Wu et al., 2016). L'usage des NF fonctionnalisées avec la MEC du cerveau stimulerait la régénération tissulaire dans différentes maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson. En effet, et contrairement aux hydrogels, les NF fournissent la topologie nécessaire permettant la croissance axonique et le rétablissement des jonctions neuronales.

En somme, les travaux de ma thèse ont permis de développer une nouvelle matrice de NF et de démontrer sa validité pour l'étude du rôle de la MEC dans la migration des cellules souches de glioblastomes *in vitro*. Cette matrice constitue un modèle

précieux pour tester l'activité de différentes molécules anti-migratrices au cours du développement préclinique. Des applications thérapeutiques prometteuses plus avancées sont aussi envisageables

Conclusion générale

Depuis plus d'une décennie, la médiane de survie des patients atteints de glioblastome n'a pas été améliorée. La grande capacité migratrice d'une sous-population de cellules souches de glioblastome (CSG) rend la récurrence inévitable. La matrice extracellulaire (MEC) du cerveau joue un rôle important dans l'invasion des CSG. L'altération du profil de glycosylation affecte l'interaction de ces cellules avec le microenvironnement et augmente leur migration. Mon projet de thèse présente à la fois un aspect fondamental s'intéressant aux mécanismes de migration des CSG et un aspect pratique à visée thérapeutique plus large. Mes travaux de thèse ont permis le développement et la caractérisation d'une matrice tridimensionnelle (3D) de nanofibres (NF) de XPX pour étudier la migration des CSG *in vitro*. Ils ont démontré que la variation de la composition biochimique et des paramètres mécaniques de la MEC des NF régule le mode et la direction de migration des CSG. Cette matrice de NF représente un nouvel outil pour examiner l'effet anti-migratoire des traitements actuels dans des conditions physiologiques plus pertinentes que les cultures 2D conventionnelles. Durant ma thèse, j'ai contribué aussi à l'élucidation du mécanisme d'action de l'agent anti-migratoire PST3.1a ciblant les CSG. Ce composé interfère avec le processus de la N-glycosylation des composés cellulaires et modifie l'organisation du cytosquelette et la signalisation dépendante de la MEC ce qui induit une inhibition de la migration des CSG.

Bibliographie

REFERENCES

Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., *et al.* (2014). Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* *158*, 1110-1122.

Adamson, C., Kanu, O. O., Mehta, A. I., Di, C., Lin, N., Mattox, A. K., and Bigner, D. D. (2009). Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs* *18*, 1061-1083.

Aftab, Q., Sin, W. C., and Naus, C. C. (2015). Reduction in gap junction intercellular communication promotes glioma migration. *Oncotarget* *6*, 11447-11464.

Agarwal, S., Wendorff, J. H., and Greiner, A. (2009). Progress in the field of electrospinning for tissue engineering applications. *Adv Mater* *21*, 3343-3351.

Agudelo-Garcia, P. A., De Jesus, J. K., Williams, S. P., Nowicki, M. O., Chiocca, E. A., Liyanarachchi, S., Li, P. K., Lannutti, J. J., Johnson, J. K., Lawler, S. E., and Viapiano, M. S. (2011). Glioma cell migration on three-dimensional nanofiber scaffolds is regulated by substrate topography and abolished by inhibition of STAT3 signaling. *Neoplasia* *13*, 831-840.

Akhmanova, M., Osidak, E., Domogatsky, S., Rodin, S., and Domogatskaya, A. (2015). 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.

Ananthanarayanan, B., Kim, Y., and Kumar, S. (2011). Elucidating the mechanobiology of malignant brain tumors using a brain matrix-mimetic hyaluronic acid hydrogel platform. *Biomaterials* *32*, 7913-7923.

Anderson, P. W. (1972). More is different. *Science* *177*, 393-396.

Atherton, P., Stutchbury, B., Wang, D. Y., Jethwa, D., Tsang, R., Meiler-Rodriguez, E., Wang, P., Bate, N., Zent, R., Barsukov, I. L., *et al.* (2015). Vinculin controls talin engagement with the actomyosin machinery. *Nat Commun* *6*, 10038.

Babouri, R., Rolland, M., Sainte-Catherine, O., Kabouche, Z., Lecouvey, M., Bakalara, N., Volle, J. N., Virieux, D., and Pirat, J. L. (2015). alpha-Halogenated oxaphosphinanes: Synthesis, unexpected reactions and evaluation as inhibitors of cancer cell proliferation. *Eur J Med Chem* *104*, 33-41.

Beadle, C., Assanah, M. C., Monzo, P., Vallee, R., Rosenfeld, S. S., and Canoll, P. (2008). The role of myosin II in glioma invasion of the brain. *Mol Biol Cell* *19*, 3357-3368.

Beauchesne, P. (2011). Extra-neural metastases of malignant gliomas: myth or reality? *Cancers (Basel)* *3*, 461-477.

Beliveau, A., Thomas, G., Gong, J., Wen, Q., and Jain, A. (2016). Aligned Nanotopography Promotes a Migratory State in Glioblastoma Multiforme Tumor Cells. *Sci Rep* *6*, 26143.

Belkin, A. M., and Stepp, M. A. (2000). Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech* *51*, 280-301.

- Bellail, A. C., Hunter, S. B., Brat, D. J., Tan, C., and Van Meir, E. G. (2004). Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1046-1069.
- Bello, L., Francolini, M., Marthyn, P., Zhang, J., Carroll, R. S., Nikas, D. C., Strasser, J. F., Villani, R., Cheresch, D. A., and Black, P. M. (2001). Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery. *Neurosurgery* 49, 380-389; discussion 390.
- Berman, A. E., Kozlova, N. I., and Morozevich, G. E. (2003). Integrins: structure and signaling. *Biochemistry (Mosc)* 68, 1284-1299.
- Bianconi, D., Unsel, M., and Prager, G. W. (2016). Integrins in the Spotlight of Cancer. *Int J Mol Sci* 17.
- Blandin, A. F., Noulet, F., Renner, G., Mercier, M. C., Choulier, L., Vauchelles, R., Ronde, P., Carreiras, F., Etienne-Selloum, N., Vereb, G., *et al.* (2016). Glioma cell dispersion is driven by alpha5 integrin-mediated cell-matrix and cell-cell interactions. *Cancer Lett* 376, 328-338.
- Blandin, A. F., Renner, G., Lehmann, M., Lelong-Rebel, I., Martin, S., and Dontenwill, M. (2015). beta1 Integrins as Therapeutic Targets to Disrupt Hallmarks of Cancer. *Front Pharmacol* 6, 279.
- Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 786-801.
- Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737.
- Boscher, C., Zheng, Y. Z., Lakshminarayan, R., Johannes, L., Dennis, J. W., Foster, L. J., and Nabi, I. R. (2012). Galectin-3 protein regulates mobility of N-cadherin and GM1 ganglioside at cell-cell junctions of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem* 287, 32940-32952.
- Braga Malta, D. F., Reticker-Flynn, N. E., da Silva, C. L., Cabral, J. M., Fleming, H. E., Zaret, K. S., Bhatia, S. N., and Underhill, G. H. (2016). Extracellular matrix microarrays to study inductive signaling for endoderm specification. *Acta Biomater* 34, 30-40.
- Brat, D. J. (2012). Glioblastoma: biology, genetics, and behavior. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 102-107.
- Brosicke, N., van Landeghem, F. K., Scheffler, B., and Faissner, A. (2013). Tenascin-C is expressed by human glioma in vivo and shows a strong association with tumor blood vessels. *Cell Tissue Res* 354, 409-430.
- Burger, P. C., Dubois, P. J., Schold, S. C., Jr., Smith, K. R., Jr., Odom, G. L., Crafts, D. C., and Giangaspero, F. (1983). Computerized tomographic and pathologic studies of the untreated, quiescent, and recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 58, 159-169.
- Cai, J. J., Qi, Z. X., Hua, W., Zhu, J. J., Zhang, X., Yao, Y., and Mao, Y. (2014). Increased expression of Capn4 is associated with the malignancy of human glioma. *CNS Neurosci Ther* 20, 521-527.
- Calalb, M. B., Polte, T. R., and Hanks, S. K. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* 15, 954-963.
- Calderwood, D. A. (2004). Talin controls integrin activation. *Biochem Soc Trans* 32, 434-437.

- Chaney, W., Sundaram, S., Friedman, N., and Stanley, P. (1989). The Lec4A CHO glycosylation mutant arises from miscompartmentalization of a Golgi glycosyltransferase. *J Cell Biol* 109, 2089-2096.
- Charras, G., and Sahai, E. (2014). Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 813-824.
- Chen, Z. L., Haegeli, V., Yu, H., and Strickland, S. (2009). Cortical deficiency of laminin gamma1 impairs the AKT/GSK-3beta signaling pathway and leads to defects in neurite outgrowth and neuronal migration. *Dev Biol* 327, 158-168.
- Cheng, B., Montmasson, M., Terradot, L., and Rousselle, P. (2016). Syndecans as Cell Surface Receptors in Cancer Biology. A Focus on their Interaction with PDZ Domain Proteins. *Front Pharmacol* 7, 10.
- Chesler, D. A., Berger, M. S., and Quinones-Hinojosa, A. (2012). The potential origin of glioblastoma initiating cells. *Front Biosci (Schol Ed)* 4, 190-205.
- Chiu, C. L., Aguilar, J. S., Tsai, C. Y., Wu, G., Gratton, E., and Digman, M. A. (2014). Nanoimaging of focal adhesion dynamics in 3D. *PLoS One* 9, e99896.
- Cho, D., Matlock-Colangelo, L., Xiang, C., Asiello, P. J., Baeumer, A. J., and Frey, M. W. (2011). Electrospun nanofibers for microfluidic analytical systems. *Polymer* 52, 3413-3421.
- Claes, A., Idema, A. J., and Wesseling, P. (2007). Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol* 114, 443-458.
- Clarion, L., Jacquard, C., Sainte-Catherine, O., Decoux, M., Loiseau, S., Rolland, M., Lecouvey, M., Hugnot, J. P., Volle, J. N., Virieux, D., *et al.* (2014). C-glycoside mimetics inhibit glioma stem cell proliferation, migration, and invasion. *J Med Chem* 57, 8293-8306.
- Clarion, L., Jacquard, C., Sainte-Catherine, O., Loiseau, S., Filippini, D., Hirlemann, M. H., Volle, J. N., Virieux, D., Lecouvey, M., Pirat, J. L., and Bakalara, N. (2012). Oxaphosphinanes: new therapeutic perspectives for glioblastoma. *J Med Chem* 55, 2196-2211.
- Contessa, J. N., Bhojani, M. S., Freeze, H. H., Rehemtulla, A., and Lawrence, T. S. (2008). Inhibition of N-linked glycosylation disrupts receptor tyrosine kinase signaling in tumor cells. *Cancer Res* 68, 3803-3809.
- Corsini, N. S., and Martin-Villalba, A. (2010). Integrin alpha 6: anchors away for glioma stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 403-404.
- Cuddapah, V. A., Robel, S., Watkins, S., and Sontheimer, H. (2014). A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci* 15, 455-465.
- Daddy, W. (1928). Removal of right cerebral hemisphere for certain tumors with hemiplegia. *JAMA*.
- De Franceschi, N., Arjonen, A., Elkhatib, N., Denessiouk, K., Wrobel, A. G., Wilson, T. A., Pouwels, J., Montagnac, G., Owen, D. J., and Ivaska, J. (2016). Selective integrin endocytosis is driven by interactions between the integrin alpha-chain and AP2. *Nat Struct Mol Biol* 23, 172-179.

Demuth, T., Rennert, J. L., Hoelzinger, D. B., Reavie, L. B., Nakada, M., Beaudry, C., Nakada, S., Anderson, E. M., Henrichs, A. N., McDonough, W. S., *et al.* (2008). Glioma cells on the run - the migratory transcriptome of 10 human glioma cell lines. *BMC Genomics* 9, 54.

Dennis, J. W. (2015). Many Light Touches Convey the Message. *Trends Biochem Sci* 40, 673-686.

Dennis, J. W., Laferte, S., Waghorne, C., Breitman, M. L., and Kerbel, R. S. (1987). Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science* 236, 582-585.

Desai, S. P., Bhatia, S. N., Toner, M., and Irimia, D. (2013). Mitochondrial localization and the persistent migration of epithelial cancer cells. *Biophys J* 104, 2077-2088.

Dromard, C., Guillon, H., Rigau, V., Ripoll, C., Sabourin, J. C., Perrin, F. E., Scamps, F., Bozza, S., Sabatier, P., Lonjon, N., *et al.* (2008). Adult human spinal cord harbors neural precursor cells that generate neurons and glial cells in vitro. *J Neurosci Res* 86, 1916-1926.

Duffau, H. (2013). A new philosophy in surgery for diffuse low-grade glioma (DLGG): oncological and functional outcomes. *Neurochirurgie* 59, 2-8.

Emonard, H., Duca, L., and Dedieu, S. (2016). Editorial: Matricellular Receptors As Potential Targets in Anti-Cancer Therapeutic Strategies. *Front Pharmacol* 7, 95.

Espitia Pinzon, N., Sanz-Morello, B., Breve, J. J., Bol, J. G., Drukarch, B., Bauer, J., Baron, W., and van Dam, A. M. (2017). Astrocyte-derived tissue Transglutaminase affects fibronectin deposition, but not aggregation, during cuprizone-induced demyelination. *Sci Rep* 7, 40995.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 106, 489-498.

Farahani, E., Patra, H. K., Jangamreddy, J. R., Rashedi, I., Kawalec, M., Rao Pariti, R. K., Batakis, P., and Wiechec, E. (2014). Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. *Carcinogenesis* 35, 747-759.

Fernandez-Fuente, G., Mollinedo, P., Grande, L., Vazquez-Barquero, A., and Fernandez-Luna, J. L. (2014). Culture dimensionality influences the resistance of glioblastoma stem-like cells to multikinase inhibitors. *Mol Cancer Ther* 13, 1664-1672.

Florczyk, S. J., Wang, K., Jana, S., Wood, D. L., Sytsma, S. K., Sham, J. G., Kievit, F. M., and Zhang, M. (2013). Porous chitosan-hyaluronic acid scaffolds as a mimic of glioblastoma microenvironment ECM. *Biomaterials* 34, 10143-10150.

Foty, R. A. (2013). Tumor cohesion and glioblastoma cell dispersal. *Future Oncol* 9, 1121-1132.

Fraley, S. I., Feng, Y., Krishnamurthy, R., Kim, D. H., Celedon, A., Longmore, G. D., and Wirtz, D. (2010). A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility. *Nat Cell Biol* 12, 598-604.

Franco, S. J., Rodgers, M. A., Perrin, B. J., Han, J., Bennin, D. A., Critchley, D. R., and Huttenlocher, A. (2004). Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol* 6, 977-983.

Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 445-457.

- Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., and Segall, J. E. (2012). Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 14, 777-783.
- Friedl, P., and Mayor, R. (2017). Tuning Collective Cell Migration by Cell-Cell Junction Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3, 362-374.
- Friedrichs, J., Manninen, A., Muller, D. J., and Helenius, J. (2008). Galectin-3 regulates integrin alpha2beta1-mediated adhesion to collagen-I and -IV. *J Biol Chem* 283, 32264-32272.
- Fujita, M., Khazenzon, N. M., Ljubimov, A. V., Lee, B. S., Virtanen, I., Holler, E., Black, K. L., and Ljubimova, J. Y. (2006). Inhibition of laminin-8 in vivo using a novel poly(malic acid)-based carrier reduces glioma angiogenesis. *Angiogenesis* 9, 183-191.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., and Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64, 7011-7021.
- Gardel, M. L., Schneider, I. C., Aratyn-Schaus, Y., and Waterman, C. M. (2010). Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26, 315-333.
- Garzon-Muvdi, T., Schiapparelli, P., ap Rhys, C., Guerrero-Cazares, H., Smith, C., Kim, D. H., Kone, L., Farber, H., Lee, D. Y., An, S. S., *et al.* (2012). Regulation of brain tumor dispersal by NKCC1 through a novel role in focal adhesion regulation. *PLoS Biol* 10, e1001320.
- Giganti, A., and Friederich, E. (2003). The actin cytoskeleton as a therapeutic target: state of the art and future directions. *Prog Cell Cycle Res* 5, 511-525.
- Glading, A., Lauffenburger, D. A., and Wells, A. (2002). Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol* 12, 46-54.
- Goffart, N., Kroonen, J., and Rogister, B. (2013). Glioblastoma-initiating cells: relationship with neural stem cells and the micro-environment. *Cancers (Basel)* 5, 1049-1071.
- Granovsky, M., Fata, J., Pawling, J., Muller, W. J., Khokha, R., and Dennis, J. W. (2000). Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. *Nat Med* 6, 306-312.
- Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337, 331-337.
- Gritsenko, P. G., Ilina, O., and Friedl, P. (2012). Interstitial guidance of cancer invasion. *J Pathol* 226, 185-199.
- Grundy, T. J., De Leon, E., Griffin, K. R., Stringer, B. W., Day, B. W., Fabry, B., Cooper-White, J., and O'Neill, G. M. (2016). Differential response of patient-derived primary glioblastoma cells to environmental stiffness. *Sci Rep* 6, 23353.
- Gu, J., and Taniguchi, N. (2008). Potential of N-glycan in cell adhesion and migration as either a positive or negative regulator. *Cell Adh Migr* 2, 243-245.

- Guan, X. (2015). Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B* 5, 402-418.
- Guichet, P. O., Bieche, I., Teigell, M., Serguera, C., Rothhut, B., Rigau, V., Scamps, F., Ripoll, C., Vacher, S., Taviaux, S., *et al.* (2012). Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. *Glia*.
- Guichet, P. O., Bieche, I., Teigell, M., Serguera, C., Rothhut, B., Rigau, V., Scamps, F., Ripoll, C., Vacher, S., Taviaux, S., *et al.* (2013). Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. *Glia* 61, 225-239.
- Guo, P., Wang, Q. Y., Guo, H. B., Shen, Z. H., and Chen, H. L. (2004). N-acetylglucosaminyltransferase V modifies the signaling pathway of epidermal growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 61, 1795-1804.
- Haining, A. W., Lieberthal, T. J., and Del Rio Hernandez, A. (2016). Talin: a mechanosensitive molecule in health and disease. *FASEB J* 30, 2073-2085.
- Hambardzumyan, D., and Bergers, G. (2015). Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends Cancer* 1, 252-265.
- Han, J., Alvarez-Breckenridge, C. A., Wang, Q. E., and Yu, J. (2015). TGF-beta signaling and its targeting for glioma treatment. *Am J Cancer Res* 5, 945-955.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hemmati, H. D., Nakano, I., Lazareff, J. A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D. H., Bronner-Fraser, M., and Kornblum, H. I. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15178-15183.
- Herrera-Perez, M., Voytik-Harbin, S. L., and Rickus, J. L. (2015). Extracellular Matrix Properties Regulate the Migratory Response of Glioblastoma Stem Cells in Three-Dimensional Culture. *Tissue Eng Part A* 21, 2572-2582.
- Hirata, E., Park, D., and Sahai, E. (2014). Retrograde flow of cadherins in collective cell migration. *Nat Cell Biol* 16, 621-623.
- Hoelzinger, D. B., Mariani, L., Weis, J., Woyke, T., Berens, T. J., McDonough, W. S., Sloan, A., Coons, S. W., and Berens, M. E. (2005). Gene expression profile of glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets. *Neoplasia* 7, 7-16.
- Horton, E. R., Byron, A., Askari, J. A., Ng, D. H., Millon-Fremillon, A., Robertson, J., Koper, E. J., Paul, N. R., Warwood, S., Knight, D., *et al.* (2015). Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat Cell Biol* 17, 1577-1587.
- Hudak, J. E., and Bertozzi, C. R. (2014). Glycotherapy: new advances inspire a reemergence of glycans in medicine. *Chem Biol* 21, 16-37.
- Hughes, R. C. (2001). Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 83, 667-676.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.

- Ignatova, T. N., Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O. N., Vrionis, F. D., and Steindler, D. A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39, 193-206.
- Ihara, Y., Nishikawa, A., Tohma, T., Soejima, H., Niikawa, N., and Taniguchi, N. (1993). cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of human N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III). *J Biochem* 113, 692-698.
- Irina, O., and Friedl, P. (2009). Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J Cell Sci* 122, 3203-3208.
- Ishii, A., Kimura, T., Sadahiro, H., Kawano, H., Takubo, K., Suzuki, M., and Ikeda, E. (2016). Histological Characterization of the Tumorigenic "Peri-Necrotic Niche" Harboring Quiescent Stem-Like Tumor Cells in Glioblastoma. *PLoS One* 11, e0147366.
- Iwadate, Y., Matsutani, T., Hirono, S., Shinozaki, N., and Saeki, N. (2016). Transforming growth factor-beta and stem cell markers are highly expressed around necrotic areas in glioblastoma. *J Neurooncol* 129, 101-107.
- Jain, A., Betancur, M., Patel, G. D., Valmikinathan, C. M., Mukhatyar, V. J., Vakharia, A., Pai, S. B., Brahma, B., MacDonald, T. J., and Bellamkonda, R. V. (2014). Guiding intracortical brain tumour cells to an extracortical cytotoxic hydrogel using aligned polymeric nanofibres. *Nat Mater* 13, 308-316.
- Jang, H. S., Lal, S., and Greenwood, J. A. (2010). Calpain 2 is required for glioblastoma cell invasion: regulation of matrix metalloproteinase 2. *Neurochem Res* 35, 1796-1804.
- Janik, M. E., Litynska, A., and Vereecken, P. (2010). Cell migration-the role of integrin glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 1800, 545-555.
- Jin, X. (2016). The role of neurogenesis during development and in the adult brain. *Eur J Neurosci* 44, 2291-2299.
- Joseph, J. V., Conroy, S., Pavlov, K., Sontakke, P., Tomar, T., Eggens-Meijer, E., Balasubramaniyan, V., Wagemakers, M., den Dunnen, W. F., and Kruyt, F. A. (2015). Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1alpha-ZEB1 axis. *Cancer Lett* 359, 107-116.
- Jucker, M., Tian, M., and Ingram, D. K. (1996). Laminins in the adult and aged brain. *Mol Chem Neuropathol* 28, 209-218.
- Jung, J. P., Bache-Wiig, M. K., Provenzano, P. P., and Ogle, B. M. (2016). Heterogeneous Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in 3D Extracellular Matrix Composites. *Biores Open Access* 5, 37-48.
- Karamanos, N. K. (2012). *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*, (DeGruyter Book: De Gruyter).
- Kawataki, T., Yamane, T., Naganuma, H., Rousselle, P., Anduren, I., Tryggvason, K., and Patarroyo, M. (2007). Laminin isoforms and their integrin receptors in glioma cell migration and invasiveness: Evidence for a role of alpha5-laminin(s) and alpha3beta1 integrin. *Exp Cell Res* 313, 3819-3831.
- Killela, P. J., Reitman, Z. J., Jiao, Y., Bettgowda, C., Agrawal, N., Diaz, L. A., Jr., Friedman, A. H., Friedman, H., Gallia, G. L., Giovanella, B. C., *et al.* (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6021-6026.

- Kim, P. J., Lee, D. Y., and Jeong, H. (2009). Centralized modularity of N-linked glycosylation pathways in mammalian cells. *PLoS One* 4, e7317.
- Kothapalli, C. R., and Kamm, R. D. (2013). 3D matrix microenvironment for targeted differentiation of embryonic stem cells into neural and glial lineages. *Biomaterials* 34, 5995-6007.
- Laferte, S., and Dennis, J. W. (1988). Glycosylation-dependent collagen-binding activities of two membrane glycoproteins in MDAY-D2 tumor cells. *Cancer Res* 48, 4743-4748.
- Lagana, A., Goetz, J. G., Cheung, P., Raz, A., Dennis, J. W., and Nabi, I. R. (2006). Galectin binding to Mgat5-modified N-glycans regulates fibronectin matrix remodeling in tumor cells. *Mol Cell Biol* 26, 3181-3193.
- Lagarrigue, F., Kim, C., and Ginsberg, M. H. (2016). The Rap1-RIAM-talin axis of integrin activation and blood cell function. *Blood* 128, 479-487.
- Lal, S., La Du, J., Tanguay, R. L., and Greenwood, J. A. (2012). Calpain 2 is required for the invasion of glioblastoma cells in the zebrafish brain microenvironment. *J Neurosci Res* 90, 769-781.
- Lathia, J. D., Gallagher, J., Heddleston, J. M., Wang, J., Eyler, C. E., Macsworlds, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2010). Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 421-432.
- Lathia, J. D., Li, M., Hall, P. E., Gallagher, J., Hale, J. S., Wu, Q., Venere, M., Levy, E., Rani, M. R., Huang, P., *et al.* (2012). Laminin alpha 2 enables glioblastoma stem cell growth. *Ann Neurol* 72, 766-778.
- Lathia, J. D., Mack, S. C., Mulkearns-Hubert, E. E., Valentim, C. L., and Rich, J. N. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev* 29, 1203-1217.
- Lau, K. S., and Dennis, J. W. (2008). N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology* 18, 750-760.
- Lau, K. S., Partridge, E. A., Grigorian, A., Silvescu, C. I., Reinhold, V. N., Demetriou, M., and Dennis, J. W. (2007). Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell* 129, 123-134.
- Le, P. U., Angers-Loustau, A., de Oliveira, R. M., Ajlan, A., Brassard, C. L., Dudley, A., Brent, H., Siu, V., Trinh, G., Molenkamp, G., *et al.* (2010). DRR drives brain cancer invasion by regulating cytoskeletal-focal adhesion dynamics. *Oncogene* 29, 4636-4647.
- Lee, J. K., Matthews, R. T., Lim, J. M., Swanier, K., Wells, L., and Pierce, J. M. (2012). Developmental expression of the neuron-specific N-acetylglucosaminyltransferase Vb (GnT-Vb/IX) and identification of its in vivo glycan products in comparison with those of its paralog, GnT-V. *J Biol Chem* 287, 28526-28536.
- Lefranc, F., Brotchi, J., and Kiss, R. (2005). Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol* 23, 2411-2422.
- Legate, K. R., Wickstrom, S. A., and Fassler, R. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev* 23, 397-418.

- Leins, A., Riva, P., Lindstedt, R., Davidoff, M. S., Mehraein, P., and Weis, S. (2003). Expression of tenascin-C in various human brain tumors and its relevance for survival in patients with astrocytoma. *Cancer* 98, 2430-2439.
- Lemercier, G., Espiau, B., Ruiz, F. A., Vieira, M., Luo, S., Baltz, T., Docampo, R., and Bakalara, N. (2004). A pyrophosphatase regulating polyphosphate metabolism in acidocalcisomes is essential for *Trypanosoma brucei* virulence in mice. *J Biol Chem* 279, 3420-3425.
- Liewald, D., Miller, R., Logothetis, N., Wagner, H. J., and Schuz, A. (2014). Distribution of axon diameters in cortical white matter: an electron-microscopic study on three human brains and a macaque. *Biol Cybern* 108, 541-557.
- Loffek, S., Franzke, C. W., and Helfrich, I. (2016). Tension in Cancer. *Int J Mol Sci* 17.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., and Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131, 803-820.
- Lu, P., Weaver, V. M., and Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 196, 395-406.
- Ludwig, K., and Kornblum, H. I. (2017). Molecular markers in glioma. *J Neurooncol*.
- Manninen, A., and Varjosalo, M. (2017). A proteomics view on integrin-mediated adhesions. *Proteomics* 17.
- Martinez-Gonzalez, A., Calvo, G. F., Perez Romasanta, L. A., and Perez-Garcia, V. M. (2012). Hypoxic cell waves around necrotic cores in glioblastoma: a biomathematical model and its therapeutic implications. *Bull Math Biol* 74, 2875-2896.
- Massoud, T. F., and Kalnins, A. (2016). Glioblastoma Invoking "Killer" Rabbits of the Middle Ages. *World Neurosurg* 92, 140-141.
- Matlock-Colangelo, L., Cho, D., Pitner, C., Frey, M. W., and Baeumer, A. J. (2012). Functionalized electrospun nanofibers as bioseparators in microfluidic systems. *Lab Chip* 12, 1696-1701.
- Mendelsohn, R., Cheung, P., Berger, L., Partridge, E., Lau, K., Datti, A., Pawling, J., and Dennis, J. W. (2007). Complex N-glycan and metabolic control in tumor cells. *Cancer Res* 67, 9771-9780.
- Mierke, C. T., Kollmannsberger, P., Zitterbart, D. P., Diez, G., Koch, T. M., Marg, S., Ziegler, W. H., Goldmann, W. H., and Fabry, B. (2010). Vinculin facilitates cell invasion into three-dimensional collagen matrices. *J Biol Chem* 285, 13121-13130.
- Monferran, S., Skuli, N., Delmas, C., Favre, G., Bonnet, J., Cohen-Jonathan-Moyal, E., and Toulas, C. (2008). Alpha5beta3 and alpha5beta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int J Cancer* 123, 357-364.
- Mooney, K. L., Choy, W., Sidhu, S., Pelargos, P., Bui, T. T., Voth, B., Barnette, N., and Yang, I. (2016). The role of CD44 in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci* 34, 1-5.
- Morelle, W., and Michalski, J. C. (2007). Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nature protocols* 2, 1585-1602.

- Moretti, D., Del Bello, B., Allavena, G., and Maellaro, E. (2014). Calpains and cancer: friends or enemies? *Arch Biochem Biophys* 564, 26-36.
- Moskal, J. R., Kroes, R. A., and Dawson, G. (2009). The glycobiology of brain tumors: disease relevance and therapeutic potential. *Expert Rev Neurother* 9, 1529-1545.
- Nabi, I. R., Shankar, J., and Dennis, J. W. (2015). The galectin lattice at a glance. *J Cell Sci* 128, 2213-2219.
- Nagae, M., and Yamaguchi, Y. (2012). Function and 3D structure of the N-glycans on glycoproteins. *Int J Mol Sci* 13, 8398-8429.
- Nakada, M., Nambu, E., Furuyama, N., Yoshida, Y., Takino, T., Hayashi, Y., Sato, H., Sai, Y., Tsuji, T., Miyamoto, K. I., *et al.* (2013). Integrin alpha3 is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. *Br J Cancer* 108, 2516-2524.
- Naor, D., Nedvetzki, S., Golan, I., Melnik, L., and Faitelson, Y. (2002). CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 39, 527-579.
- Nelson, J., McFerran, N. V., Pivato, G., Chambers, E., Doherty, C., Steele, D., and Timson, D. J. (2008). The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease. *Biosci Rep* 28, 33-48.
- Nicholson, C., and Sykova, E. (1998). Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci* 21, 207-215.
- Niessen, C. M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127, 2525-2532.
- Novak, U., and Kaye, A. H. (2000). Extracellular matrix and the brain: components and function. *J Clin Neurosci* 7, 280-290.
- Ohtsubo, K., and Marth, J. D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126, 855-867.
- Ortensi, B., Setti, M., Osti, D., and Pelicci, G. (2013). Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness. *Stem Cell Res Ther* 4, 18.
- Padhiar, A. A., Fan, J., Tang, Y., Yu, J., Wang, S., Liu, L., Niang, B., Annani-Akollor, M. E., Wang, L., Wang, Q., and Zhang, J. (2015). Upregulated beta1-6 branch N-glycan marks early gliomagenesis but exhibited biphasic expression in the progression of astrocytic glioma. *Am J Cancer Res* 5, 1101-1116.
- Pan, L., Zhao, Y., Yuan, Z., and Qin, G. (2016). Research advances on structure and biological functions of integrins. *Springerplus* 5, 1094.
- Pankova, K., Rosel, D., Novotny, M., and Brabek, J. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci* 67, 63-71.
- Park, J. B., Kwak, H. J., and Lee, S. H. (2008). Role of hyaluronan in glioma invasion. *Cell Adh Migr* 2, 202-207.

- Parker, J. J., Dionne, K. R., Massarwa, R., Klaassen, M., Foreman, N. K., Niswander, L., Canoll, P., Kleinschmidt-Demasters, B. K., and Waziri, A. (2013). Gefitinib selectively inhibits tumor cell migration in EGFR-amplified human glioblastoma. *Neuro Oncol* *15*, 1048-1057.
- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I. M., Gallia, G. L., *et al.* (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* *321*, 1807-1812.
- Partridge, E. A., Le Roy, C., Di Guglielmo, G. M., Pawling, J., Cheung, P., Granovsky, M., Nabi, I. R., Wrana, J. L., and Dennis, J. W. (2004). Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* *306*, 120-124.
- Payne, L. S., and Huang, P. H. (2013). The pathobiology of collagens in glioma. *Mol Cancer Res* *11*, 1129-1140.
- Peglion, F., Llense, F., and Etienne-Manneville, S. (2014). Adherens junction treadmill during collective migration. *Nat Cell Biol* *16*, 639-651.
- Perng, G. S., Shoreibah, M., Margitich, I., Pierce, M., and Fregien, N. (1994). Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V mRNA in mammalian tissues and cell lines. *Glycobiology* *4*, 867-871.
- Pestana, A., Vinagre, J., Sobrinho-Simoes, M., and Soares, P. (2017). TERT biology and function in cancer: beyond immortalisation. *J Mol Endocrinol* *58*, R129-R146.
- Pickup, M. W., Mouw, J. K., and Weaver, V. M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* *15*, 1243-1253.
- Pouliot, N., and Kusuma, N. (2013). Laminin-511: a multi-functional adhesion protein regulating cell migration, tumor invasion and metastasis. *Cell Adh Migr* *7*, 142-149.
- Ramovs, V., Te Molder, L., and Sonnenberg, A. (2017). The opposing roles of laminin-binding integrins in cancer. *Matrix Biol* *57-58*, 213-243.
- Ranjit, M., Motomura, K., Ohka, F., Wakabayashi, T., and Natsume, A. (2015). Applicable advances in the molecular pathology of glioblastoma. *Brain Tumor Pathol* *32*, 153-162.
- Rao, J., and Li, N. (2004). Microfilament actin remodeling as a potential target for cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets* *4*, 345-354.
- Rao, J. S. (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* *3*, 489-501.
- Rao, S. S., Lannutti, J. J., Viapiano, M. S., Sarkar, A., and Winter, J. O. (2014). Toward 3D biomimetic models to understand the behavior of glioblastoma multiforme cells. *Tissue Eng Part B Rev* *20*, 314-327.
- Rao, S. S., Nelson, M. T., Xue, R., DeJesus, J. K., Viapiano, M. S., Lannutti, J. J., Sarkar, A., and Winter, J. O. (2013). Mimicking white matter tract topography using core-shell electrospun nanofibers to examine migration of malignant brain tumors. *Biomaterials* *34*, 5181-5190.
- Rayavarapu, R. R., Heiden, B., Pagani, N., Shaw, M. M., Shuff, S., Zhang, S., and Schafer, Z. T. (2015). The role of multicellular aggregation in the survival of ErbB2-positive breast cancer cells during extracellular matrix detachment. *J Biol Chem* *290*, 8722-8733.

Reffay, M., Parrini, M. C., Cochet-Escartin, O., Ladoux, B., Buguin, A., Coscoy, S., Amblard, F., Camonis, J., and Silberzan, P. (2014). [Collective cell migration: a fair sharing between leader cells and supracellular coordination]. *Med Sci (Paris)* 30, 736-738.

Relucio, J., Menezes, M. J., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., and Colognato, H. (2012). Laminin regulates postnatal oligodendrocyte production by promoting oligodendrocyte progenitor survival in the subventricular zone. *Glia* 60, 1451-1467.

Ross, D. T., Scherf, U., Eisen, M. B., Perou, C. M., Rees, C., Spellman, P., Iyer, V., Jeffrey, S. S., Van de Rijn, M., Waltham, M., *et al.* (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 24, 227-235.

Ryczko, M. C., Pawling, J., Chen, R., Abdel Rahman, A. M., Yau, K., Copeland, J. K., Zhang, C., Surendra, A., Guttman, D. S., Figeys, D., and Dennis, J. W. (2016). Metabolic Reprogramming by Hexosamine Biosynthetic and Golgi N-Glycan Branching Pathways. *Sci Rep* 6, 23043.

Sabatte, J., Faigle, W., Ceballos, A., Morelle, W., Rodriguez Rodrigues, C., Remes Lenicov, F., Thepaut, M., Fieschi, F., Malchiodi, E., Fernandez, M., *et al.* (2011). Semen clusterin is a novel DC-SIGN ligand. *J Immunol* 187, 5299-5309.

Schachter, H. (1986). Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem Cell Biol* 64, 163-181.

Schittenhelm, J., Tabatabai, G., and Sipos, B. (2016). The role of integrins in primary and secondary brain tumors. *Histol Histopathol* 31, 1069-1078.

Schnell, O., Krebs, B., Wagner, E., Romagna, A., Beer, A. J., Grau, S. J., Thon, N., Goetz, C., Kretschmar, H. A., Tonn, J. C., and Goldbrunner, R. H. (2008). Expression of integrin alphavbeta3 in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature. *Brain Pathol* 18, 378-386.

Sell, S. (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 51, 1-28.

Sen, S., Ng, W. P., and Kumar, S. (2012). Contributions of talin-1 to glioma cell-matrix tensional homeostasis. *J R Soc Interface* 9, 1311-1317.

Senner, V., Ratzinger, S., Mertsch, S., Grassel, S., and Paulus, W. (2008). Collagen XVI expression is upregulated in glioblastomas and promotes tumor cell adhesion. *FEBS Lett* 582, 3293-3300.

Serrels, B., Serrels, A., Brunton, V. G., Holt, M., McLean, G. W., Gray, C. H., Jones, G. E., and Frame, M. C. (2007). Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol* 9, 1046-1056.

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

Shologu, N., Szegezdi, E., Lowery, A., Kerin, M., Pandit, A., and Zeugolis, D. I. (2016). Recreating complex pathophysiological in vitro with extracellular matrix surrogates for anticancer therapeutics screening. *Drug Discov Today* 21, 1521-1531.

Shoreibah, M., Perng, G. S., Adler, B., Weinstein, J., Basu, R., Cupples, R., Wen, D., Browne, J. K., Buckhaults, P., Fregien, N., and Pierce, M. (1993). Isolation, characterization, and expression of a cDNA encoding N-acetylglucosaminyltransferase V. *J Biol Chem* 268, 15381-15385.

Siebzehnruhl, F. A., Reynolds, B. A., Vescovi, A., Steindler, D. A., and Deleyrolle, L. P. (2011). The origins of glioma: E Pluribus Unum? *Glia* 59, 1135-1147.

Silginer, M., Weller, M., Ziegler, U., and Roth, P. (2014). Integrin inhibition promotes atypical anoikis in glioma cells. *Cell Death Dis* 5, e1012.

Silva, G. A., Czeisler, C., Niece, K. L., Beniash, E., Harrington, D. A., Kessler, J. A., and Stupp, S. I. (2004). Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers. *Science* 303, 1352-1355.

Silver, D. J., Siebzehnruhl, F. A., Schildts, M. J., Yachnis, A. T., Smith, G. M., Smith, A. A., Scheffler, B., Reynolds, B. A., Silver, J., and Steindler, D. A. (2013). Chondroitin sulfate proteoglycans potently inhibit invasion and serve as a central organizer of the brain tumor microenvironment. *J Neurosci* 33, 15603-15617.

Silver, D. J., and Silver, J. (2014). Contributions of chondroitin sulfate proteoglycans to neurodevelopment, injury, and cancer. *Curr Opin Neurobiol* 27, 171-178.

Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63, 5821-5828.

Sit, S. T., and Manser, E. (2011). Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 124, 679-683.

Sloan, K. E., Stewart, J. K., Treloar, A. F., Matthews, R. T., and Jay, D. G. (2005). CD155/PVR enhances glioma cell dispersal by regulating adhesion signaling and focal adhesion dynamics. *Cancer Res* 65, 10930-10937.

Son, M. J., Woolard, K., Nam, D. H., Lee, J., and Fine, H. A. (2009). SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell* 4, 440-452.

Sroka, I. C., Anderson, T. A., McDaniel, K. M., Nagle, R. B., Gretzer, M. B., and Cress, A. E. (2010). The laminin binding integrin alpha6beta1 in prostate cancer perineural invasion. *J Cell Physiol* 224, 283-288.

Storr, S. J., Zhang, S., Perren, T., Lansdown, M., Fatayer, H., Sharma, N., Gahlaut, R., Shaaban, A., and Martin, S. G. (2016). The calpain system is associated with survival of breast cancer patients with large but operable inflammatory and non-inflammatory tumours treated with neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget* 7, 47927-47937.

Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., *et al.* (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987-996.

Subramanian, A., Harris, A., Piggott, K., Shieff, C., and Bradford, R. (2002). Metastasis to and from the central nervous system—the 'relatively protected site'. *Lancet Oncol* 3, 498-507.

Tabu, K., Ohnishi, A., Sunden, Y., Suzuki, T., Tsuda, M., Tanaka, S., Sakai, T., Nagashima, K., and Sawa, H. (2006). A novel function of OLIG2 to suppress human glial tumor cell growth via p27Kip1 transactivation. *J Cell Sci* 119, 1433-1441.

- Tanase, C. P., Enciu, A. M., Mihai, S., Neagu, A. I., Calenic, B., and Cruceru, M. L. (2013). Anti-cancer Therapies in High Grade Gliomas. *Curr Proteomics* 10, 246-260.
- Tanner, K., and Gottesman, M. M. (2015). Beyond 3D culture models of cancer. *Sci Transl Med* 7, 283ps289.
- Theisen, U., Straube, E., and Straube, A. (2012). Directional persistence of migrating cells requires Kif1C-mediated stabilization of trailing adhesions. *Dev Cell* 23, 1153-1166.
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., and Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* 97, 4-27.
- Thomas, A., Tanaka, M., Trepel, J., Reinhold, W. C., Rajapakse, V. N., and Pommier, Y. (2017). Temozolomide in the Era of Precision Medicine. *Cancer Res* 77, 823-826.
- Thorne, R. G., and Nicholson, C. (2006). In vivo diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5567-5572.
- Todd, B., Moore, D., Deivanayagam, C. C., Lin, G. D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K. K., and Narayana, S. V. (2003). A structural model for the inhibition of calpain by calpastatin: crystal structures of the native domain VI of calpain and its complexes with calpastatin peptide and a small molecule inhibitor. *J Mol Biol* 328, 131-146.
- Trepant, A. L., Bouchart, C., Rorive, S., Sauvage, S., Decaestecker, C., Demetter, P., and Salmon, I. (2015). Identification of OLIG2 as the most specific glioblastoma stem cell marker starting from comparative analysis of data from similar DNA chip microarray platforms. *Tumour Biol* 36, 1943-1953.
- Tucker-Burden, C., Chappa, P., Krishnamoorthy, M., Gerwe, B. A., Scharer, C. D., Heimburg-Molinaro, J., Harris, W., Usta, S. N., Eilertson, C. D., Hadjipanayis, C. G., *et al.* (2012). Lectins identify glycan biomarkers on glioblastoma-derived cancer stem cells. *Stem Cells Dev* 21, 2374-2386.
- Turner, S. G., Gergel, T., Wu, H., Lacroix, M., and Toms, S. A. (2014). The effect of field strength on glioblastoma multiforme response in patients treated with the NovoTTF-100A system. *World J Surg Oncol* 12, 162.
- Tysnes, B. B., Larsen, L. F., Ness, G. O., Mahesparan, R., Edvardsen, K., Garcia-Cabrera, I., and Bjerkvig, R. (1996). Stimulation of glioma-cell migration by laminin and inhibition by anti-alpha3 and anti-beta1 integrin antibodies. *Int J Cancer* 67, 777-784.
- Uchida, N., Buck, D. W., He, D., Reitsma, M. J., Masek, M., Phan, T. V., Tsukamoto, A. S., Gage, F. H., and Weissman, I. L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14720-14725.
- Ulrich, T. A., de Juan Pardo, E. M., and Kumar, S. (2009). The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Res* 69, 4167-4174.
- Umesh, V., Rape, A. D., Ulrich, T. A., and Kumar, S. (2014). Microenvironmental stiffness enhances glioma cell proliferation by stimulating epidermal growth factor receptor signaling. *PLoS One* 9, e101771.
- Urbanska, K., Sokolowska, J., Szmids, M., and Sysa, P. (2014). Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemp Oncol (Pozn)* 18, 307-312.

Van Meir, E. G., Hadjipanayis, C. G., Norden, A. D., Shu, H. K., Wen, P. Y., and Olson, J. J. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* *60*, 166-193.

Vasconcelos-Dos-Santos, A., Oliveira, I. A., Lucena, M. C., Mantuano, N. R., Whelan, S. A., Dias, W. B., and Todeschini, A. R. (2015). Biosynthetic Machinery Involved in Aberrant Glycosylation: Promising Targets for Developing of Drugs Against Cancer. *Front Oncol* *5*, 138.

Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., *et al.* (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* *17*, 98-110.

Vicente-Manzanares, M., Webb, D. J., and Horwitz, A. R. (2005). Cell migration at a glance. *J Cell Sci* *118*, 4917-4919.

Wang, C., Tong, X., and Yang, F. (2014). Bioengineered 3D brain tumor model to elucidate the effects of matrix stiffness on glioblastoma cell behavior using PEG-based hydrogels. *Mol Pharm* *11*, 2115-2125.

Weeks, A., Okolowsky, N., Golbourn, B., Ivanchuk, S., Smith, C., and Rutka, J. T. (2012). ECT2 and RASAL2 mediate mesenchymal-amoeboid transition in human astrocytoma cells. *Am J Pathol* *181*, 662-674.

Weinberg, R. A. (May 14, 2013). *The Biology of Cancer*, Second Edition: Garland Science Titles).

Wellen, K. E., Lu, C., Mancuso, A., Lemons, J. M., Ryczko, M., Dennis, J. W., Rabinowitz, J. D., Collier, H. A., and Thompson, C. B. (2010). The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes Dev* *24*, 2784-2799.

Wilson, T. A., Karajannis, M. A., and Harter, D. H. (2014). Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int* *5*, 64.

Winograd-Katz, S. E., Fassler, R., Geiger, B., and Legate, K. R. (2014). The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* *15*, 273-288.

Wong, S. Y., and Kumar, S. (2014). Matrix regulation of tumor-initiating cells. *Prog Mol Biol Transl Sci* *126*, 243-256.

Wu, Y., Wang, J., Shi, Y., Pu, H., Leak, R. K., Liou, A. K., Badylak, S. F., Liu, Z., Zhang, J., Chen, J., and Chen, L. (2016). Implantation of Brain-derived Extracellular Matrix Enhances Neurological Recovery after Traumatic Brain Injury. *Cell Transplant*.

Yamaguchi, N., Mizutani, T., Kawabata, K., and Haga, H. (2015). Leader cells regulate collective cell migration via Rac activation in the downstream signaling of integrin beta1 and PI3K. *Sci Rep* *5*, 7656.

Yamamoto, H., Swoger, J., Greene, S., Saito, T., Hurh, J., Sweeley, C., Leestma, J., Mkrdichian, E., Cerullo, L., Nishikawa, A., *et al.* (2000). Beta1,6-N-acetylglucosamine-bearing N-glycans in human gliomas: implications for a role in regulating invasivity. *Cancer Res* *60*, 134-142.

Yang, Y. L., Motte, S., and Kaufman, L. J. (2010). Pore size variable type I collagen gels and their interaction with glioma cells. *Biomaterials* *31*, 5678-5688.

- Yao, M., Goult, B. T., Klapholz, B., Hu, X., Toseland, C. P., Guo, Y., Cong, P., Sheetz, M. P., and Yan, J. (2016). The mechanical response of talin. *Nat Commun* 7, 11966.
- Ye, X., McLean, M. A., and Sligar, S. G. (2016). Conformational equilibrium of talin is regulated by anionic lipids. *Biochim Biophys Acta* 1858, 1833-1840.
- Yordanova, Y. N., and Duffau, H. (2017). Supratotal resection of diffuse gliomas - an overview of its multifaceted implications. *Neurochirurgie*.
- Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K. (2005). GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* 120, 137-149.
- Zent, R., and Pozzi, A. (2010). *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer*, 1 edn: Springer-Verlag New York).
- Zhao, X., and Guan, J. L. (2011). Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev* 63, 610-615.
- Zhong, J., Baquiran, J. B., Bonakdar, N., Lees, J., Ching, Y. W., Pugacheva, E., Fabry, B., and O'Neill, G. M. (2012). NEDD9 stabilizes focal adhesions, increases binding to the extra-cellular matrix and differentially effects 2D versus 3D cell migration. *PLoS One* 7, e35058.

Communication scientifique sur le projet

- **Communications orales**

- 13^{ème} réunion annuelle de la Société Française de la Biologie de la Matrice Extracellulaire, Lyon, 11-13 Mars 2015

- Symposium “New concepts & technological advances in extracellular matrix”, ENS Paris, Décembre 2015

- Réunion du Cancéropole Grand Sud-Ouest – Tumeurs Cérébrales, Toulouse, Mai 2016

- Sixth French Cell Adhesion Club Symposium, Montpellier, Juin 2016

- **Communications affichées**

- Journée de l’Ecole Doctorale CBS2, Montpellier, Mai 2015

- Sixth biannual congress « Integrated Mechano-chemical Signals in Invasion, Saint Paul de Vence, Octobre 2015

Les glioblastomes multiformes (GBM) comptent parmi les tumeurs au pronostic le plus sombre. L'extraordinaire capacité invasive des cellules tumorales rend toutes les interventions thérapeutiques actuelles totalement impuissantes. Une sous-population de Cellules Souches de Glioblastome (CSG) hautement invasive est responsable de la récurrence tumorale. Dans le cerveau, les GBM migrent principalement le long des vaisseaux sanguins au sein de l'espace périvasculaire riche en laminine, fibronectine et collagène ainsi qu'en suivant l'alignement des fibres myélinisées du corps calleux. La Matrice Extracellulaire (MEC) de ces régions joue un rôle important dans l'invasion des GBM, mais les mécanismes mis en jeu n'ont pas été complètement dévoilés. De plus, le développement de nouvelles thérapies anti-migratrices ciblant l'interaction des GBM avec la MEC reste encore limité. Dans le but de mimer la composition biochimique et les propriétés mécaniques de la MEC cérébrale et d'étudier leur rôle(s) dans la migration des CSG, nous avons développé un nouveau support de nanofibres (NF) alignées composées de poly-acrylonitrile (PAN) et fonctionnalisées avec de la laminine. Mes travaux de thèse ont montré que les NF PAN génèrent un microenvironnement tridimensionnel (3D) favorisant l'adhésion et la migration des CSG. Cette adhésion est améliorée en comparaison avec les supports planaires (SP) conventionnels (2D) et récapitule mieux les mécanismes d'interaction des CSG avec la MEC au cours de l'invasion dans le modèle murin de tumeurs xénogreffées. Dans ces conditions physiologiques plus convenables générées par les NF PAN, la variation des composantes biochimiques et mécaniques de la MEC affecte la migration des CSG. La présence ou l'absence de laminine régule le mode migratoire et l'orientation de fibres contrôle la direction de migration des CSG. D'un autre côté, l'altération de la glycosylation des protéines de la surface cellulaire module l'interaction des cellules tumorales du cerveau avec la MEC et augmente leur invasion. La deuxième partie de mes travaux de thèse a permis de démontrer que les glycomimétiques phostines « 3.1a » réorganisent le processus de la N-glycosylation des CSG diminuant leur invasivité *in vitro* et *in vivo* en inhibant les voies de signalisation de la kinase FAK et du récepteur de TGF- β impliqués dans l'interconnexion cellule-MEC.

Mots clés : Glioblastome multiforme, migration, matrice extracellulaire, nanofibres, N-glycosylation.

Glioblastoma Multiforme (GBM) is a biologically aggressive tumor with an extremely poor prognosis. The highly invasive capacity of a subpopulation of Glioblastoma Initiating Cells (GIC) makes complete surgical resection impossible. GBM dissemination occurs along preexisting brain structures such as the perivascular space rich in laminin, fibronectin and collagen as well as the aligned myelinated fibers of the corpus callosum. The Extracellular Matrix (ECM) of these cerebral regions plays an important role during GBM invasion, but the underlying mechanisms remain largely unknown. Accordingly, the development of new anti-migratory therapies targeting the cell-ECM interactions is lacking. In order to mimic the compositional and physical properties of the cerebral ECM and to investigate their role(s) in GBM invasion, we have set up a new aligned nanofibers (NF) scaffold composed of poly-acrylonitril (PAN) and functionalized with laminin. My work demonstrated that the PAN NFs constitute a tridimensional (3D) microenvironment supporting GIC adhesion and migration. The cell-ECM adhesion is improved on the PAN NF in comparison to the conventional 2D planar surfaces (PS). Furthermore, the mechanisms of GIC interaction with the ECM on the PAN NF are similar to those observed in the human GBM xenograft murine model. In this physiologically more relevant 3D microenvironment reproduced by the PAN NF, the variation of the different biochemical and mechanical components of the ECM affects the migration of GIC. The presence or absence of laminin on the NF regulates the mode of migration and the orientation of the fibers dictates the direction of migration of GIC. On the other hand, the glycosylation that decorates cell surface proteins modulates the interaction of GBM tumor cells with the ECM and its alteration increases their invasion. The second part of my thesis demonstrated that the glycomimetics phostines « 3.1a » remodel the N-glycosylation of GIC and decrease their invasivity *in vitro* and *in vivo* via the inhibition of FAK and TGF β -R signaling pathways known to be implicated in the cell-ECM intercommunication.

Key words : Glioblastoma multiforme, migration, extracellular matrix, nanofibers, N-glycosylation.