



HAL
open science

Les cellules initiatrices de tumeurs à l'origine de l'hétérogénéité d'expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ dans les glioblastomes

Marie-Cécile Mercier

► **To cite this version:**

Marie-Cécile Mercier. Les cellules initiatrices de tumeurs à l'origine de l'hétérogénéité d'expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ dans les glioblastomes. Biologie cellulaire. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ100 . tel-02303810

HAL Id: tel-02303810

<https://theses.hal.science/tel-02303810>

Submitted on 2 Oct 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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
Unité de recherche : Faculté de Pharmacie UMR-CNRS-7021

THÈSE présentée par :
Marie-Cécile MERCIER

Soutenue le : **31 octobre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Biologie cellulaire Sciences du vivant**

**Les cellules initiatrices de tumeurs
à l'origine de l'hétérogénéité d'expression
de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les glioblastomes**

THÈSE dirigée par :

Mme DONTENWILL Monique

Dr, UMR-CNRS 7021, Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr MOSSER Jean

Pr, Université de Rennes

Mme CASTEL-GANDOLFO Hélène

Dr, Inserm U1239, Rouen

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme GUENOT Dominique

Dr, Inserm U1113, Strasbourg

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier le Dr Monique DONTENWILL de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir inculqué sa rigueur scientifique et son sens de la synthèse. Merci de m'avoir proposé ce sujet de thèse, qui certes parfois compliqué, a maintenu ma curiosité et ma motivation tout au long de mon doctorat.

Je tiens à remercier les membres de mon jury, le Professeur Jean MOSSER et les Docteurs Hélène CASTELGANDOLFO et Dominique GUENOT. Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe. Maxime, c'est vrai que nous avons eu une relation comme chien et chat. Mais j'ai réellement apprécié nos discussions, scientifiques ou non. Merci pour votre vision de la science que j'essaierai d'appliquer dans mon futur professionnel. Nelly, merci d'avoir enrichi mes connaissances et de m'avoir fait progresser grâce à tes conseils. Sophie, bien que tu m'aies traumatisée en Master.... tu es toujours disponible en cas de besoin. Isabelle, je pourrais vous remercier pour vos conseils de culture, mais c'est surtout votre écoute qui a été un précieux soutien. Nos discussions sur nos « chatounettes » comme vous les appelez, m'ont permises de prendre du recul par rapport au travail. Fanny, autre ~~esclave~~ amoureuse des chats, qu'aurais-je fait sans toi ? Je ne compte pas le nombre de fois où je suis entrée dans ton bureau avec cette phrase « j'ai une question », à laquelle tu as toujours pris le temps de répondre, et avec le sourire. Enfin, Laurence, j'ai envie de te remercier pour tout. Tu as toujours été à l'écoute, ton avis objectif m'a permis d'aller de l'avant... tu m'a beaucoup apporté.

Mes sincères remerciements à mes collègues thésards. Anne-Flo, mon petit modèle, j'espère que tu ne perdras pas cette passion qui t'anime pour la recherche. Guillaume, merci de m'avoir enseigné toutes tes astuces et pour nos « pauses » au labo. Antoine, on a commencé ensemble, on a douté, on s'est souvent croisés les weekends et on a partagé nos expériences pendant ces 3 anset on finit ensemble. Ça a été sympa de partager tout ça avec toi.

Merci à Tania (désolée d'avoir déserté la « cuisine »), Jérôme (ça a été un plaisir de partager le labo en début de matinée avec vous), Élisabeth (la meilleure stagiaire) et Quentin (ce fut sympa d'être ta réceptionniste et ta secrétaire) pour votre bonne humeur.

Merci aux collègues « d'à côté », Hélène, Manu, Marlyse, Ingrid...merci pour votre disponibilité.

Aux stagiaires qui sont passés par là. Marielle, rien ne nous destinait à nous apprécier, il a fallu un pot, et une belle amitié est née. Michaela, toujours disponible pour échanger sur nos manips et résultats entre deux brasses. Elisabeth, rendez-vous à la fin de ta thèse pour monter notre business de princesses, on fera fortune, j'en suis sûre ! Sylvie, je retiendrai ces heures passées sous la hotte à essayer de décoller ces cellules « nano-marquées » et ce fou rire avec les cellules... poules. Lisa, dès le M1 j'ai senti qu'on s'entendrait bien mais je ne pensais pas autant. Enfin, Marina, nouvelle recrue, l'équipe a de la chance de t'avoir. Tu as tout le bagage nécessaire pour faire une belle thèse.

Aux amis pharmaciens: Aline, Ludivine, Tiphaine et Julia, que j'ai été ravie de rencontrer et qui m'ont fait patienter jusqu'à la fin de mon année à l'hôpital.

Un grand merci à ma famille. Mes parents, toujours disponibles pour corriger mes fautes d'orthographe. Merci pour votre écoute, votre soutien sans égal tout au long de ce « long chemin » (que je n'aurais pas imaginé si long au moment où je l'ai dit). Merci à ma grande sœur, d'avoir eu le courage de m'expliquer les maths alors que je ne demandais que les résultats des DMs et de m'avoir permis de passer le concours de l'Internat. Enfin, Karl, tu m'as tant apporté pendant ces années. Merci pour tes conseils, pour ton écoute, merci de me donner confiance, merci pour la vie qu'on s'est construite tous les deux, et dont ces trois années ne représentent qu'une étape.

Résumé

Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale la plus agressive. L'échec thérapeutique s'explique par son caractère hétérogène. Nous étudions l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, le récepteur de la fibronectine, dont les travaux du laboratoire ont montré l'implication dans l'agressivité du GBM. Il a été observé que l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est hétérogène entre patients et au sein d'une même tumeur. Nous avons émis l'hypothèse que cette hétérogénéité peut être expliquée par l'existence de différentes cellules souches de GBM (CSGs). Nos travaux montrent que certaines CSGs expriment l'intégrine après différenciation, démontrant une hétérogénéité intertumorale. Une expression hétérogène a également été mise en évidence au sein d'une même lignée, indiquant une hétérogénéité intratumorale. Nos résultats démontrent que les CSGs programmées à exprimer l'intégrine forment des cellules différenciées agressives. Nos données montrent que l'intégrine $\alpha 5$ est impliquée dans l'expansion tumorale mais aussi dans la survie et la migration en présence de fibronectine. Ce travail permet de mieux comprendre l'origine de foyers plus agressifs et souligne l'intérêt de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ comme cible thérapeutique pour une sous-population de patients.

Mots-clés : Glioblastomes, cellules souches de glioblastome, intégrine

Résumé en anglais

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive primary brain tumor. Treatment failure is explained by inter and intratumoral heterogeneity. Our previous results showed that the $\alpha 5 \beta 1$ integrin, the fibronectin receptor, is implicated in GBM aggressiveness. We observed that its expression was heterogeneous between patients' tumors but also between different areas in a given tumor. We hypothesized that this heterogeneity may be linked to different glioma stem cells (GSC). We confirmed that $\alpha 5$ expression is induced after differentiation in about half of the cell lines supporting the notion of inter-tumoral heterogeneity. We also observed with single cell-derived clone analysis that intra-tumoral GICs heterogeneity exists. We noticed that when GICs are programmed to express $\alpha 5$ integrin, differentiated cells become more aggressive. Our data support that differentiated cells expressing the integrin have an increased capacity of proliferation and acquire a fibronectin-dependent motility and a resistance phenotype. This work provides a better understanding of the origin of more aggressive foci and highlights the interest of $\alpha 5 \beta 1$ integrin as a therapeutic target for a subpopulation of patients.

Keywords: Glioblastoma, glioblastoma stem cells, integrin

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	5
Table des matières	6
Listes des Figures	10
Liste des tableaux	11
Liste des abréviations	12
Introduction	16
Partie 1 : les tumeurs gliales	17
I. Définition et épidémiologie	17
II. Diagnostic	17
1. Symptômes cliniques	17
2. Neuroimagerie	17
3. Biopsie et chirurgie	19
III. Classification	19
1. La classification OMS, 2007	19
2. La classification OMS, 2016	20
IV. Prises en charge	26
1. Protocole actuel	26
2. Essais cliniques	27
V. L'hétérogénéité du GBM	35
1. Hétérogénéité inter-tumorale	35
2. Hétérogénéité intra-tumorale	38
3. Origine de l'hétérogénéité	40
4. Implication de l'hétérogénéité	44
Partie 2 : les Cellules souches de glioblastome (CSGs)	48
I. Origines des CSGs	48
1. Transformation de cellules souches neurales	48
2. Dédifférenciation	49
II. Caractéristiques des cellules souches de GBM	49
1. Auto-renouvellement	49
2. Différenciation	51
3. Tumorigénèse	52
4. Marqueurs souches	52
III. Microenvironnement des CSGs	53
1. Niche périvasculaire	53
2. Niche invasive	54
3. Niche hypoxique	54
4. Niche immunitaire	55
IV. Hétérogénéité des CSGs	56

1. Hétérogénéité protéique	56
2. Hétérogénéité de localisation	58
V. Résistance	59
1. Chimiothérapie.....	59
2. Radiothérapie.....	60
3. Plasticité	60
VI. Traitement	61
1. Cibler l'auto-renouvellement des CSGs.....	61
2. Induire la différenciation des CSGs	63
3. Inhiber les voies qui contrôlent la radiorésistance des CSGs	63
Partie 3 : les intégrines	65
I. Le microenvironnement tumoral et les intégrines	65
1. Le matrisome.....	65
2. Les intégrines	66
II. Rôle des intégrines dans les pathologies	72
1. Pathologies non cancéreuses	72
2. Pathologies cancéreuses.....	73
III. Les intégrines dans le GBM	80
1. Les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$	80
2. Les autres intégrines	84
3. L'intégrine $\alpha5\beta1$	85
Les objectifs de l'étude	90
Matériel et méthodes.....	91
I. Partie I.....	91
1. Culture et modèles cellulaires.....	91
2. Western blot	93
3. RT-qPCR.....	93
4. Migration cellulaire en chambre de Boyden	94
5. Evasion cellulaire à partir d'une sphère tumorale	94
6. Prolifération cellulaire	95
7. Test de dilution limite	96
8. Test de dilution limite sur collagène	96
9. Analyse <i>in vivo</i>	96
II. Partie 2.....	96
1. Culture et modèles cellulaires.....	96
2. Western blot	97
3. RT-qPCR.....	97
4. Immunofluorescence et imagerie confocale.....	97
5. Migration cellulaire en chambre de Boyden	97

6. Evasion cellulaire à partir d'une sphère tumorale	98
7. Prolifération cellulaire	98
8. Test d'adhérence.....	98
9. Analyse <i>in vivo</i>	99
Résultats Partie 1:	101
I. Etude de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules souches de GBM	102
1. Expression hétérogène de l'intégrine $\alpha 5$ dans des lignées de cellules souches de GBM	102
2. Expression hétérogène de l'intégrine $\alpha 5$ au sein d'une lignée	106
3. Expression de l'intégrine $\alpha 5$ lors d'une dédifférenciation	108
II. Analyse des différences phénotypiques dans les CSGs en relation avec l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$	110
1. Comparaison des différences phénotypiques de prolifération selon l'expression de l'intégrine $\alpha 5$	111
2. Comparaison des différences phénotypiques de migration selon l'expression de l'intégrine $\alpha 5$	112
3. Comparaison des différences phénotypiques d'évasion cellulaire selon l'expression de l'intégrine $\alpha 5$	114
III. Mise au point d'un modèle cellulaire de la lignée NCH421k exprimant l'intégrine $\alpha 5$ en condition souche	120
1. Caractérisation des clones NCH421k B7 ($\alpha 5^-$), C11($\alpha 5^-$), D4($\alpha 5^+$) et E3 ($\alpha 5^+$)	122
2. Evaluation de l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la prolifération	126
3. Evaluation de l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans l'évasion cellulaire et dans l'expansion tumorale.....	128
4. Évaluation de l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la survie cellulaire	132
5. Évaluation de la plasticité des cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5$	134
IV. Évaluation de l'impact des CSGs sur la prise de tumeurs <i>in vivo</i> selon leur expression de l'intégrine $\alpha 5$	137
V. Discussion et perspectives	138
1. Expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules souches de GBM	138
2. Régulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$	138
3. Rôle de la programmation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'agressivité tumorale.....	139
Résultats Partie 2 :.....	146
I. Introduction	147
II. Caractérisation moléculaire des cellules HeLa	148
1. Analyse morphologique des cellules HeLa selon la condition de culture	148
2. Caractéristiques moléculaires des cellules HeLa selon la condition de culture	148
3. Expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules HeLa selon la condition de culture	150
III. Caractéristiques phénotypiques des cellules HeLa en condition souche et en condition différenciée	152
1. Prolifération	152
2. Survie.....	152
3. Evasion à partir d'un sphéroïde	154
4. Migration.....	154
5) Implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la formation de métastases cérébrales.....	156
6) Discussion.....	158
1. Isolement de cellules « souches » à partir de cellules HeLa	158
2. Implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'agressivité des cellules HeLa	158

Résultats Partie 3:	160
I. Article 1	160
II. Article 2	176
III. Article 3	188
Conclusion générale	222
Bibliographie	224

Listes des Figures

Figure 1 - Algorithme proposé dans la nouvelle classification 2016 des gliomes.....	25
Figure 2 - Représentation schématique des principales thérapies ciblées dans la prise en charge du GBM.....	34
Figure 3 - Hétérogénéité inter-tumorale du GBM	36
Figure 4 - Hétérogénéité intra-tumorale du GBM	38
Figure 5 - L'hétérogénéité intra-tumorale temporelle sous-population cellulaire résiste et forme un nouveau GBM récurrent.....	40
Figure 6 - Hétérogénéité intra-tumorale selon le modèle clonal	41
Figure 7 - Modèle d'hétérogénéité intra-tumorale du GBM	43
Figure 8 - Sensibilité à un panel de drogues de clones issus d'un même GBM (Meyer, 2014).	44
Figure 9 - Développement de modèle préclinique de GBM récurrent	46
Figure 10 - Modèle prédictif des changements phénotypiques de cellules de GBM induit par des thérapies anti-angiogéniques.....	47
Figure 11 - Origine des cellules souches de GBM	49
Figure 12 - Stimulation de l'auto-renouvellement des cellules souches de GBM par les cellules endothéliales	54
Figure 13 - Intérêt scientifique de l'implication de l'ECM dans la progression tumorale.....	65
Figure 14 - Structure des sous-unités α et β des intégrines	67
Figure 15 - Classification des 24 intégrines selon la combinaison des sous-unités α et β	68
Figure 16 - Schéma illustrant l'activation des intégrines selon la voie « Inside-out » et « Outside-in »	69
Figure 17 - Représentation schématique d'un méta-adhésome des intégrines	71
Figure 18 - Mécanotransduction. Les intégrines participent à l'attachement des cellules à l'ECM via la détection de ses propriétés physiques.	72
Figure 19 - Implication des intégrines dans le processus tumoral. Les intégrines participent à l'adhésion, la prolifération et la migration/invasion cellulaire, à la résistance à l'apoptose/anoïkis et à l'angiogenèse	76
Figure 20 - Illustration des différentes interactions entre le motif RGD linéaire et les intégrines $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha \beta 3$ ou $\alpha 1 \beta 3$	81
Figure 21 - Ligands antagonistes de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$	87
Figure 22 - Des zones de forte expression contiennent des zones de faible expression. Immunomarquage de la sous-unité $\alpha 5$	89
Figure 23 - Hétérogénéité inter-tumorale de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation	103
Figure 24 - L'expression protéique de l'intégrine $\alpha 5$ n'est pas induite par la régulation transcriptionnelle de son ARNm et est associée à une différenciation complète	105
Figure 25 - Hétérogénéité intra-tumorale de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation.	107
Figure 26 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est maintenue après dédifférenciation et est associée à une capacité d'auto-renouvellement complète.	109
Figure 27 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation est associée à une capacité de prolifération augmentée en condition polyclonale mais pas en condition clonale.	113
Figure 28 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ induit une migration fibronectine-dépendante dans la lignée NCH644, en condition différenciée.....	113
Figure 29 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation rend les cellules dépendantes de la fibronectine pour s'évader du sphéroïde en condition polyclonale	115
Figure 30 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation rend les cellules dépendantes de la fibronectine pour s'évader du sphéroïde en condition clonale.....	117
Figure 31 - L'expression forcée de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation induit une augmentation de l'évasion cellulaire à partir d'un sphéroïde.	119
Figure 32 - L'analyse de l'efficacité de la transfection de l'intégrine $\alpha 5$ dans la lignée souche NCH421k montre qu'un faible nombre de cellules a intégré le gène de l'intégrine	121
Figure 33 - La transfection du gène de l'intégrine $\alpha 5$ n'influence ni le phénotype souche ni la capacité de différenciation des clones.	123
Figure 34 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ semble être associée à une différenciation complète.	125

Figure 35 - L'intégrine $\alpha 5$ n'est pas impliquée dans la prolifération des clones $\alpha 5+$ mais semble influencer le métabolisme cellulaire mitochondrial.....	127
Figure 36 - L'intégrine $\alpha 5$ rend les cellules dépendantes de la fibronectine pour s'évader du sphéroïde.....	129
Figure 37 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est associée à un gain de prolifération en condition 3D..	131
Figure 38 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est associée à un gain de survie en condition de culture dépourvue de sérum dans un environnement riche en fibronectine..	133
Figure 39 - Les cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5$ présentent une plus grande plasticité cellulaire.....	135
Figure 40 - L'injection de CSGs programmées à exprimer l'intégrine $\alpha 5$ forme des tumeurs volumineuses in vivo. . .	137
Figure 41 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est augmentée dans les GBMs de sous-types mésenchymaux..	142
Figure 42 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est hétérogène au sein du GBM et est augmentée dans la masse tumorale et dans les foyers nécrosés.....	142
Figure 43 - Schéma bilan.....	145
Figure 44 - Les cellules souches tumorales sont enrichies après la culture des cellules HeLa dans du milieu dépourvu de sérum.....	149
Figure 45 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est augmentée dans les cellules HeLa cultivées dans un milieu dépourvu de sérum.....	151
Figure 46 - L'intégrine $\alpha 5$ est impliquée dans la prolifération des cellules HeLa en condition souche et la fibronectine influence la survie des cellules HeLa en condition différenciée.....	153
Figure 47 - Les cellules souches de HeLa présentent une forte capacité à migrer et à envahir un environnement riche en fibronectine.....	155
Figure 48 - L'intégrine $\alpha 5$ est impliquée dans l'adhérence et la formation d'une tumeur cérébrale volumineuse.	157

Liste des tableaux

Tableau 1 - Marqueurs moléculaires des gliomes FISH=fluorescence in-situ hybridisation.....	23
Tableau 2 - Classification immunohistochimique des 4 sous-types de GBMs	37
Tableau 3 - Hétérogénéité de la masse tumorale et de la zone subépendymale.....	39
Tableau 4 - Evolution du profil génétique de GBM lors de phase précoce, intermédiaire et tardive.....	42
Tableau 5 - Listes des primers utilisés	94
Tableau 6 - Récapitulatif des résultats phénotypiques selon l'expression de l'intégrine $\alpha 5$	136

Liste des abréviations

ABCC2	ATP Binding Casette 2/4
AC133	Epitope present sur CD133
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Akt	Protéine kinase spécifique des sérines/thréonines
ALDH1A3	ALdehyde DeHydrogenase 1 family member A3
ALT	Alternative Lengthening of Telomere
ADMIDAS	Adjacent Metal Ion-Dependant Adhesion Site
APC	Adenomatous polyposis coli
ARN	Acide RiboNucléique
ARF	ADP-ribosylation factor
AsMes	GBM Mesenchymal Astrocytaire
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated protein
ATRA	All-Trans Retinoic Acid
ATRX	Alpha Thalassemia/ mental retardation syndrome X-linked
α KG	α -cétoglutarate
Bax	BCL-2 Associated X protein
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2
BCL-XL	B-Cell Lymphoma EXtra large
BCR-Abl	Fusion des gènes BCR (Breakpoint Cluster Region) et ABL1 (Abelson)
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BIT	Bovine serum albumin-Recombinant human/Insulin-human/Transferrin
Bmi1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
c-Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
CCNU	Lomustine
CD44	Cluster of Differentiation 44
CED	Convection-Enhanced Delivery
CDK1	Cyclin Dependent Kinase 1
CDK2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CHI3L1	Chitinase-3-like protein 1
chk1	Checkpoint Kinase 1
CIC	Capicua transcriptional repressor
c-kit	Transmembrane kinase
CK1 α	Casein Kinase 1
CpG	Regions of DNA where a cytosine is followed by a guanine nucleotide
CSF	Colony Stimulating Factor
CSGs	Cellules Souches de Glioblastome
CST	Cellule Souche Tumorale
CXCL2	C-X-C motif ligand 2
CXCR4	C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
DCE	Dynamic Contrast Enhanced
DLL1	Delta-Like Ligands
DOC	GBM oligodendrocyte différencié

DSC	Differential Scanning Calorimetry
ECM	Matrice Extracellulaire
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFRVIII	Epidermal Growth Factor Receptor variant III
EMT	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
EPHA2	Ephrin receptor A2
ErbB	Famille de récepteurs à activité tyrosine kinase
Erk	Extracellular signal-regulated kinases
FAK	Focal Adhesion Kinase
FDA	Food and Drug Administration
FDG	Fluoro-2 deoxy-D-glucose
FERM	Four-point-one, ezrin, radixin, moesin
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
FLAIR	Fluid Attenuated Inversion Recovery
Flip	FLICE-like inhibitory protein
FLT3	Fms Related Tyrosine Kinase 3
FMISO	Receptor-type tyrosine-protein kinase
FN	Fluoro-1-(2-nitro-1-imidazolyl)-2-propanol
FUBP1	Fibronectine
FZD	Far Upstream Element Binding 1 protein
GABRA1	Gamma-AminoButyric acid type A Receptor Alpha1
GBM	Glioblastoma Multiforme
G-CIMP	Glioma CpG Island Methylator Phenotype
GDP/GTP	Guanosine Di/TriPhosphate
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
Gli	Glioma associated oncogene
GLUT-3	Glucose transporter 3
GSH	Glutathion réduit
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor 1
HTIC	Hypertension intracrânienne
ICA	Intégrine-Cytosquelette-Actine
IC50	half maximal Inhibitory Concentration
IDH	Isocitrate Déshydrogenase
IFN γ	Interferon-gamma
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor precursor
IL6	Interleukin 6
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
i.v	Intra-veineux
JAG1	Jagged1
KDM2B	Lysine (K)-specific demethylase 2B
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
Kras	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Ktrans	Coefficient de transfert

LAP	Latency-Associated Protein
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LRP	LDL receptor related protein
LTB	Latent TGF- β Binding proteins
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MBP	Myelin Basic Protein
MDM2	Mouse Double 2 Homolog
MDR	Multidrug Resistance Proteins
MDSCs	Myeloid-Derived Suppressor Cells
MET	Hepatocyte growth factor receptor
MGMT	6-O-méthylguanine-ADN méthyltransférase
MIDAS	Metal Ion-Dependent Adhesion Site
MIF	Migration Inhibitory Factor
MMPs	Matrix MetalloProteinases
MRP	Multidrug Resistance Protein
MTIC	3-Methyl-(Triazen-1-yl)Imidazole-4-Carboxamide
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1/2	Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
MTT	3-(4,5-diMethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylTrazolium
NADP+/NAPDH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NEFL	NeuroFilament Light polypeptide
NF1	NeuroFibromatosis type 1
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
NK	Natural Killer cell
NOS	Not Otherwise Specified
NSCs	Neural stem cells
Oct4	OCTamer-binding Transcription factor 4
OLIG2	Oligodendrocyte transcription factor
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPC	GBM-précurseur oligodendrocyte
OS	Survie globale (overall survival)
PATZ1	POZ, AT-hook and Zinc-finger
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
Pdk-1	Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1
PFS	Progression-Free Survival
PHDs	Prolyl Hydroxylase Domain
PHSCN	Pro/His/Ser/Arg/Asn motif
PI3K	PhosphoInositide 3 Kinase
PIGF	Placental Growth Factor
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisPhosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisPhosphate
PLL	Polylysine
PSI	Plexine, Semaphorine Integrin
PTB	PhosphoTyrosine-Binding
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Rac	Ras-related C3

Raf	Protéine kinase spécifique des sérines/thréonines
Ras	Small GTPase
RET	Proto-oncogene
RGD	Acide arginylglycylaspartique motif
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RT	RadioThérapie
RTK	Récepteur à activité Tyrosine Kinase
RYK	Receptor-like Tyrosine Kinase
SDF1	Stromal cell-Derived Factor 1
SELEX	Selective Evolution of Ligands by EXponential enrichment
SEZ	SubEpendymal Zone
Shh	Voie Hedgehog
SLC12A5	SoLute Carrier family 12 member 5
Smo	Récepteur Smoothened
SNC	Système Nerveux Central
Sox2	Sex determining region Y-box 2
Src	Proto oncogenic tyrosine kinase
SSEA1	Stage Specific Embryonic Antigen-1
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SVF	Sérum de Veau Foetal
SyMBS	Synergistic metal ion binding site
SYT1	Synaptotagmin-1
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEP	ThioEster containing Protein
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TFGβ	Transforming growth factor beta
TLR4	Toll Like Receptor 4
TMZ	Temozolomide
TNFα	Tumor Necrosis Factor
TP53	Tumor Protein 53
tTG	tissue TransGlutaminase
TUBB3	Tubulin beta 3 class III
TUJ1	Neuron specific class III beta-tubulin
uPAR	Urokinase receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VSCr	Volume Sanguin Cérébral relatif
Wnt	Wingless-related integration site
wt	Wild-type
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

Introduction

Partie 1 : les tumeurs gliales

I. Définition et épidémiologie

Les gliomes sont issus de la prolifération excessive des cellules gliales (astrocytes, épendymocytes, oligodendrocytes et cellules de la microglie). Ils représentent les tumeurs du système nerveux central (SNC) les plus fréquentes (81% des tumeurs cérébrales) et ont une incidence générale de 2 à 3 pour 100 000 habitants par an aux États-Unis (1). Les gliomes sont un ensemble de tumeurs hétérogènes, du point de vue de leur localisation et de leur morphologie au sein du SNC, de l'âge de diagnostic, de leur statut génétique et de leur sensibilité aux thérapies.

Le glioblastome (GBM) est la tumeur gliale la plus fréquente, représentant 60 à 70% des gliomes. On estime l'incidence de 0,59 à 3,69 cas par an pour 100 000 habitants aux États-Unis (2) et 4 cas pour 100 000 habitants en France, soit 2000 nouveaux cas par an en France (3). Celle-ci augmente de 1% par an, en raison du vieillissement de la population et de l'amélioration à l'accès aux soins et à l'imagerie. Les GBMs sont principalement découverts à 60 ans.

Peu de causes expliquant le développement de gliomes ont été démontrées. Quelques rares cas familiaux résultant d'altérations génétiques et de radiations thérapeutiques dans l'enfance sont associés à un risque de formation de gliomes (4,5). D'autres facteurs de risques, tels que l'exposition à des carcinogènes chimiques ou aux champs électromagnétiques ont été évoqués, mais leurs implications dans le développement de tumeurs cérébrales n'ont pas été confirmées. Le lien entre l'utilisation excessive de téléphones portables et le risque de développer une tumeur cérébrale reste encore incertain (6,7).

II. Diagnostic

1. Symptômes cliniques

Les symptômes évocateurs de gliomes sont variables selon la localisation cérébrale et le volume de la tumeur. Ils peuvent apparaître de manière silencieuse et progressive, avec un déficit neurologique, des troubles cognitifs et un syndrome d'hypertension intracrânienne (HTIC), ou de manière brutale avec des crises épileptiques ou des poussées d'HTIC. Ces signes cliniques entraînent la poursuite d'investigations.

2. Neuroimagerie

L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) est l'examen de référence, en cas de suspicion de tumeur cérébrale, afin d'éliminer d'autres pathologies telles qu'un accident vasculaire cérébral ischémique ou des encéphalopathies. Le diagnostic repose sur les 3 séquences de base : la séquence T1 avant et après l'injection d'un produit de contraste (Gadolinium) et la séquence T2 (FLAIR). Les coupes doivent représenter les trois plans de l'espace (8).

Des lésions diffuses en hypo-signal T1 et en hyper-signal en pondération T2 (FLAIR) caractérisent les gliomes de grade II. Une prise de contraste évoque une progression tumorale vers les grades III et IV. Les gliomes de grade IV (GBM) sont suspectés lors d'une prise de contraste en forme annulaire. Une IRM peut être pratiquée dans les 48 heures après la résection afin d'évaluer le volume du résidu tumoral ou 7 à 10 jours avant la radiothérapie (9). L'IRM permet également une évaluation de la croissance tumorale en mesurant les diamètres moyens de la tumeur de deux IRMs, espacées de 3 mois. Un gliome présentant une croissance de plus de 8 mm/an est considéré comme une tumeur agressive (10). L'IRM standard présente quelques limites, elle ne permet notamment pas une visualisation nette des contours de la tumeur. D'autres techniques ont été développées pour améliorer le diagnostic des gliomes.

a) Imagerie métabolique:

La spectroscopie-IRM analyse les différents métabolites présents dans les tissus (11). Un gliome de bas grade est évoqué lors de la mise en évidence d'un pic élevé de choline ou une diminution du N-acétyl-aspartate (due à la diminution des cellules normales) et une augmentation du myoinositol ou des phospholipides (liée au turnover de la membrane). Les tumeurs plus agressives sont suggérées lors de la présence de lactates et de lipides, caractérisant la nécrose. Néanmoins, ces données ne permettent pas de différencier de manière précise les gliomes de grade II des gliomes de grade III (12).

La tomographie par émission de positons (TEP) utilise un traceur glucidique radioactif et non utilisable par la cellule, qui se fixe préférentiellement sur les tissus tumoraux. Le marqueur [18F]-fluorodeoxyglucose (FDG) apporte une information pronostique indépendamment de l'âge, de l'histologie ou du score de Karnofsky (13). Il est peu utilisé car sa captation par les cellules tumorales et le cortex normal est peu différente (14). Le marqueur [11C]-méthionine, étant mieux capté par les cellules tumorales par rapport aux cellules saines, apporte une meilleure sensibilité (9). Par ailleurs, les gliomes (notamment le GBM) sont hautement hypoxiques. Quantifier l'hypoxie devient un élément de plus en plus important pour déterminer le grade tumoral. La tomographie par émission de positons utilisant les marqueurs F-18-fluoromisonidazole (FMISO) permet de déterminer le niveau d'hypoxie de la tumeur et d'établir une corrélation avec la PFS (survie sans progression) ou l'OS des patients (survie globale) (15,16).

b) Imagerie fonctionnelle:

L'IRM de perfusion (DSC) permet de calculer le volume sanguin cérébral relatif (VSCr) qui reflète la micro-vascularisation. L'IRM de perfusion met en évidence une progression tumorale avant l'apparition d'une prise de contraste en IRM traditionnelle (17,18).

L'IRM de diffusion (DCE) analyse les mouvements de l'eau et permet d'évaluer la perméabilité vasculaire en calculant le coefficient de transfert (K_{trans}). L'augmentation de la perméabilité est associée à la formation de néo-vaisseaux ou une rupture de la BHE (19–21).

3. Biopsie et chirurgie

Bien que les techniques d'imageries soient de plus en plus précises et performantes, les erreurs de diagnostics sont estimées à 50%. A titre d'exemple, 35 à 54% de gliomes de bas grade, diagnostiqués par imagerie, ont été reclassés après analyse histopathologique sur un fragment tumoral, en gliomes de haut grade. L'obtention d'un fragment de tumeur de patient lors de la chirurgie est un élément diagnostic obligatoire avant de commencer une thérapie, afin de déterminer le type de gliome. Dans certains cas, la résection chirurgicale est impossible : un état général du patient trop faible, une localisation tumorale au niveau du cortex entraînant des troubles neurologiques, des comorbidités trop importantes... Dans ce cas, une biopsie stéréostatique est proposée. La biopsie est une procédure moins invasive, qui a montré un diagnostic similaire à la chirurgie dans 57 à 89% des cas (22).

III. Classification

1. La classification OMS, 2007

Classer les tumeurs cérébrales fait l'objet de nombreuses recherches depuis plusieurs années (23–28).

a) Principe de la classification

La classification précédente de l'OMS (2007) repose sur une analyse anatomopathologique d'un fragment représentatif, biopsie ou exérèse, du gliome. Elle définit des éléments « histologiques » et de « grading » (26). Le diagnostic « histologique » se base sur le type cellulaire prédominant (type astrocytaire, oligodendrocytaire ou mixte) et sur les ressemblances morphologiques avec les cellules gliales normales. Le diagnostic « grading » repose sur plusieurs critères de malignité tels que la densité cellulaire, la présence d'atypies nucléaires, de mitoses, de prolifération microvasculaire et de nécrose (26). La classification OMS 2007, décrit trois classes majeures : les astrocytomes (grade I à IV), les oligodendrogliomes (grades II à III) et les oligoastrocytomes (grade II à III).

b) Le GBM selon la classification histologique

Le GBM est un astrocytome de grade IV. Il s'agit de la tumeur cérébrale la plus agressive et la plus étudiée (29). Le GBM, est caractérisé par la présence de nécrose, d'atypies nucléaires nombreuses, de mitoses et d'une prolifération microvasculaire (30).

Il existe deux types de GBMs : les GBMs primaires et les GBMs secondaires. Un GBM est dit primaire lorsqu'il ne possède aucun historique de gliomes antérieurs et son diagnostic est réalisé dès la première biopsie. A l'inverse, un GBM secondaire est évoqué lorsque la mise en évidence d'un gliome de plus bas grade est présente (31). D'un point de vue histopathologique, peu de données permettent de différencier un GBM primaire d'un GBM secondaire. Seule la nécrose et les plages ischémiques, présentes dans 89% des GBMs primaires et 63% des GBMs secondaires, et un gonflement pérítumoral fréquent dans les GBMs primaires, permettent de les discriminer (32,33). Par ailleurs, les GBMs secondaires sont plus rares, ils représentent

seulement 5 à 10% des GBMs, et touchent principalement des patients jeunes (âge médian 45 ans pour les GBMs secondaires et 60 ans pour les GBMs primaires) (23,32).

Bien que la classification 2007 de l'OMS (26), ait été reconnue internationalement pour classer les gliomes, elle souffre de problèmes de reproductibilité inter- mais aussi intra-observateur (34). Se basant sur des critères histologiques uniquement visuels, elle manque de précision et ne permet pas d'évaluer de manière objective ni l'agressivité de la tumeur, ni le traitement le plus bénéfique. Par ailleurs, de nombreuses altérations génétiques ont été identifiées dans les gliomes. Ces nouvelles connaissances ont permis d'associer un sous-type histologique à des caractéristiques moléculaires. En 2014, une réunion pluridisciplinaire a proposé une révision de la classification 2007 afin d'établir des recommandations pour incorporer les données moléculaires dans le diagnostic des tumeurs cérébrales (35).

2. La classification OMS, 2016

a) Principe de la classification

La classification 2016 est définie comme un « diagnostic en couche » ou « diagnostic intégré », associant aux anciennes données histologiques, les nouvelles données moléculaires. Ce « diagnostic en couche » permet d'apporter une meilleure vision de la tumeur avec le plus d'information possible. Les tumeurs cérébrales ne sont plus classées dans des groupes mais sont diagnostiquées par une description la plus complète possible (35). Ce nouvel élément apporte une meilleure objectivité en formant des ensembles de tumeurs cérébrales plus homogènes sur les plans biologiques, pronostiques et prédictifs (23). En cas de discordance, quand un gliome a des caractéristiques histologiques et moléculaires contradictoires, les caractéristiques histologiques prédominent.

b) Critères moléculaires

i. IDH1

Il existe trois enzymes isocitrates déshydrogénases (IDH), codées par cinq gènes. Les protéines IDH2 et IDH3 sont localisées dans la mitochondrie et sont impliquées dans le cycle de Krebs. La protéine IDH1 est localisée dans le cytoplasme et les peroxysomes et participe au métabolisme des lipides et du glucose (36). La protéine IDH1 est une enzyme majeure dans la défense des cellules au stress oxydatif en catalysant la décarboxylation de l'isocitrate en α -ketoglutarate (α -KG) au sein du cycle de l'acide citrique (37,38). La liaison entre la protéine IDH1 et son substrat se situe sur le site R132 (39). Cette réaction entraîne la production du cofacteur NADPH à partir de NADP⁺ (40–42).

Une mutation IDH1 a été mise en évidence pour la première fois dans un GBM secondaire (41). La mutation la plus fréquente du gène IDH1 consiste en un changement de guanine en adénine en position 395, résultant en un remplacement d'une arginine en histidine en position 132 de la protéine IDH1. On parle de la mutation R132H (41,43). Cette mutation représente 91% des mutations IDH (38). Les mutations sur le gène IDH2 sont moins fréquentes. Nous parlerons de mutation IDH de manière générale, en tenant compte de toutes les mutations des gènes IDH1 et IDH2.

Les mutations IDH1 ont pour conséquences de réduire le taux du produit α -KG et du cofacteur NADPH, deux éléments importants dans le maintien du taux de glutathion réduit (GSH) (43), entraînant ainsi une augmentation de l'hypoxie et des modifications de la méthylation de l'ADN.

Il a été établi que les mutations IDH1 caractérisent les gliomes diffus des trois types, oligodendrocytomes, astrocytomes et oligoastrocytomes, et sont associées au grade tumoral (29,44,45). Selon l'étude de Sanson et al., 2009 (46), 77% des tumeurs de grade II, 55% de grade III et 6% de grade IV sont IDH1 mutées. Le statut IDH1 est considéré comme un facteur pronostic plus fiable que le type histologique tumoral (47). A titre d'exemple, les patients atteints de GBMs à statut IDH muté ont une survie globale supérieure aux patients atteints de GBMs IDHwt, mais aussi, d'astrocytomes anaplasiques IDHwt (astrocytome anaplasique-IDHwt : 1,7 ans ; GBM-IDH muté : 2,1 ans) (48).

ii. Pertes combinées des bras entiers 1p/19q (codélétion 1p/19q)

La codélétion 1p/19q est une translocation dite non balancée $t(1;19)(q10;p10)$, entre le chromosome 1 et le chromosome 19. Celle-ci est due à la colocalisation des deux chromosomes et à leur homologie de structure au niveau de la région du centromère, induisant leur fusion (49,50).

La codélétion 1p/19q est une caractéristique des oligodendrogliomes, elle est présente dans 60 et 80% des oligodendrogliomes de grade II et III selon la classification OMS 2007 (51,52). Il s'agit d'un phénomène précoce dans la différenciation oligodendrocytaire, et qui reste stable au cours de la progression tumorale et des récives (35,53). La codélétion 1p/19q est un marqueur de bon pronostic : les patients ayant un gliome codéléte ont une survie moyenne de 162,3 mois en comparaison aux patients atteints de tumeur non codéléte, dont la survie globale est de 91,1 mois.

iii. ATRX

Le gène ATRX (alpha thalassemia/mental retardation syndrom X-linked) est localisé sur le chromosome Xq21.1. Physiologiquement, la protéine ATRX est exprimée de manière ubiquitaire dans le noyau et agit au niveau de plusieurs voies cellulaires, notamment dans le remodelage de la chromatine et dans le changement de la longueur des télomères (54–56). Les mutations sur le gène ATRX induisent la formation d'une protéine tronquée non exprimée (57,58) et entraînent des altérations de la méthylation de l'ADN, une ségrégation des chromosomes lors de la méiose ou un dysfonctionnement des télomères (59). La perte d'expression d'ATRX est associée au type histologique astrocytaire de bas grade, et n'est pas observée dans les GBMs (60).

iv. EGFR

L'EGFR (epidermal growth factor receptor) est un facteur de croissance appartenant à la famille des récepteurs ErbB à activité tyrosine kinase (61). La fixation de son ligand, l'EGF, entraîne la dimérisation du récepteur, et l'activation des voies PI3K/Akt et Ras/MAPK, voies impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

Le gène de l'EGFR, situé sur le chromosome 7p12, est amplifié ou surexprimé dans plus de 50% des GBMs (62). Il s'agit d'une caractéristique d'un GBM, notamment d'un GBM primaire (63). De plus, 50% des GBMs ont une mutation sur le gène EGFR, entraînant l'expression du variant EGFRvIII (30,64). Cette mutation, la

plus fréquente, correspond à la délétion des exons 2-7 dans le domaine extracellulaire de l'EGFR, induisant la formation d'un récepteur tronqué, activé de manière indépendante à la fixation de ligand (65,66). Ce mutant confère un potentiel tumorigène se traduisant par une augmentation de la prolifération et une diminution de l'apoptose (67). L'amplification de l'EGFR ou l'expression du variant EGFRVIII sont associées à un gliome de haut grade, à un mauvais pronostic et à une mauvaise réponse à la radiothérapie ou à la chimiothérapie (68,69).

v. **MGMT**

Le gène codant pour la MGMT (O-6-methylguanine-ADN methyltransférase) est situé sur le chromosome 10q26. La protéine MGMT est impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN et à la résistance des gliomes aux thérapies alkylantes. Le promoteur du gène de la MGMT est riche en CpG, dont la méthylation entraîne une diminution de son expression (70). L'hyperméthylation du promoteur de la MGMT apporte des données prédictives de l'efficacité de thérapies alkylantes. Elle est associée à une meilleure survie, notamment pour les patients âgés atteints de GBMs, traités par radiothérapie et chimiothérapie et pour les patients atteints de gliomes anaplasiques traités par radio et chimiothérapie (71,72).

Le statut du promoteur de la MGMT n'est pas associé au grade tumoral : on observe une méthylation dans 38% des gliomes diffus, 45% des gliomes anaplasiques et 27% des GBMs (73). Cependant, d'autres études montrent que l'expression de la MGMT est plus élevée dans les gliomes de haut grade que dans les gliomes de bas grade (62,1% vs 46,2%) (74).

Le **Tableau 1** répertorie les différentes protéines impliquées dans la gliomagenèse, leur rôle diagnostic, prédictif ou pronostic et leurs fréquences respectives dans les différents types de gliome.

	Mutation IDH1	Codéletion 1p/19q	Méthylation du promoteur MGMT	ATRX	EGFRvIII	P53
Conséquence biologique	Augmentation de 2-hydroxyglutarate	CIC FUBP ?	Diminution de la réparation de l'ADN ? Association au phénotype CIMP	Perte de l'expression d'ATRX, ALT	Activation constitutive de la cascade de la voie PI3K, gain de prolifération et de migration, diminution de l'apoptose	Dérégulation de l'apoptose, augmentation du taux de prolifération ou d'invasion
Méthode	Immunohistochimie (Ab IDH1 R132H) (pyro)séquençage MRS	FISH LOH PCR Hybridation génomique non comparative	MSP (pyro)séquençage Séquençage Bisulfate (immunohistochimie)	Immunohistochimie	rtPCR/séquençage immunohistochimie FISH/CISH	Immunohistochimie
Rôle diagnostique	Différentiel entre gliomes diffus et haut grade	Association oligodendrogliomes	-	Association astrocytomes	Association au GBMs	Association aux astrocytomes et GBMs secondaires
Rôle pronostique	Pronostic positif	Pronostic positif	Favorable pour gliomes anaplasiques	/	Pronostic négatif	Bon
Rôle prédictif	/	Radiothérapie et agents alkylants	Pour GBM avec agent alkylant	/	/	/
Fréquence (%)						
Astrocytome pilocytique	0 %	0 %	/	0 %	/	/
Astrocytome diffus	59-67 %	0-14 %	89 %	67 %	0 %	50-60%
Oligodendrogliome diffus	68-86 %	76-100 %	100 %	24 %	0 %	6-24%
Oligoastrocytome diffus	50-100 %	5 %		56 %		40-61%
Astrocytome anaplasique	52-84 %	0-5 %	85 %	73 %	0 %	68-82%
Oligodendrogliome anaplasique	60-96 %	60-100 %	100 %	7 %	0 %	7-15%
Oligoastrocytome anaplasique	78-95 %	26 %	/	77 %	/	48-73%
GBM secondaire	50-57 %	0 %	/	57 %	/	60-79%
GBM primaire	3-14 %	0-2 %	47 %	4 %	28 %	23-34%

Tableau 1 - Marqueurs moléculaires des gliomes. FISH=fluorescence in-situ hybridisation. MSP=méthylation-specific PCR. rtPCR=real-time PCR. MLPA=multiplex ligation-dependent probe amplification. (44,75,76).

A partir des différents marqueurs moléculaires décrits précédemment, il a été observé l'expression précoce de certains marqueurs (mutation IDH1), tandis que d'autres apparaissent secondairement (mutation ATRX, codélétion 1p/19q...). De plus, alors que plusieurs marqueurs sont fréquemment présents simultanément et caractérisent un type tumoral (l'association IDH1/codélétion 1p/19q ou IDH1/ATRX...) d'autres ne sont pratiquement jamais exprimés dans la même tumeur (IDH1 et EGFR, codélétion 1p/19q et ATRX)... Toutes ces observations ont suggéré l'existence de trois voies aboutissant à la formation de gliomes (37):

- La première commence par la mutation IDH1, suivie par la codélétion 1p/19q. Ces tumeurs sont de types oligodendrocytaires de grade II ou III.
- La deuxième commence par la mutation IDH1, suivie par la mutation ATRX entraînant la formation de tumeurs astrocytaires. Ces gliomes commencent également au grade II. L'accumulation d'altérations génétiques au cours de leur progression aboutit à la formation de tumeurs de plus haut grade telles que les GBMs secondaires.
- La troisième n'a pas de mutation IDH1. Ces gliomes acquièrent rapidement de nombreuses altérations génétiques, incluant l'amplification ou la mutation de l'EGFR. Ces tumeurs aboutissent à la formation de GBMs primaires.

Les nouveaux critères moléculaires entraînent une modification de la nomenclature de la classification. Celle-ci commence par un premier terme caractérisant les données histologiques, suivi des données génétiques et des adjectifs caractéristiques. A titre d'exemple, on parle d'« astrocytomes diffus, IDH-mutés », d'« oligodendrogliomes, IDH mutés, 1p/19q codélétés » ou de « glioblastomes, IDH wt ». Enfin, en cas de données moléculaires manquantes, le terme NOS (Not Otherwise Specified), est utilisé. Il définit un groupe de tumeurs qui n'a pas été testé au niveau moléculaire. Dans ce cas, il est nécessaire d'expliquer pourquoi ces tests moléculaires n'ont pas été réalisés. Selon Louis et al., 2014 (35) pour certains gliomes, l'histologie reste la base du diagnostic et ne nécessite pas de données moléculaires. Ainsi, selon l'histologie des tumeurs, des tests moléculaires seront nécessaires ou recommandés. En cas de résultats négatifs pour un test moléculaire, un deuxième est nécessaire.

Pour conclure, la nouvelle classification propose l'algorithme décrit dans la **Figure 1** :

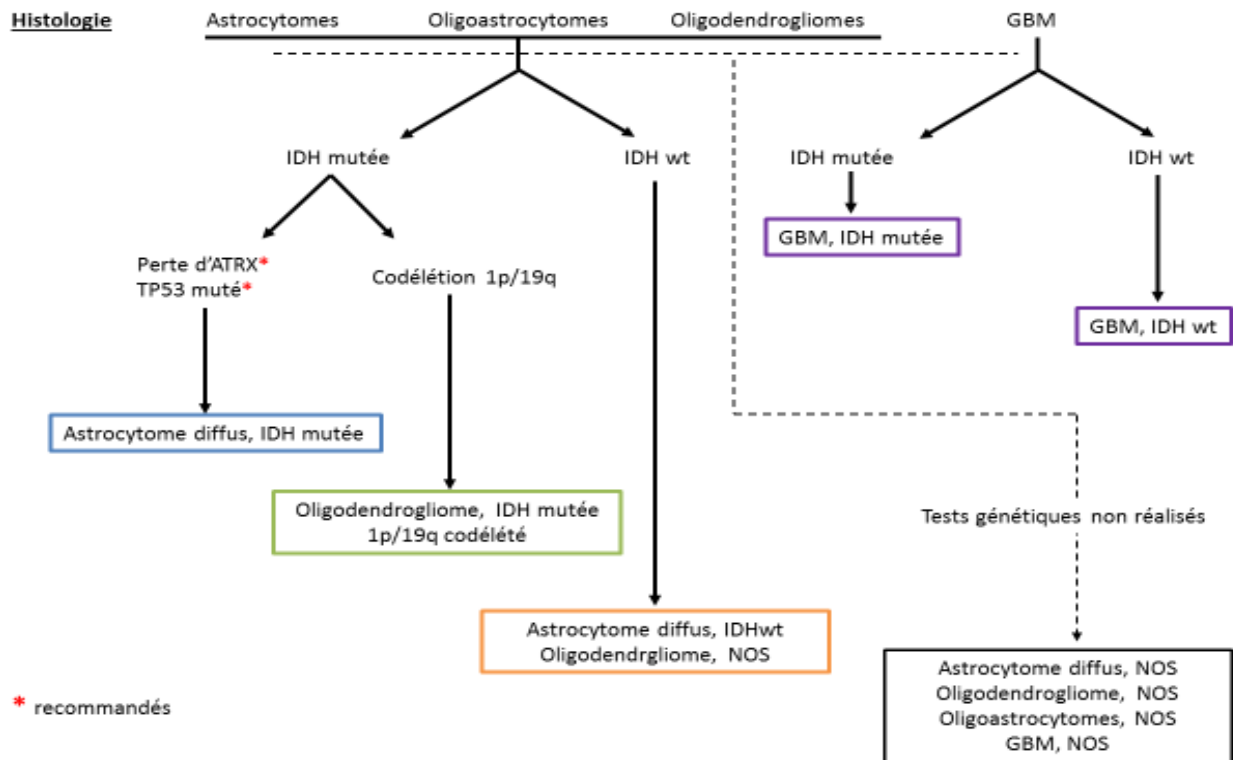


Figure 1 - Algorithme proposé dans la nouvelle classification 2016 des gliomes. Adapté de Louis et al., 2016 (23).

c) GBM selon la classification moléculaire

Contrairement aux gliomes de bas grade et aux GBMs secondaires, les GBMs primaires ont rarement le gène IDH1 muté (5%) (38,44). Les plages de nécroses et d'ischémie, observées dans 89% des GBMs primaires, sont également caractéristiques des GBMs à statut IDHwt (90% vs 50% des GBMs IDH mutée) (31). Les GBMs sont caractérisés par une amplification de l'EGFR, observée dans 88,6% des GBMs comparé à 22,4%, 44,6% et 71,2% pour les gliomes de grades I à III (74). Il est intéressant de noter que l'amplification de l'EGFR est inversement corrélée à la mutation IDH1 (45). Les GBMs IDH1 à statut sauvage (wt) et mutés sont deux tumeurs différentes, bien qu'ayant une histopathologie similaire.

Selon la classification 2016, les GBMs sont divisés en trois groupes :

- GBMs IDHwt : ce groupe représente 90% des GBMs, correspondant aux GBMs primaires.
- GBMs IDH mutée : représentant 10% des cas, ils se rapprochent des GBMs secondaires et surviennent chez les patients jeunes.
- GBMs NOS : dont le statut IDH n'a pas pu être évalué.

Par ailleurs, lorsque les données histologiques évoquent un GBM et que l'analyse immunohistochimique de IDH1 (mutation R132H) est négative, la classification recommande de réaliser le séquençage chez les patients jeunes. En revanche, il n'est plus recommandé après 60 ans (78).

IV. Prises en charge

1. Protocole actuel

a) Patients nouvellement diagnostiqués

Le traitement standard des GBMs repose sur une résection chirurgicale suivie d'une radiothérapie (RT) et d'une chimiothérapie concomitante pendant 6 semaines : la zone entourant la tumeur est irradiée à 2Gy par jour, cinq fois par semaine. La chimiothérapie utilisée est le Témazolomide (Temodal®, TMZ) à 75mg/m² par jour. Après cette radio-chimiothérapie, le TMZ est poursuivi seul toutes les quatre semaines, à 150-200mg/m² par jour pendant 5 jours consécutifs (79).

Le TMZ est un agent alkylant entraînant des dommages à l'ADN, un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules. Il est immédiatement converti en métabolite actif: le 3-méthyl-(triazén-1-yl)imidazole-4-carboxamide (MTIC). Ce produit réagit avec l'eau et libère le 5-aminoimidazole-4-carboxamide et le méthyldiazonium, hautement réactifs. Ce dernier induit la méthylation sur la position N7 d'une guanine ou d'une adénine et O6 d'une guanine (80). Ces mutations provoquent une réparation aberrante puis l'apoptose des cellules.

b) Patients atteints de GBM récurrent

Malgré ce lourd traitement, une récurrence apparaît dans les 6 à 9 mois suivant le diagnostic (81). Dans 90% des cas, la récurrence se trouve à la marge de la résection chirurgicale. Néanmoins, bien que les cellules de GBMs soient très infiltrantes dans le parenchyme cérébral, celles-ci ne se disséminent pas par voie lymphatique, ce qui rend les métastases rarissimes. A l'apparition de la récurrence, la survie des patients est de 3 à 6 mois (82). Aucun protocole n'a pour le moment été validé dans la prise en charge de GBM récurrent. De manière générale, les patients sont inclus dans des essais cliniques (83).

Une augmentation des doses de radiothérapie (RT) n'apporte aucun gain de survie mais plus de toxicité, notamment une nécrose du tissu sain (84). De même, augmenter les doses du TMZ n'est pas plus efficace (85).

Une ré-opération est proposée chez certains patients, lorsque la masse tumorale entraîne des symptômes tels que des convulsions, des troubles du langage ou moteurs. L'amélioration de la survie après une deuxième chirurgie reste un sujet à controverse. L'étude menée par Bloch et al., 2012 (86) montre qu'une résection quasi-totale (>95%) d'un GBM récurrent est associée à une survie de patients plus élevée comparée à une opération partielle (<95%) (19 mois vs 15,9 mois). Ce gain clinique a été observé uniquement chez les patients dont l'opération initiale (GBM nouvellement diagnostiqué) a été partielle. Selon Franceschi et al., 2015 (87), une deuxième chirurgie suivie d'une chimiothérapie n'améliore pas la survie des patients comparé à la chimiothérapie seule. Néanmoins, une deuxième chirurgie permet d'implanter de nouvelles thérapies directement dans la cavité de la résection chirurgicale.

Une deuxième chimiothérapie peut reposer sur la procarbazine (molécule alkylante), lomustine (CCNU ; molécule alkylante appartenant à la famille des nitroso-urées) ou la vincristine (poison du fuseau inhibant la tubuline). En raison de mécanismes d'action similaires, l'efficacité de ces thérapies et les résistances sont comparables au TMZ (83,88).

Plusieurs obstacles peuvent expliquer l'échec thérapeutique des traitements actuels :

- Le premier est l'incapacité à réaliser une résection chirurgicale totale. Il est en effet impossible d'éliminer les cellules tumorales ayant migré dans le parenchyme sain, sans entraîner des troubles neurologiques ou cognitifs. On estime que 35% de patients nouvellement diagnostiqués sont non opérables en raison de la localisation ou de la taille de la tumeur. Le reste des patients ne subit qu'une résection partielle (89).
- La résistance à la chimiothérapie peut être expliquée par une résistance intrinsèque des cellules tumorales ou par la difficulté des molécules thérapeutiques à traverser la BHE malgré sa destruction potentielle par l'envahissement tumoral ou par la radiothérapie.
- L'hétérogénéité génotypique des GBMs explique la difficulté à cibler une protéine tumorale, en raison de mécanismes compensatoires (voir paragraphes suivants).

2. Essais cliniques

a) Amélioration des thérapies actuelles : administration des thérapies intracrâniennes

De nouvelles stratégies thérapeutiques proposent d'améliorer le passage de la BHE, afin d'obtenir une concentration thérapeutique cérébrale élevée. Il a été proposé d'administrer directement la chimiothérapie dans la cavité de résection chirurgicale :

L'administration par convection (CED) permet de délivrer la chimiothérapie directement via un cathéter, dans le tissu entourant la résection du GBM. La molécule thérapeutique est administrée lentement par une pompe. Cette méthode permet d'augmenter le volume de distribution mais entraîne une diffusion cérébrale imprédictible (90). De plus, elle nécessite le recours à plusieurs actes chirurgicaux, induisant un risque élevé d'infections ou d'hémorragies. Cette stratégie a été testée via l'administration de molécules conjuguées à des toxines (transferrine conjuguée à la toxine diphtérique ou l'interleukine 4 conjuguée à l'endotoxine *Pseudomonas*...), de virus servant de vecteur à des gènes (gène de la thymidine kinase couplé au virus de l'herpès...) ou de chimiothérapies incapables de traverser la BHE, dont le Paclitaxel, la Camptothécine (91).

L'administration directement à la base de la craniotomie, en utilisant une drogue imprégnée de nanoparticules (notamment à base d'hydrogel), afin de garantir une libération prolongée de la drogue dans le tissu cérébral (92). Oncogel®, une nanoparticule composée de Paclitaxel, permet une libération de la molécule à forte concentration pendant 6 semaines. Associé à la radiothérapie et au TMZ, Oncogel® a montré un gain de survie *in vivo* (93). Ce composé fait l'objet d'un essai clinique de phase I et II (NCT00479765) chez des patients atteints de GBMs récurrents.

De manière similaire, il est proposé de déposer un implant imprégné de carmustine (nitrosourée) au bord de la résection chirurgicale. Une étude de phase III a montré que les patients atteints de GBM et traités par une résection chirurgicale permettant un implant de carmustine (Gliadel[®]) et suivie d'une radiothérapie, ont une survie globale augmentée, comparés à une résection associée à une radiothérapie (OS=13,9 mois vs 11,6 mois ; p=0,03) (94). Une méta-analyse a étudié 6 études cliniques utilisant le Gliadel[®] dans le cadre de GBMs nouvellement diagnostiqués ou récurrents. Trois d'entre elles ont mis en évidence un bénéfice clinique du Gliadel[®] dans la survie globale des patients associé au TMZ et comparé au TMZ ou en monothérapie comparé à un placebo (95). Plus récemment, une méta-analyse a également confirmé le gain de survie à l'aide du Gliadel[®] (96). Enfin, une étude rétrospective a comparé l'efficacité du Gliadel[®] associé au protocole Stupp et au Bevacizumab (54 patients), comparé au protocole Stupp (25 patients), dans la prise en charge de GBMs nouvellement diagnostiqués. Un gain de survie globale (24,2 mois vs 15,3 mois ; P=0,027) et de survie sans progression (PFS=16,8 mois vs 7,3 mois ; P=0,009) a été observé (97). Le Gliadel[®] a reçu une autorisation de mise sur le marché dans la prise en charge des patients atteints de GBM nouvellement diagnostiqué ou récurrent.

b) Thérapies ciblées

i. Cibler l'autonomie de croissance et la migration

Le TCGA (The Cancer Genome Atlas Research Network) a analysé le génome de cellules de GBMs et a montré des mutations des voies RAS/PI3K (Phosphatidylinositol 3 kinase) dans 88% des GBMs (98). L'activation de cette voie est provoquée par l'activation de récepteurs tyrosine kinase (RTKs) (EGFR, PDGFR). Les différents changements conformationnels des RTKs entraînent la fixation de PI3K sur leurs domaines intracellulaires ce qui induit son activation. Une fois activé, PI3K transforme PIP2 en PIP3. Ce dernier se lie à Akt et l'entraîne à la membrane plasmique où il sera phosphorylé aux résidus Thr308 et Ser473 par PDK-1 et mTORC2 respectivement, et activé. L'activation d'Akt conduit à une cascade de phosphorylations et à l'activation de diverses protéines impliquées dans la croissance cellulaire, l'angiogenèse et l'apoptose, dont mTOR et son partenaire mTORC1(99). L'hyper-activation de la voie PI3K/Akt joue un rôle central dans la survie cellulaire, la croissance, l'angiogenèse et le métabolisme cellulaire des GBMs.

La voie RAS/MAPK est également une voie impliquée dans la régulation de la prolifération et la survie cellulaire, et dans l'angiogenèse. De manière similaire à la voie précédente, cette voie est activée par la fixation de ligands sur les récepteurs RTKs, ce qui entraîne la transformation du GDP en GTP, le recrutement à la membrane de Raf et son activation, puis la phosphorylation de Erk (=MAPK-Kinase).

Inhibition de l'EGFR

L'EGFR et son mutant EGFRvIII font l'objet de nombreuses recherches. Plusieurs stratégies sont proposées pour les inhiber, dont des anticorps monoclonaux, des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase et des vaccins anti-tumoraux.

Parmi les anticorps monoclonaux, le Cetuximab et le Nimotuzumab n'ont pas montré de bénéfice clinique chez les patients atteints de GBMs récurrents ou nouvellement diagnostiqués, seuls ou en association à d'autres chimiothérapies (100).

Les inhibiteurs d'activité tyrosine kinase ont également montré des résultats décevants avec l'Erlotinib, associé au Bevacizumab ou au Sorafenib (101–103).

- Le **Géfitinib** est un inhibiteur réversible et spécifique de l'EGFR. Associé à la RT chez les patients nouvellement diagnostiqués, l'OS n'est pas améliorée par rapport à la RT seule (104), de même en adjuvant après la RT (105).
- L'**Afatinib**, un inhibiteur irréversible, n'a pas montré de meilleurs résultats que le TMZ dans une étude de phase I. Néanmoins, il a été observé une augmentation de PFS chez les patients présentant une tumeur EGFR positive, comparée à une tumeur EGFR négative (106).
- Le **Lapatinib** n'a également pas apporté de gain thérapeutique chez les patients atteints de GBMs récurrents dans une étude de phase II (107). Ce composé associé au TMZ et à la RT, chez les patients nouvellement diagnostiqués, est en cours d'essais cliniques ([NCT01591577](#)) (108).
- Le **Vandetanib**, un inhibiteur mixte de l'EGFR et le VEGFR2, a mis en évidence des résultats précliniques encourageants. Il a été observé une diminution de la taille de la tumeur de xénogreffes, avec l'association du Vandetanib et du TMZ comparé au TMZ seul (109). Cependant, l'ajout du Vandetanib au protocole Stupp ne prolonge pas la survie de patients nouvellement diagnostiqués ([NCT00441142](#)) (110).

Par ailleurs, de nouvelles stratégies thérapeutiques visent à induire, via des vaccins anti-tumoraux, une immunité anti-tumorale, associée à une mémoire immunologique, tout en épargnant les cellules cérébrales saines (111). Le Rindopepimut (CDX-110) est un vaccin contenant le peptide EGFRvIII conjugué à un adjuvant (KLH, Keyhole limpet hemocyanin). Il a été observé une diminution de l'expression de l'EGFRvIII après son administration dans les GBMs récurrents, confirmant l'efficacité de la vaccination. Le Rindopepimut a apporté un gain de survie globale et sans progression chez des patients nouvellement diagnostiqués dans une étude de phase II (OS=21,8 mois; PFS=9,2 mois) ([NCT00458601](#)) (112) et une régression tumorale en association au Bevacizumab dans les GBMs récurrents. Néanmoins, associé au protocole Stupp chez les patients nouvellement diagnostiqués, aucun gain de survie n'a été mis en évidence dans une étude de phase III (PFS= 8,0 vs 7,4 mois ; OS=20,1 vs 20,0) (113).

Enfin une nouvelle approche propose de former des récepteurs antigéniques chimériques issus de cellules NK (CAR-Engineered NK cells). L'un d'eux cible de manière simultanée l'EGFR et l'EGFRvIII. Administré en intracrânien dans deux modèles murins, ce composé induit une cytotoxicité et une production d'IFN γ . Des résultats similaires ciblant l'EGFR et l'EGFRvIII ont été également obtenus dans une autre étude préclinique (114).

Inhibition de PDGFR

De manière similaire à l'EGFR, le PDGFR est également impliqué dans l'activation de la voie PI3K. Etant surexprimé ou amplifié dans 75% des GBMs, le PDGFR est une cible thérapeutique potentielle. Il n'existe pas d'inhibiteur spécifique du PDGFR, mais des inhibiteurs ciblant plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase (c-kit, EPHA2, RET ...) et de protéines kinase (c-Abl, BCR-Abl, SRC, FLT3...) (**Tableau 1**).

- L'**Imatinib** a été le premier inhibiteur ciblant **PDGFR α / β** , c-Abl, c-kit ... Bien que n'ayant pas montré de bénéfice clinique en association à l'hydroxyurée (115), l'Imatinib est en cours d'essais cliniques.
- Le **Dasatinib**, un inhibiteur de **PDGFR β** , EPHA2, BCR-Abl, c-kit et SRC, s'est montré inefficace dans une étude de phase II, chez des patients atteints de GBMs récurrents (116).
- Le **Tandutinib**, inhibiteur de **PDGFR β** , FLT3, c-Kit, a été testé dans une étude de phase II, associé au Bevacizumab chez des patients atteints de GBMs récurrents. Les résultats ont indiqué que cette association ne permet pas d'augmenter la survie des patients (OS: 11 mois et PFS: 4,1mois) (**NCT00667394**) (117). Une autre étude de phase II a mis en évidence des résultats similaires et a été arrêtée (118).
- Le **Sunitinib**, un inhibiteur de **PDGFR α / β** , c-kit, bFGF, **VEGFR1/2/3**, FLT3 et RET, a également apporté des résultats décevants. Une étude de phase II n'a pas montré de bénéfice clinique du Sunitinib chez les patients atteints de GBMs récurrents, comparé au Bevacizumab ou aux chimiothérapies conventionnelles (119). Des résultats similaires ont été observés chez des patients nouvellement diagnostiqués non opérables (120).

Inhibition de mTOR

Une autre approche vise à cibler l'un des effecteurs d'Akt : mTOR. Il existe plusieurs inhibiteurs de mTOR.

Parmi ceux-ci :

- Le **Temsirolimus** fait l'objet de nombreux essais cliniques. Deux études de phase II n'ont pas montré de bénéfices cliniques lorsqu'il est associé au Bevacizumab (121) ou au Sorafenib (NCT00800917) (122). Plus récemment, une étude de phase II, comparant l'association du Temsirolimus à la RT, chez les patients nouvellement diagnostiqués, n'a pas montré de différence de survie comparé au protocole Stupp (NCT01019434) (123).
- Le **Sirolimus** (Rapamycine) a révélé des résultats précliniques prometteurs, (124). Malgré ces résultats, le Sirolimus associé à l'Erlotinib n'est pas efficace en cas de récurrence (NCT0062243) (125).
- L'**Everolimus** : de manière similaire au Sirolimus, le traitement de cellules de GBMs par la RT/TMZ et l'Everolimus induit une diminution de leur croissance *in vitro*. En revanche, en clinique, une étude de phase II a mis en évidence que l'administration de l'Everolimus avant le protocole Stupp chez les patients nouvellement diagnostiqués n'apporte pas de bénéfice clinique comparé au protocole standard (126).
- Le **Ridafrolimus** est actuellement en cours d'une étude de phase I (NCT00087451).

Il a également été proposé d'inhiber les deux partenaires de mTOR (127). L'AZD2014, un inhibiteur de mTORC1 et mTORC2 est en cours d'essai clinique de phase I/II.

Inhibition de PI3K

Plusieurs pan-inhibiteurs de PI3K ont montré des résultats précliniques *in vitro* et *in vivo* prometteurs, dont certains sont en cours d'essais cliniques :

- le **Pictilisib** est un inhibiteur des isoformes α/δ de PI3K. Associé à la RT et au TMZ, il a une action pro-apoptotique et diminue les capacités de migration de trois lignées de cellules de GBMs. *In vivo*, il augmente la sensibilité à la radiothérapie et au TMZ (128). Une étude de phase I/II est en cours (NCT02430363)
- Le **Buparlisib** (BKM120) inhibe les capacités invasives *in vitro* et diminue l'envahissement tumoral *in vivo* (129,130). Trois études de phase I/II sont en cours (NCT01349660) (NCT0193436) (NCT01339052).
- Le **Sonolisib** (PX-866), un inhibiteur des isoformes α , δ et γ diminue les capacités invasives et angiogéniques des cellules de GBMs *in vitro*. *In vivo*, il a été observé une diminution de la croissance tumorale et une augmentation de la survie de souris xénotreffées (131). Une étude de phase II n'a pas montré de bénéfice clinique dans le cas de GBMs récurrents (132) (NCT01259869).

Des inhibiteurs de PI3K et mTOR sont également proposés, parmi lesquels le Voxelisib qui n'a pas montré en phase I un gain de survie associé au TMZ (NCT00704080) (133).

Inhibition de Ras-MAPK

La deuxième voie activée par les récepteurs à activité tyrosine kinase et impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire, Ras-MAPK, est également une voie pouvant faire l'objet de cibles thérapeutiques.

- le **TLN-4601**, n'a pas montré d'efficacité thérapeutique en monothérapie dans une étude de phase II en cas de récurrence (134).
- le **Sorafenib** est un inhibiteur Raf-1 et p38, impliqué dans les voies Ras-MAPK, VEGFR, c-kit et PDGFR. Le Sorafenib augmente l'effet pro-apoptotique du TMZ dans les cellules de GBMs (135). En ce qui concerne les essais cliniques, l'association du Sorafenib et du TMZ dans les GBMs récurrents semble apporter un gain de survie (136). En revanche, associé au Bevacizumab (137), à l'Erlotinib (103) et au Temsirolimus (122), il n'apporte pas de bénéfice clinique. Des résultats décevants ont également été observés chez les patients nouvellement diagnostiqués, traités par le protocole Stupp associé au Sorafenib en thérapie adjuvante (138).

Plus récemment, deux inhibiteurs de la voie Ras-MAPK font l'objet d'essais cliniques de phase II: le LY2228820 et l'Atorvastatine. Une étude préclinique a montré que l'Atorvastatine potentialise les effets du TMZ (139).

ii. Cibler l'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus complexe régulé par de multiples voies de signalisation. En raison d'une forte prolifération tumorale, l'accès à l'oxygène et aux nutriments diminue dans certaines régions de la tumeur, rendant ces zones hypoxiques et nécrosées. L'angiogenèse apparaît dès les premiers stades du développement tumoral. Les thérapies anti-angiogéniques agissent en entraînant la diminution des vaisseaux tumoraux, ce qui permet de limiter la croissance tumorale.

Cibler le VEGF

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), une protéine nécessaire dans l'angiogenèse et surexprimée dans les GBMs, est une cible thérapeutique potentielle (140).

- Bevacizumab :

La FDA a approuvé le Bevacizumab, un anticorps anti-VEGF, en traitement de première ligne dans les GBMs récurrents, seul ou associé à l'irinotécan (inhibiteur de l'ADN topoisomérase I) depuis 2009. Cette molécule a apporté une amélioration de la PFS et de la qualité de vie, mais sans bénéfice sur la survie globale des patients (141,142). A la suite de cette étude, plusieurs essais cliniques n'ont pas montré d'efficacité clinique du Bevacizumab.

Dans les GBM récurrents, une étude de phase II, associant le Bevacizumab et TMZ n'a pas montré de gain de survie comparé au Bevacizumab seul (143). Des résultats similaires ont été observés dans plusieurs autres études de phase II lors de l'association du Bevacizumab au Temozolomide (121), à la Carboplatine et à l'Irinotécan (144). Seule l'association du Bevacizumab et de la Lomustine semble apporter des résultats encourageants en termes de survie et de qualité de vie (145,146).

Plus récemment, l'efficacité du Bevacizumab a été analysée chez des patients soumis à une deuxième irradiation. Il a été observé une survie plus longue lors de l'association d'une ré-irradiation et du Bevacizumab suivie d'une poursuite de traitement du Bevacizumab (OS=34 mois ; PFS=8mois), comparé aux patients traités par l'association de l'Irinotécan et du Bevacizumab (OS=23 mois ; PFS=6,6 mois) ou d'une ré-irradiation et du Bevacizumab sans poursuite de traitement (OS=30,2 mois ; PFS=6,6 mois) (147).

Dans les GBMs nouvellement diagnostiqués, plusieurs études n'ont pas mis en évidence de bénéfice du Bevacizumab associé ou non au traitement conventionnel (148–151). Seule une étude de phase II, analysant l'association de la RT et du Bevacizumab suivie d'une thérapie adjuvante, combinant le Bevacizumab et l'Irinotécan, a montré une amélioration de la survie de patients, ayant un statut MGMT non méthylé, comparé au protocole Stupp (152). Il a également été montré un gain de survie lors de l'association du TMZ au Bevacizumab, chez les patients ne pouvant être opérés (153).

- Autres molécules ciblant le VEGF

D'autres inhibiteurs du VEGF ont été proposés dans les GBMs récurrents. Le **Pazopanib** et le **Nintedanib** n'ont pas montré de gain thérapeutique en monothérapie (154,155). Le **Cediranib** en monothérapie a apporté des résultats encourageants (156). En revanche, associé à la Lomustine, il n'a pas entraîné de bénéfice thérapeutique. Récemment, une amélioration de la survie des patients atteints de GBMs récurrents a été observée lors de l'association de la Cediranib et du Gefitinib (157).

En ce qui concerne les patients nouvellement diagnostiqués, le **Vandetanib** a montré *in vitro* des résultats prometteurs, dont la diminution de 94% de la taille de tumeurs de xénogreffes de souris, en association avec le TMZ (109). Néanmoins, associé au protocole Stupp, aucun gain de survie n'a été observé (110). Enfin, le **Dovitinib**, un inhibiteur de FGFR, PDGFR β , VEGFR et c-kit, actuellement en cours d'essai clinique, sensibilise les cellules de GBMs au TMZ *in vitro* (158,159).

Les voies secondaires de l'angiogenèse

L'échec des thérapies anti-VEGF s'explique par des mécanismes compensatoires, via l'activation d'autres facteurs impliqués dans l'angiogenèse, en réponse à une inhibition du VEGF. Parmi celles-ci nous détaillerons les voies secondaires c-Met, PlGF, l'endogline et les intégrines.

- **L'Onartuzumab**, un anticorps monoclonal ciblant c-Met, a montré une diminution de la croissance de cellules de GBMs. Associé au Bevacizumab dans les GBMs récurrents, l'Ornatuzumab apporte une PFS similaire au Bevacizumab seul. Néanmoins, cette étude a montré un gain de survie chez les patients ayant une expression élevée de HFG ou un statut MGMT non méthylé (160).
- Le **Rilotumumab** (AMG 102), un anticorps anti-HGF n'a pas montré de gain thérapeutique, en monothérapie, dans une étude de phase II chez les patients atteints de GBMs récurrents (161).
- **L'Aflibercept** est une protéine de fusion recombinante ciblant les facteurs VEGF α et PlGF. En monothérapie ou en association au Bevacizumab dans les GBMs récurrents, aucun gain de survie n'a été observé (162,163).
- Le **TCR105**, est un anticorps chimérique ciblant l'endogline, qui potentialise les effets du Bevacizumab *in vivo*. Cette association est actuellement étudiée en étude clinique de phase I et a montré une activité anti-tumorale durable dans les GBMs récurrents (NCT01332721) (164).
- Le **Cilengitide**, un inhibiteur de $\alpha\beta 3$ et $\alpha\beta 5$, associé au protocole Stupp chez les patients nouvellement diagnostiqués a montré des résultats prometteurs dans une étude de phase II (165,166). Néanmoins, dans deux études cliniques, cette association n'a pas montré de gain de survie chez les patients à statut MGMT méthylé (167) et non méthylé (168). Le Cilengitide sera discuté dans la Partie III.

La prise en charge des patients atteints de GBM est un véritable enjeu en oncologie. Le protocole Stupp a été une «révolution» dans la prise en charge du GBM, apportant aux patients une survie de 14 mois comparée à 12 mois. Depuis, aucun protocole n'a permis d'améliorer leur espérance de vie. Le premier obstacle expliquant la difficulté à trouver un traitement efficace a été expliqué par l'accès difficile à la masse tumorale. Les nouvelles approches proposées, dont le Giadel[®], ou l'administration par convection, semblent contrer ce problème. De plus, de nombreuses études pré-cliniques ont proposé des marqueurs ou protéines impliqués dans l'agressivité du GBM (migration/prolifération cellulaire, angiogenèse), faisant d'eux des cibles thérapeutiques prometteuses. Leur inhibition *in vitro* et *in vivo* apportent des résultats encourageants. Malheureusement, comme nous l'avons décrit dans le paragraphe précédent, les thérapies ciblées n'apportent aucun gain clinique chez les patients atteints de GBMs récurrents ou nouvellement diagnostiqués avec un grand nombre de cibles envisagées.

Les principales thérapies ciblées testées chez les patients atteints de GBM sont représentées sur la **Figure 2**.

Les nouvelles connaissances moléculaires et génomiques ont mis en évidence une nouvelle difficulté : l'hétérogénéité du GBM. En effet, il a été observé une hétérogénéité inter- et intra-tumorale, avec des zones de tumeur ayant des expressions protéiques différentes.

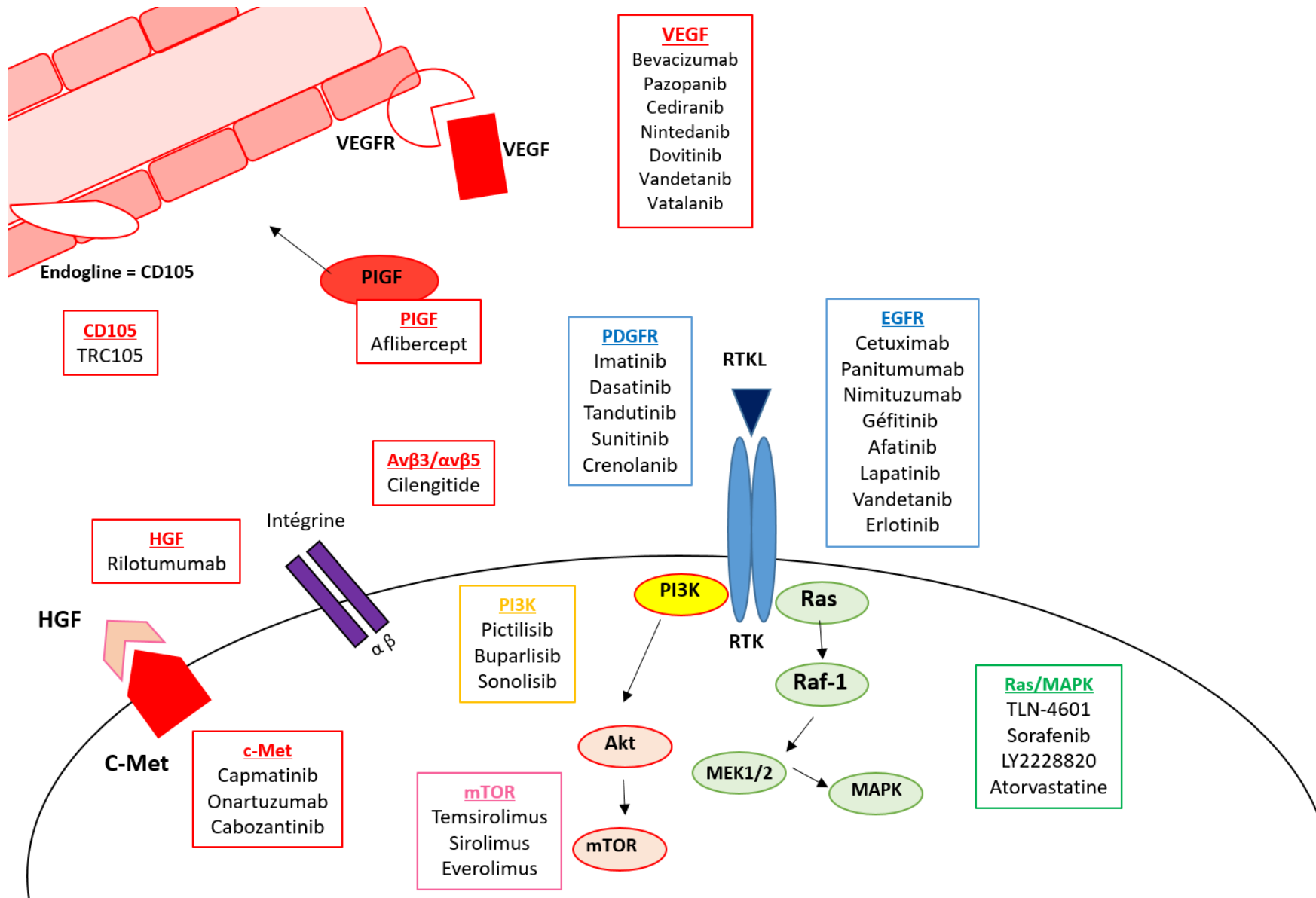


Figure 2 - Représentation schématique des principales thérapies ciblées dans la prise en charge du GBM. Adapté de Arko et al., 2010 (169).

V. L'hétérogénéité du GBM

Le terme « multiforme » a été proposé suite à la description de différents aspects histologiques de biopsie (densité cellulaire, pléomorphisme nucléaire, vascularisation ou nécrose) selon les patients (170–172). Basé sur 206 échantillons de GBMs de patients, le TCGA a généré un catalogue des différentes anomalies génomiques impliquées dans la gliomagenèse. Plusieurs études ont mis en évidence l'existence de différents sous-types de GBMs, se traduisant par une variabilité inter-patient et inter-tumorale (173,174).

1. Hétérogénéité inter-tumorale

La classification de Verhaak (174), la plus reconnue par la communauté scientifique, décrit 4 sous-types de GBMs **Figure 3**:

Le **GBM classique** est caractérisé par une amplification du chromosome 7 et de l'EGFR, une perte du chromosome 10 et une délétion homozygote de 9p21.3 contenant le gène ciblant CDKN2A. Une expression élevée des marqueurs de cellules souches et de précurseurs neuraux (nestin, notch, SHH) a été notée, tandis qu'aucune altération des gènes TP53, NF1, PDGFR α et IDH1 n'a été observée. Ce sous-type est enrichi en marqueurs astrocytaires.

Le **GBM mésenchymal** présente des mutations ou délétions sur les gènes NF1 et PTEN, induisant leur expression faible. Les marqueurs d'inflammation et de remodelage tissulaire (CHI3L1, MET), CD44, les protéines de la famille du TNF, NF-kB et MERF sont fortement exprimés. Il est également associé à une signature astrocytaire et à une infiltration de cellules immunitaires dont les macrophages ou les cellules microgliales (175,176).

Le **GBM neural** est caractérisé par l'expression de marqueurs du cerveau normal (NEFL, GABRA1, SYT1 et SLC12A5).

Le **GBM proneural** est associé à une amplification de PDGFR α et une mutation sur IDH1 et TP53. La présence de gènes oligodendrocytaires (NKX2-2, OLIG2 et Sox2) est également fréquemment observée. Les patients jeunes sont plus souvent atteints par ce sous-type, et ont une tendance à avoir une survie plus élevée. Le sous-type proneural est classé en deux sous-groupes selon la méthylation des îlots CpGs de l'ADN. L'étude de Ozawa et al., 2014 (177) a mis en évidence une origine différente selon les GBMs proneuraux G-CIMP et non G-CIMP. L'amplification du chromosome 7 et la perte du chromosome 10 sont observées dans 86% et 90% des GBMs non G-CIMP, indépendamment du sous-type, et dans 26% et 24% dans les GBMs G-CIMP. Ces données suggèrent une origine commune aux GBMs mésenchymaux, proneuraux, neuraux et classiques non G-CIMP, tandis que les GBMs proneuraux G-CIMP seraient issus de la progression de gliomes de bas grade (178).

Bien que la classification de Verhaak ait mis en évidence une tendance à un meilleur pronostic pour les patients atteints de GBM proneural, un traitement agressif ne permet pas d'augmenter leur survie. Plus récemment, une étude a analysé le transcriptome de cellules et tissus issus de GBMs IDHwt, et n'a différencié

que trois sous-types: le GBM proneural, mésenchymal et classique ; le sous-type neural étant considéré comme du tissu du microenvironnement. Dans cette nouvelle classification, la survie des patients atteints de GBM mésenchymal est significativement plus faible. Elle est de 11,5 mois, 14,7 mois et 17 mois pour les patients atteints de GBM mésenchymal, classique et proneural respectivement (175).

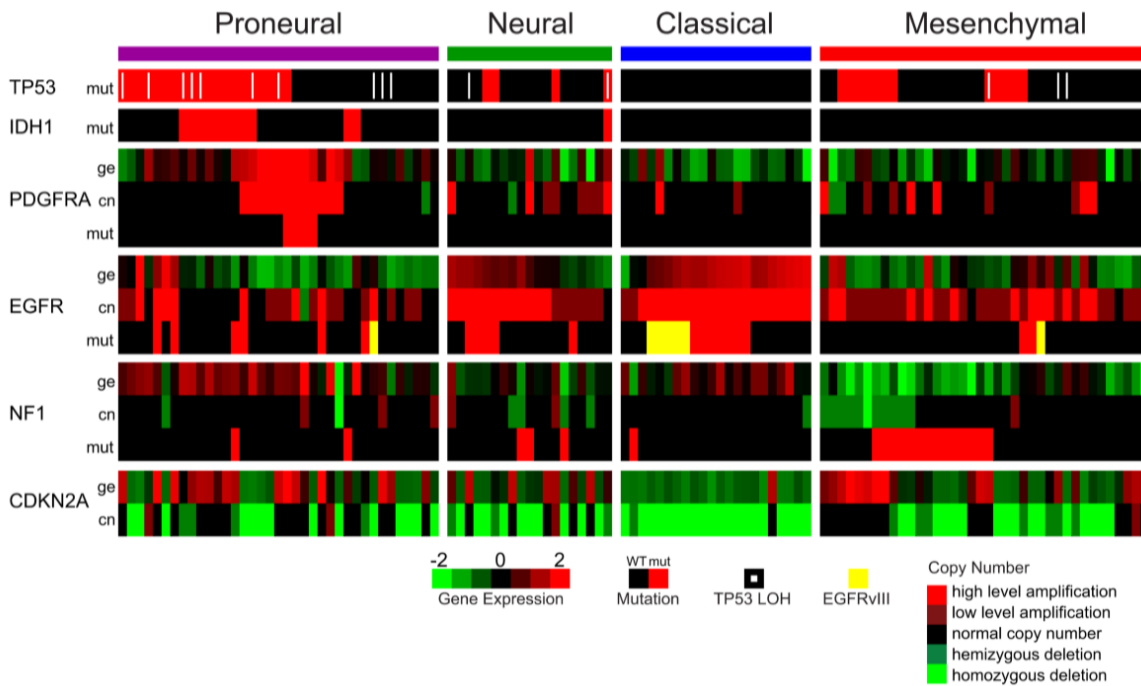


Figure 3 - Hétérogénéité inter-tumorale du GBM. La classification de Verhaak décrit 4 sous-types de GBM selon différentes altérations génomiques (174).

Il a été proposé une classification immunohistologique des GBMs (179) différenciant 4 sous-types : le GBM-précurseur oligodendrocyte (OPC), le GBM oligodendrocyte différencié (DOC), le GBM mésenchymal astrocytaire (AsMes) et le GBM mixte (**Tableau 2**).

- Le **GBM OPC** est caractérisé par la présence des marqueurs OLIG2, PDGFR α et par la présence de la mutation IDH-R132H. De par l'expression d'OLIG2 et Sox10, ce sous-type aurait pour origine une cellule souche neurale.
- Le **GBM AsMes** est associé à une sous régulation de NF1, de CD44 et de la GFAP. Les patients atteints par ce sous-type ont une survie plus faible.
- Le **GBM DOC** est similaire au sous-type OPC, notamment avec l'expression d'OLIG2. Il présente également la perte hétérozygote des bras 1p/19q et la délétion homo ou hémizygotique de CDKN2A.
- Le **GBM mixte** présente des caractéristiques du sous-type OPC et AsMes.

	GBM DOC	GBM OPC	GBM AsMes	GBM mixte
Expression protéique par immunohistochimie	Olig2	PDGFR α , p53, p16	CD44, GFAP, nestin	P16, EGFR, p53, Notch
Altération génomique	Codélétion 1p/19q	IDH1 mutée, TP53 muté, MGMT méthylé	Amplification EGFR	Amplification EGFR
Morphologie cellulaire	Cellules rondes et petites. Noyau avec une chromatine diffuse et fine	Cellules pléomorphes et larges. Noyau irrégulier avec une chromatine vésiculaire	Cellules « entrelacées ». Noyau avec chromatine vésiculaire ouverte	Cellules de tailles variables et dispersées. Cytoplasme éosinophile.
Pronostic	Faible	Intermédiaire	Mauvais	Bon
Comparaison avec (Verhaak, 2010)	Classique	Proneural/Neural	Mésenchymal	Classique

Tableau 2 - Classification immunohistochimique des 4 sous-types de GBMs. Adapté de Ranjit et al., 2015 (179).

La classification de Verhaak a permis de caractériser, d'un point de vue moléculaire, différents sous-types de GBM, démontrant que chaque patient est atteint de GBM de profils génétiques différents. Ces nouvelles données n'ont pas apporté, pour le moment, d'amélioration clinique en termes de prise en charge ou de survie (171). L'une des principales limites de la classification de Verhaak repose sur des données génomiques réalisées à partir d'un seul fragment, pour chaque GBM, présent dans la masse tumorale. Ainsi, la classification de Verhaak ne tient compte ni de différents fragments de la même tumeur, ni des cellules ayant infiltré le parenchyme sain.

Par ailleurs, la présence au sein d'une même tumeur de différents foyers (des zones de vascularisation, de nécrose et d'hypoxie), de différents types cellulaires (des cellules tumorales ayant des stades de différenciation différents, des cellules non tumorales telles que des cellules du système immunitaire, des cellules endothéliales...) laisse penser que l'hétérogénéité du GBM n'est pas juste inter-tumorale, mais aussi intra-tumorale, pour un même patient (180). En effet, la présence de différentes altérations moléculaires, chez un même patient atteint de GBM, est de 0,5 à 35% (181).

2. Hétérogénéité intra-tumorale

a) Spatiale

L'hétérogénéité intra-tumorale a été mise en évidence par l'analyse de différents fragments tumoraux au sein de la même tumeur (182). A partir de 38 fragments, prélevés lors de la résection chirurgicale de 9 patients, l'équipe de Sottoriva et al., 2013 (183) a mis en évidence la présence de différents sous-types de GBMs au sein de la même tumeur (analyse du nombre de copies ou d'expressions de gènes (**Figure 4**). Ces résultats ont été confirmés par l'analyse transcriptomique de cellules uniques (430 cellules isolées et issues de 5 GBMs) (184). Selon cette étude, tous les GBMs présentent des foyers proneuraux, plus ou moins associés à d'autres sous-types. Plus un GBM est composé de cellules appartenant à différents sous-types, plus le pronostic est faible. Ainsi, le gain de survie dans le GBM proneural, observé par l'analyse d'un seul fragment tumoral par l'étude de Verhaak dépend des différents foyers qui l'entourent.

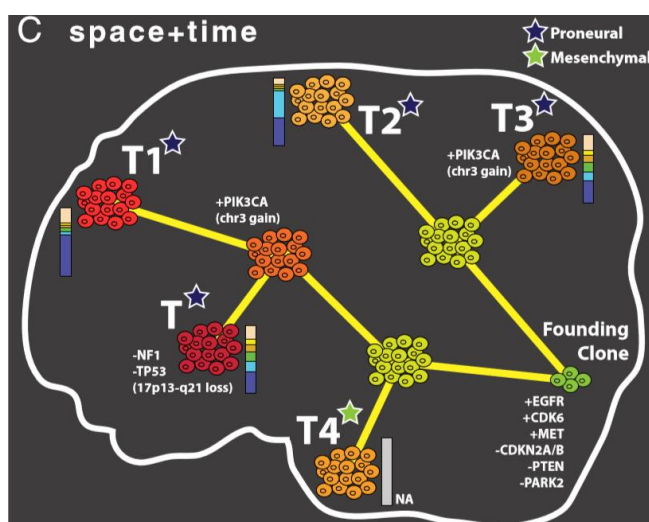


Figure 4 - Hétérogénéité intra-tumorale du GBM. L'accumulation de nouvelles altérations moléculaires dans différents foyers d'un GBM (183)

Par ailleurs, l'hétérogénéité intra-tumorale n'est pas limitée à la tumeur, mais elle est également présente dans des zones adjacentes, notamment dans :

- La **zone péri-tumorale** : 90% des récurrences apparaissent dans cette région (185). Selon les données histologiques, 1/3 de ce foyer est composé de cellules tumorales. L'analyse transcriptomique des cellules de la zone péri-tumorale et de la masse tumorale a montré un gradient d'altérations partant de la tumeur. Plus les cellules sont éloignées du GBM, moins elles partagent de mutations communes (183). Par ailleurs, l'expression de gènes de survie est élevée dans la zone péri-tumorale, tandis que des gènes anti-apoptotiques sont exprimés dans les cellules de la masse tumorale (186). En plus de présenter une hétérogénéité génomique, les deux types cellulaires diffèrent d'un point de vue phénotypique : les cellules présentes dans la zone péri-tumorale ont une capacité de prolifération et d'invasion augmentée et une sensibilité aux thérapies différente (187). De manière intéressante, la zone péri-tumorale présente une signature proneurale et neurale alors que la masse tumorale est associée à un profil mésenchymal ou classique (182,185,188).

- La **zone subépendymale (SEZ)** : physiologiquement, cette région est le siège de la neurogenèse et est composée de cellules souches neurales. Chez les patients atteints de GBM, la SEZ est composée de 65% de cellules tumorales résiduelles et est associée à un nombre de récurrence élevé (189,190). La comparaison de l'ARN de fragments tumoraux issus de la SEZ et de la masse tumorale a montré, chez 6 patients sur 9, que les deux échantillons ne correspondent pas aux mêmes sous-types ; la SEZ est caractérisée par une signature mésenchymale (7/9) ou classique (2/9) et la masse tumorale sans profil spécifique (190) (**Tableau 3**).

Sample	Proneural	Classical	Mesenchymal	Neural
sp41			T, SEZ	
sp42	T		SEZ	
sp49		T, SEZ		
sp52			SEZ	T
sp54	T		SEZ	
sp55		SEZ	T	
sp56		T	SEZ	
sp57			T, SEZ	
r4		T	SEZ	

Tableau 3 - Hétérogénéité de la masse tumorale et de la zone subépendymale. Les échantillons issus de la masse tumorale (T) et de la zone subépendymale (SEZ), de chaque patient, appartiennent à différents sous-types de GBMs (190).

b) Temporelle

Une hétérogénéité temporelle a également été mise en évidence via l'expansion et la régression de sous-populations cellulaires, induisant la formation d'une récurrence de profil moléculaire différent à la tumeur primaire (191). Bien que l'analyse de Verhaak et al.,2010 (174) n'ait pas montré de différence de sous-type entre un GBM primaire et sa récurrence, une étude a observé que le profil transcriptomique reste stable dans 65%, 51% et 41% des GBMs de profil mésenchymal, classique et proneural, respectivement (175). La stabilité génomique du GBM mésenchymal s'explique par son caractère agressif et résistant aux thérapies. Les GBMs proneuraux et classiques étant plus sensibles, ils sont sujets à des mutations et à l'acquisition de gènes mésenchymaux (175). Par ailleurs, les thérapies sont également responsables du changement génomique du GBM.

De manière intéressante, le séquençage du génome entier de tumeur, primaire et récurrente, a montré que plus la récurrence est éloignée du site primaire, plus les mutations sont différentes de la tumeur initiale (192). Ces observations suggèrent que les cellules ayant migré se seraient séparées du GBM et auraient une évolution différente et indépendante de la masse tumorale (193). Ainsi, le profil génomique de la récurrence dépendrait donc de ce groupe de cellules ayant migré. Plusieurs modèles expliquent les différents types de récurrences (**Figure 5**):

- Le **modèle divergent** : il propose l'existence d'une cellule d'origine commune, résistante aux thérapies. Bien que le traitement initial permette d'éliminer toutes les cellules tumorales, la cellule d'origine accumule de nouvelles mutations et prolifère pour donner une récurrence. Dans ce modèle, les altérations génomiques observées dans le GBM primaire et récurrent sont très éloignées (192).

- Le **modèle linéaire**: il suggère que les thérapies éliminent la majorité des cellules tumorales, certaines survivent et continuent leur expansion jusqu'à reformer une récurrence. De nouvelles mutations s'accumulent, mais les altérations initiales sont conservées. Dans ce modèle, la récurrence présente un profil proche du GBM initial (192).
- Le **modèle compétitif**: certaines cellules, bien que dominantes dans le GBM primaire, ne résistent pas aux thérapies. Des sous-populations peuvent proliférer et former une récurrence. Dans ce modèle, la récurrence et la tumeur d'origine ont un profil génomique également différent (172,194,195).

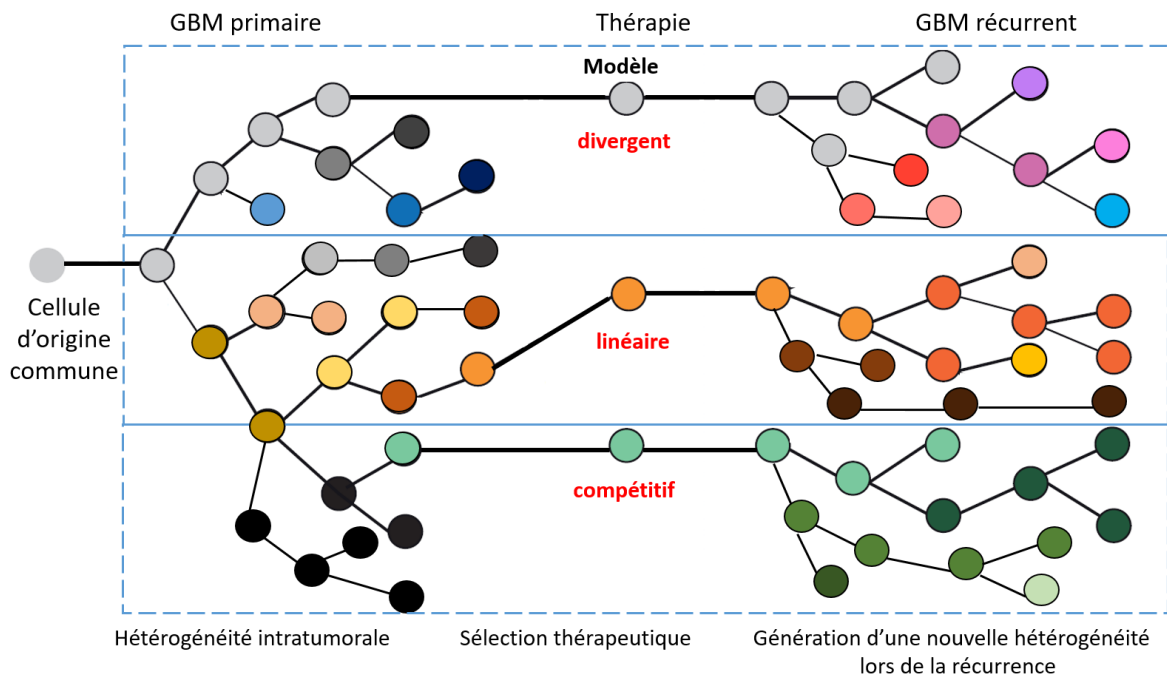


Figure 5 - L'hétérogénéité intra-tumorale temporelle. L'administration de thérapie de GBM primaire entraîne la sélection de nouveaux clones. Dans le modèle divergent, la cellule d'origine forme une tumeur récurrente de profil génomique extrêmement différent de la tumeur primaire. Dans le modèle linéaire, un clone résiste et continue de proliférer aux cours de la récurrence. Dans le modèle compétitif, une sous-population cellulaire résiste et forme un nouveau GBM récurrent. Adapté de Qazi et al., 2017 (180).

3. Origine de l'hétérogénéité

Il existe différentes hypothèses expliquant l'hétérogénéité (**Figure 6**).

a) Clonale

L'évolution clonale ou stochastique, le premier modèle proposé, implique l'existence d'une cellule, quel que soit son stade de différenciation, dont l'acquisition d'altérations génétiques ou épigénétiques spécifiques lui apporte un avantage de croissance et de survie. Différents clones tumoraux peuvent être formés par la cellule initiale, de manière précoce ou tardive, et suivent une évolution parallèle et indépendante (170,181,196,197). Dans ce modèle, chaque nouveau clone devient capable de produire de nouveaux clones. Ainsi, les différents profils génétiques des différents clones seraient responsables de l'hétérogénéité intra-tumorale. Cette théorie propose d'imaginer le cancer comme un arbre, où le tronc représente l'ensemble des cellules tumorales qui expriment les mutations initiales. Les branches correspondent aux différents clones qui ont accumulé de manière aléatoire de nouvelles mutations, suite à la pression thérapeutique ou

à l'environnement (198) (**Figure 6**). L'analyse de Patel et al., 2014 (184) a montré que les cellules isolées de la même tumeur ont des altérations génomiques plus ou moins similaires, et sont plus proches les unes des autres, comparées à des cellules d'une autre tumeur. Ces résultats confirment une origine commune aux différentes cellules présentes dans la masse de la tumeur (183,184).

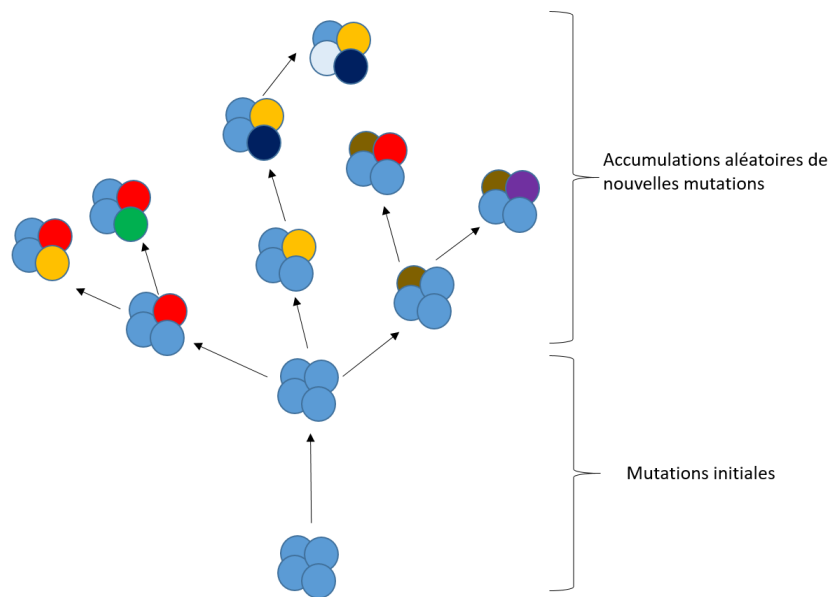


Figure 6 - Hétérogénéité intra-tumorale selon le modèle clonal. Les mutations partagées par toutes les cellules tumorales sont issues d'un clone commun, représentant le tronc de l'arbre. Les branches représentent les différentes mutations, acquises lors de la progression tumorale, et sont présentes dans un sous-ensemble des cellules. Adapté selon Inda et al., 2014 (198).

Dans ce modèle, les cellules initiales sont caractérisées par des mutations clonales ou « drivers » à l'opposé des mutations subclonales :

- **Mutations clonales ou « drivers » :** il s'agit d'altérations génomiques apparaissant aux premiers stades tumoraux, voire avant la gliomagenèse. Elles sont impliquées dans la transformation maligne et la croissance tumorale (198). Elles sont rares et présentes dans toutes les cellules du GBM initial et récurrent (183,194,199).
- **Mutations subclonales :** celles-ci apparaissent lors de la progression tumorale et sont partagées par quelques populations cellulaires. Les mutations subclonales sont rarement retrouvées de manière concomitante dans le GBM primaire et récurrent (194). Elles n'apportent pas de potentiel de croissance mais sont impliquées dans les différences de sensibilité aux thérapies et de survie (200). A noter, certaines mutations subclonales peuvent devenir « drivers », si elles entraînent un avantage de survie ou de prolifération après traitement (180,198). A titre d'exemple, les travaux de Nickel et al., 2012 (191) ont montré chez un patient atteint de GBM, que la moitié des cellules de la tumeur primaire présente la perte de PTEN, suggérant son implication dans l'initiation tumorale. Dans l'autre moitié, un petit foyer cellulaire est caractérisé par une mutation sur PIK3CA sans délétion de PTEN. Après traitement par le protocole Stupp, aucune cellule déléetée pour PTEN n'a été observée, en revanche, l'étude a mis en évidence l'expansion d'une population cellulaire présentant une mutation sur PIK3CA.

Il est possible d'établir le temps d'apparition des différents clones via la mesure de la distance mitotique (nombre de divisions similaires) (183). Plusieurs études proposent différents statuts génomiques de la cellule d'origine (**Tableau 4**) :

Etude	Mutations précoce	Mutation intermédiaire	Mutation tardives
1	Perte du chr 10 (PTEN) Mutation sur le promoteur de TERT	Mutation des protéines RTK/PI3K, p53 et RB1	
2	Altération sur les chr 7, 9 et 10 Amplification de l'EGFR, c-Met et CDK6 Perte de PTEN et CDKN2A/B	Amplification des chr7 et 19 (EGFR, PDGFR α) Perte du chr 10 (PTEN)	Amplification du gène GLUT9
3	Mutation de p53 et PI3KCA	Perte du chr 10 (PTEN) Gain du chr (EGFR)	
4	Expression élevée de PDGF α	Altération sur les gènes CDKN2A et TP53	Amplification de l'EGFR
5	Mutation d'IDH1, de PI3KCA et d'ATRX	Mutation TP53, NF1 et PTEN	
6	Perte d'hétérozygotie du chr 10		
7	Amplification de l'EGFR et EGFRvIII		

Tableau 4 - Evolution du profil génétique de GBM lors de phase précoce, intermédiaire et tardive. Etudes 1- (Abou-El-Ardat, 2017) ; 2- (Sottoriva, 2013) et (Ellis, 2015); 3- (Kim, 2015) ; 4- (Ozawa, 2014) ; 5- (Wang, 2016) et (Qazi, 2017) ; 6- (Patel, 2014) ; 7- (Del Vecchio, 2013). Chr (chromosome), PTEN (phosphatase and Tensin homolog), TERT (telomerase reverse transcriptase), EGFR (Epidermal Growth Factor receptor), CDK6 (cyclin-dependant kinase 6), CDKN2A/B (cyclin-dependent kinase inhibitor A A/B), PI3KCA (phosphatidylinositol-4,5-Biphosphate 3-kinase Catalytic Subunit A), PDGF α (platelet-derived growth factor α), ATRX (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked), PDGFR α (platelet-derived growth factor α receptor), NF1 (neurofibromine 1).

b) Inter coopération et microenvironnement

Le modèle de coopération est une évolution de l'hypothèse stochastique. En effet, cette dernière suggère la modification d'une cellule d'origine via des modifications génomiques héréditaires, induisant l'expansion de différents clones. L'hypothèse d'une intercoopération propose que les différentes populations cellulaires présentes dans le microenvironnement (macrophages, péricytes et cellules endothéliales...) sont capables de modifier le phénotype des cellules tumorales (172,198). A titre d'exemple, les astrocytes non tumoraux sont capables d'augmenter la capacité d'invasion des cellules de GBM (201). De manière similaire, les cellules microgliales stimulent leur invasion en sécrétant le facteur TFG β et induisent l'expression de gènes mésenchymaux, via l'activation de NF κ B (186,202). Il est intéressant de noter que la délétion de NF1, caractéristique des cellules mésenchymales, attire les cellules microgliales (175). Par ailleurs, une coopération entre cellules tumorales a également été mise en évidence par la présence d'un faible nombre de cellules exprimant l'EGFRvIII au sein d'un foyer composé principalement de cellules surexprimant l'EGFRwt. Les cellules exprimant l'EGFRvIII potentialisent la capacité de prolifération des cellules EGFRwt *in vitro* via la sécrétion de IL6 et LIF (198).

De plus, la composition du microenvironnement n'est pas homogène et diffère selon le taux d'oxygénation et de vascularisation. Ces différents foyers tumoraux suggèrent la nécessité des clones à s'adapter à leurs microenvironnements, ceci induisant de nouvelles mutations (203). En effet les travaux de Little et al., 2012

(204) ont montré que certaines cellules tumorales surexprimant les récepteurs PDGFR et EGFR ne sont pas localisées dans le même foyer tumoral (environnement fortement et peu vascularisé respectivement), démontrant l'implication du microenvironnement dans le phénotype et le génotype des cellules tumorales. Ainsi, chaque cellule tumorale progresse et s'adapte dans un microenvironnement spécifique (175,198).

c) Cellules souches ou modèle hiérarchique

La théorie des cellules souches tumorales propose une organisation hiérarchique, où l'initiation du GBM provient d'une faible proportion de cellules : les cellules souches de GBM (CSGs) (172). Ces cellules seraient responsables de l'initiation de la tumeur initiale et récurrente. Les différents profils génétiques des CSGs et les différents degrés de différenciation seraient à l'origine de l'hétérogénéité intra-tumorale (198). L'implication des CSGs dans l'hétérogénéité intra-tumorale est d'autant plus évidente que les cancers les plus hétérogènes ont des cellules souches tumorales (172,187) (voir Partie II).

La **Figure 7** représente les différentes hypothèses concernant l'hétérogénéité du GBM :

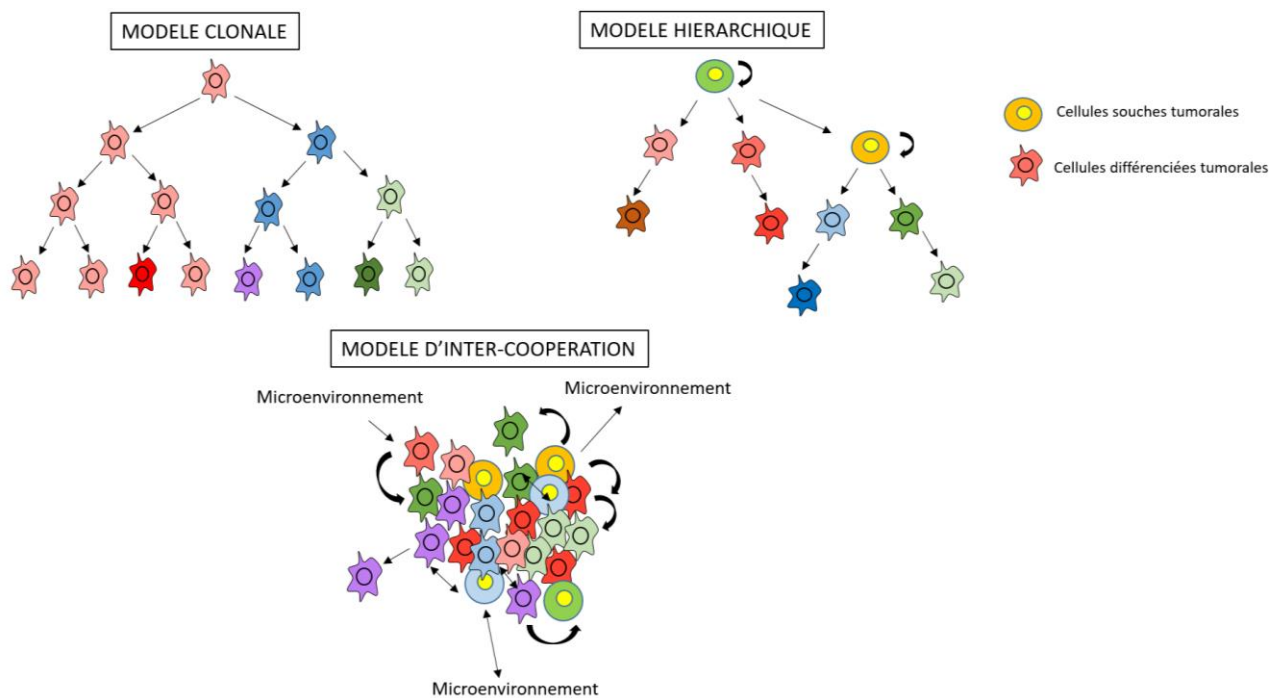


Figure 7 - Modèle d'hétérogénéité intra-tumorale du GBM. D'après le modèle clonale l'hétérogénéité peut être expliquée par l'acquisition de mutations au sein d'une cellule d'origine, de manière aléatoire et indépendante, formant plusieurs clones aux profils génétiques différents. Le modèle hiérarchique repose sur l'existence de cellules souches tumorales donnant naissance à une population de cellules tumorales différentes. Le modèle d'inter-coopération explique l'hétérogénéité intra-tumorale par les interactions entre cellules et avec le microenvironnement. Adapté de Bonavia et al., 2011 (172).

4. Implication de l'hétérogénéité

a) L'échec thérapeutique

L'hétérogénéité inter- et intra-tumorale est une nouvelle caractéristique tumorale du GBM. Ces nouvelles données expliquent l'échec de thérapies ciblées visant spécifiquement un marqueur tumoral. L'étude de Patel et al., 2014 (184) a mis en évidence une expression « mosaïque » de différents récepteurs à activité tyrosine kinase (EGFR, PDGFR α , FGFR1) et une anti-corrélation entre l'expression de l'EGFR et du PDGFR α . Ceci explique pourquoi cibler un seul RTK induit la mise en place de voies de signalisation compensatoires, impliquant un autre récepteur, et l'échec des thérapies ciblées (184,196). Il a été montré que cibler spécifiquement l'EGFRvIII entraîne l'émergence de nouveaux clones caractérisés par une amplification de l'EGFRwt (205). Enfin, l'étude de Meyer et al., 2014 (196) a mis en évidence sur 8 clones issus du même GBM une sensibilité hétérogène d'un panel de 25 drogues (**Figure 8**).

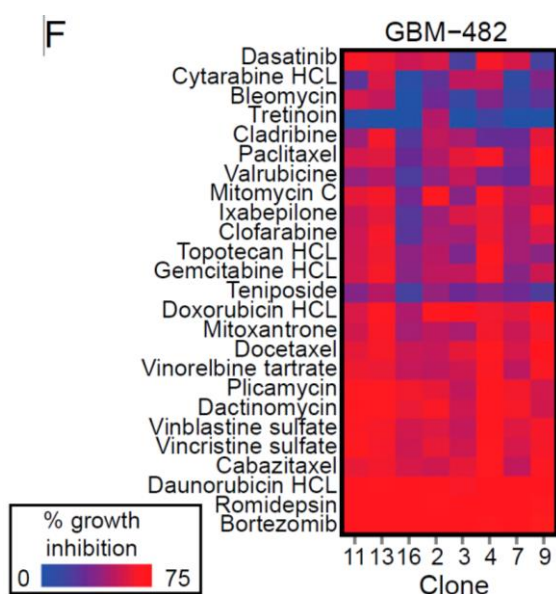


Figure 8 - Sensibilité à un panel de drogues de clones issus d'un même GBM (Meyer, 2014).

Par ailleurs l'hétérogénéité remet également en cause le choix de la prise en charge thérapeutique basée sur un seul échantillon. Une expression hétérogène de la protéine MGMT a été observée par immunohistochimie sur des tissus de patients, ce qui suggère une résistance préexistante au sein de certains clones dans la même tumeur (196,206). Ainsi, selon la localisation de biopsie prélevée et analysée, l'analyse du statut du promoteur de la MGMT ne sera pas prédictive de l'efficacité du TMZ.

De plus, la plasticité des cellules de GBMs, impliquant des changements phénotypiques et génomiques, induite par les traitements et entraînant une résistance secondaire, complexifie le caractère hétérogène.

Face à l'hétérogénéité tumorale du GBM, plusieurs stratégies thérapeutiques sont possibles :

- **Utiliser des combinaisons thérapeutiques:** l'inhibition concomitante des récepteurs EGFR et PDGFR α permet d'atténuer l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt et d'inhiber la croissance tumorale (198,207).

- **Cibler les mutations « drivers »** : il serait plus intéressant de cibler les mutations clonales, présentes dans toutes les cellules et impliquées dans la gliomagenèse, que les mutations subclonales partagées par un faible nombre de clones (180,193,198).
- **Cibler la coopération intercellulaire** : bien que certains clones soient moins tumorigènes, potentiellement plus sensibles aux thérapies, ils peuvent être des cibles intéressantes car ils potentialisent la survie de clones agressifs. De manière similaire, il est également envisagé de cibler les cellules du microenvironnement, participant à l'agressivité et à la plasticité tumorale.

b) Nouveaux modèles d'analyses

Les modèles d'étude actuels *in vitro* et *in vivo*, notamment les xénogreffes de lignées cellulaires, ont permis d'identifier les principales voies de signalisation mutées, impliquées dans la gliomagenèse et dans l'agressivité du GBM. Ces données ont pu être utiles pour proposer de nouvelles thérapies. Néanmoins, ces modèles sont aujourd'hui limités et ne représentent pas le caractère hétérogène de cette tumeur (172). La génération de souris génétiquement modifiées pour exprimer une altération précise a mis en évidence l'impact de chaque mutation sur la croissance tumorale. Malheureusement, cette méthode ne permet pas d'identifier les interdépendances entre différentes voies de signalisation dans la survie et dans la résistance aux thérapies (180). Les xénogreffes de tumeurs de patients récapitulent l'histopathologie du GBM d'origine. Ce modèle permet de mieux appréhender la réponse clinique et les interactions entre le microenvironnement et les cellules tumorales. Par ailleurs, ce modèle peut également mettre en évidence les mécanismes impliqués dans la récurrence. Il a également été proposé d'injecter en quantités connues différentes lignées tumorales, pour reconstruire l'hétérogénéité. Cette méthode permettrait de mettre en évidence l'existence de clones dominants ou résistants (172).

L'une des principales limites des modèles actuels est l'analyse d'un GBM primaire, n'ayant pas encore reçu le protocole Stupp. En effet, comme nous l'avons écrit précédemment, les GBMs primaires et récurrents ne possèdent pas les mêmes caractéristiques génomiques. Ainsi, les mutations « drivers » observées dans le GBM initial, représentant *à priori* des cibles thérapeutiques idéales, ne sont pas nécessairement exprimées dans la récurrence. C'est pourquoi un modèle de récurrence *in vivo* a été proposé (**Figure 9**). Celui-ci repose sur le traitement, par radio ou chimiothérapie, de souris ayant reçu des cellules de tumeurs de patients. La récurrence sera prélevée et des analyses *in vitro* (génomique, transcriptomique...) seront réalisées afin d'identifier de nouveaux marqueurs impliqués dans la formation de la récurrence. Une fois les cibles thérapeutiques identifiées, celles-ci pourront être testées chez les souris atteintes de GBM récurrent (180).

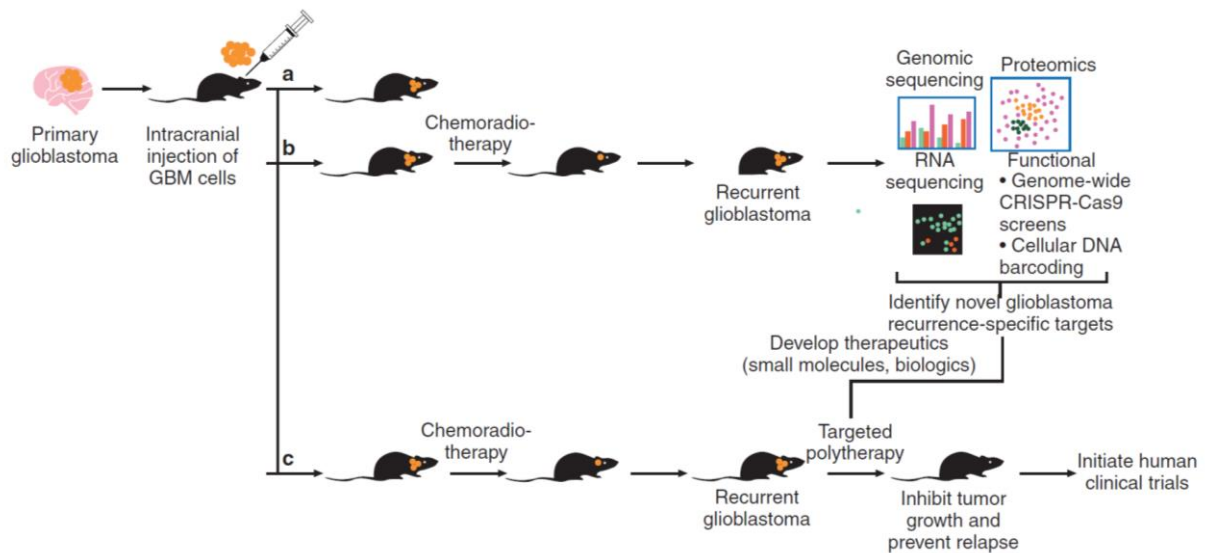


Figure 9 - Développement de modèle préclinique de GBM récurrent. Ce modèle permet de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans la résistance aux thérapies et dans la formation de la récurrence. a) xénogreffe de tumeurs de patients, b) traitement conventionnel de la xénogreffe, c) analyse de l'efficacité de thérapies ciblées, jugées pertinentes dans le modèle b) (180).

Par ailleurs, différents modèles mathématiques ont été proposés pour comprendre et prévoir la biologie du GBM, notamment après traitement (189). L'un d'entre eux, en analysant différentes populations cellulaires selon leurs phénotypes (cellules prolifératives et invasives) et selon leurs localisations (foyer nécrotique et hypoxique) a généré 6 équations permettant de prédire les conséquences biologiques de thérapies anti-angiogéniques dont le Bevacizumab (208). Selon ce modèle, les cellules de GBMs dans un environnement favorable prolifèrent mais ne migrent pas. En revanche, en cas d'hypoxie et de nécrose, les cellules de GBMs arrêtent de se diviser et migrent dans le parenchyme sain. En d'autres termes, le Bevacizumab entraîne une diminution des cellules tumorales présentes dans la masse tumorale et ralentit la progression tumorale, mais entraîne une invasion cellulaire, ce qui explique la récurrence rapide (**Figure 10**). Ce modèle explique donc pourquoi les anti-angiogéniques induisent une amélioration de la survie sans progression mais n'augmentent pas la survie globale des patients.

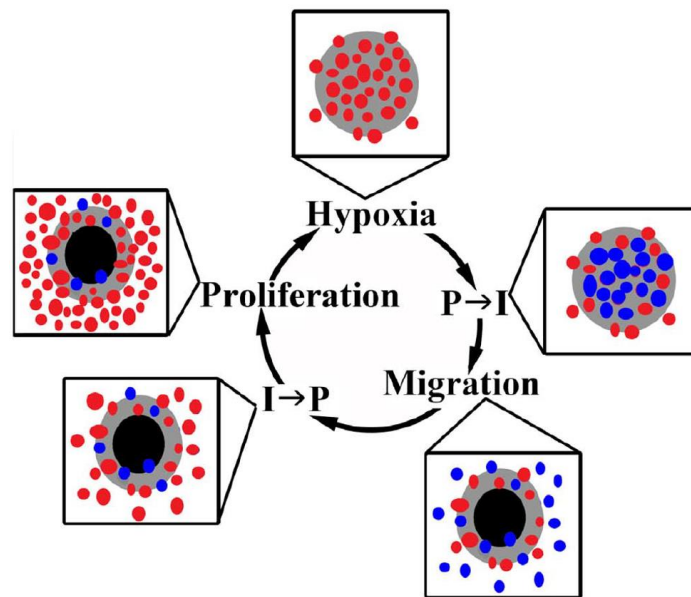


Figure 10 - Modèle prédictif des changements phénotypiques de cellules de GBM induit par des thérapies anti-angiogéniques. Schéma représentant l'évolution de la croissance tumorale. Les zones grises et noires reflètent l'hypoxie et la nécrose et les points rouges et bleus représentent les cellules tumorales prolifératives (P) et invasives (I), respectivement. En condition de survie favorable, les cellules de GBM prolifèrent (P→I). Le traitement par un anti-angiogénique empêche l'angiogénèse et crée de la nécrose, ce qui induit l'invasion des cellules de GBMs (I→P). En absence de nécrose, les cellules tumorales ayant migré prolifèrent (208).

De plus, il est possible de prédire les changements moléculaires ou phénotypiques induits par les thérapies, ceci afin de prévoir quelles altérations cibler lors de la prise en charge de la récurrence. Compte tenu des différences de sensibilité des différents clones présents dans le GBM, l'étude de Reinartz et al., 2017 (209) a montré qu'il est possible de prédire l'efficacité thérapeutique en deuxième ligne. Selon cette étude, le traitement de première ligne doit entraîner la régression d'un clone sensible et induire l'expansion d'un clone résistant, ceci afin de réduire l'hétérogénéité. Le choix de la prise en charge de deuxième ligne se basera sur les travaux *in vitro* afin de déterminer la molécule de choix pour cibler le clone enrichi.

L'analyse de biopsie liquide s'avère utile pour observer l'expansion de nouveaux clones lors de la récurrence et pour suivre la progression tumorale (189). Bien que cette technique soit testée dans le cancer du sein, du poumon et de l'ovaire, dans le cas du GBM, une étude a montré que seuls 10% des patients présentent un ADN tumoral circulant mesurable (210). Néanmoins, l'étude de Skog et al., 2008 (211) a montré qu'il est possible d'étudier des microvésicules contenant de l'ARN tumoral. L'étude a analysé l'expression de l'ARNm du récepteur EGFRvIII dans 24 échantillons tumoraux et sériques de patients. Les résultats sont particulièrement intéressants : pour 17 échantillons, une corrélation entre l'analyse de la biopsie et du sérum a été observée (5 tumeurs EGFRvIII + et 12 EGFRvIII-) et 2 échantillons ont mis en évidence l'expression de l'ARNm de l'EGFRvIII dans le sérum mais pas dans la biopsie, reflétant l'hétérogénéité intra-tumorale. De plus, une étude a montré que la détection de cellules tumorales circulantes est détectée chez 72% pour les patients avant radiothérapie, comparée à 8% après radiothérapie. Ceci démontre l'intérêt de ces techniques dans l'identification de cibles potentielles impliquées dans la récurrence (212).

Partie 2 : les Cellules souches de glioblastome (CSGs)

Les cellules souches tumorales (CST) ont été mises en évidence pour la première fois dans le milieu des années 90, chez des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë. Leur présence dans les tumeurs solides a été confirmée, dans les cancers de la prostate, du poumon, du pancréas, du colon, des mélanomes, du sein, du foie, des ostéosarcomes et dans les tumeurs cérébrales (213,214). Dans le GBM, les cellules souches de glioblastomes (CSGs) représentent seulement 0,5 à 5% des cellules de la masse tumorale. Leur présence est associée au grade tumoral et à un mauvais pronostic (215–217). L'origine des CSGs n'est pas encore identifiée. Deux hypothèses ont été suggérées: la transformation maligne de cellules souches neurales adultes saines (NSCs) ou la dédifférenciation de cellules gliales matures.

I. Origines des CSGs

1. Transformation de cellules souches neurales

Une altération génétique ou épigénétique des NSCs pourrait expliquer leur transformation maligne en CSGs et l'initiation tumorale (218,219). En effet, les NSCs et les CSGs partagent de nombreuses similitudes. Les deux populations souches résident dans un microenvironnement spécifique qui est impliqué dans leur maintien et leur expansion. Les NSCs sont localisées dans la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux antérieurs (SEZ) et la zone subgranulaire, tandis que les CSGs dans des foyers vasculaires et hypoxiques (220). Il est d'ailleurs intéressant de noter que de nombreux gliomes se développent à proximité de la SEZ. De plus, les NSCs et CSGs présentent des caractéristiques phénotypiques similaires, notamment une capacité d'auto-renouvellement et de différenciation. Les voies de signalisation impliquées dans ces deux processus sont exprimées dans les deux populations cellulaires.

La transformation maligne des NSCs n'est pas clairement définie. L'équipe de Sandberg et al., 2013 (221) a montré que la délétion de TP53, NF1 et PTEN dans les précurseurs neuraux, résidant dans la SEZ, induit la formation de gliomes dans des souris immunodéprimées, et peut être à l'origine des CSGs (219). D'autres altérations génétiques ont été suggérées comme étant responsables de la transformation maligne de NSCs : la dérégulation de la voie de signalisation Wnt (222), l'activation aberrante du récepteur Smo (voie de signalisation Shh) (223), l'expression anormale du microARN LIN28A (224) ou la perte de INK4A/ARF (225). Enfin, l'équipe de Sancho-Martinez et al., 2016 (226) a montré que la dérégulation des voies de signalisation de récepteurs à activité tyrosine et de la protéine p53 induit la transformation des cellules souches pluripotentes humaines en CSGs.

2. Dédifférenciation

La dédifférenciation est définie comme la régression du statut différencié et un retour à un statut souche (227). L'étude de Schmid et al., 2016 (228) a montré que les délétions de Rb et PTEN associées à l'activation de Kras dans des astrocytes corticaux murins leur apportent des caractéristiques souches. L'injection de ces astrocytes mutés forme un GBM, résistant au TMZ car exprimant la protéine réparatrice MGMT. D'autres altérations génétiques sont suspectées d'être responsables de la dédifférenciation des astrocytes et de la formation de gliomes. Il s'agit de la délétion concomitante des gènes p16 (INK4a) et p19ARF41 ou de la perte de Trp53 associée à l'activation de la voie MAPK (Akt et c-myc) (225,229). Par ailleurs, une plasticité entre les cellules de GBMs différenciées et les CSGs, notamment après radiothérapie et chimiothérapie a été constatée. Ainsi, il a également été proposé que les CSGs peuvent être issues de cellules tumorales différenciées (230–232).

L'origine des CSGs n'est pas clairement identifiée. Néanmoins, les deux hypothèses décrites précédemment pourraient avoir lieu simultanément, ce qui expliquerait l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale (**Figure 11**).

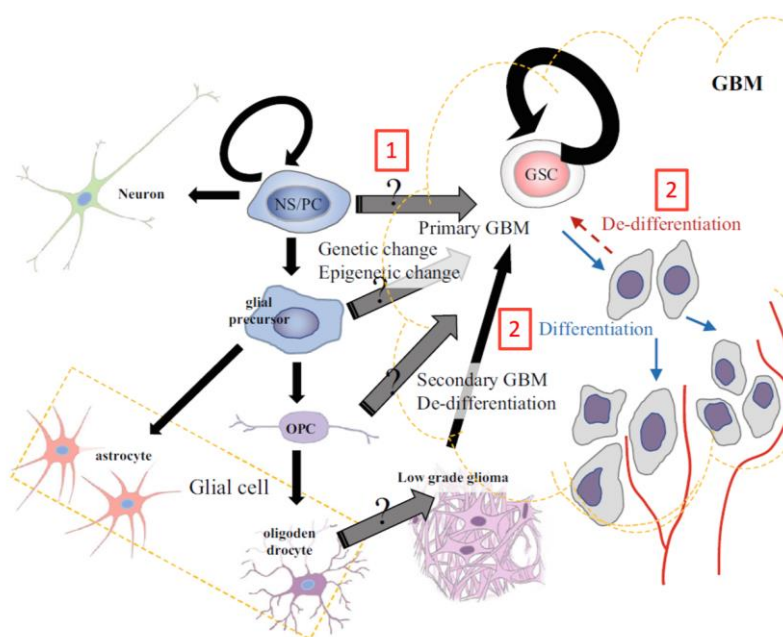


Figure 11 - Origine des cellules souches de GBM. Les cellules souches neurales (NS/PC) peuvent se différencier en neurones, en astrocytes (à partir de précurseurs gliaux) et en oligodendrocytes (à partir de progéniteurs d'oligodendrocytes (OPC)). Les CSGs peuvent avoir pour origine 1) une dérégulation des cellules souches neurales, des précurseurs gliaux ou de progéniteurs d'oligodendrocytes) ou 2) d'une dédifférenciation de cellules tumorales de gliomes (233).

II. Caractéristiques des cellules souches de GBM

1. Auto-renouvellement

L'auto-renouvellement correspond à une division cellulaire symétrique et permet aux CSGs de former une cellule fille identique. L'auto-renouvellement est régulé par les voies de signalisation, Notch, Hedgehog et Wnt. Ces trois voies sont également activées au cours du développement embryonnaire du système nerveux.

a) Notch

Physiologiquement, la voie de signalisation Notch est impliquée dans la régulation de la différenciation et dans le maintien des NSCs pendant le développement du système nerveux central (234). La voie Notch est composée de 4 récepteurs transmembranaires (Notch1-4) et 5 ligands transmembranaires DLL1/2/3 (delta-like ligands) et JAG1/2, exprimés respectivement par les CSGs et les cellules endothéliales adjacentes (186,235). L'activation de la voie induit le changement conformationnel et le clivage enzymatique, par des γ -sécrétases, des récepteurs Notch. Le clivage protéolytique entraîne la libération du domaine intracellulaire des récepteurs dans le cytoplasme, ce qui active la transcription de gènes impliqués dans l'auto-renouvellement (236,237).

La voie de signalisation Notch est dérégulée dans les GBMs (234). Les récepteurs Notch1/2 et les ligands JAG1 et DLL1 augmentent la prolifération des cellules tumorales de GBM *in vitro* et initient la formation de tumeur *in vivo* (238). La voie Notch est également impliquée dans l'invasion, l'angiogenèse et la résistance aux thérapies anti-VEGF (239,240). De plus, il a été mis en évidence une surexpression de l'EGFR médiée par le récepteur Notch1 (241). En ce qui concerne les CSGs, le récepteur Notch1 est surexprimé après radio et chimiothérapie (242). Son inhibition par un si-RNA diminue l'auto-renouvellement des CSGs et augmente leur chimio sensibilité *in vitro* (235).

b) SHH

La voie de signalisation SHH (Sonic Hedgehog) agit au niveau de la prolifération, la migration, la différenciation et la survie des NSCs pendant le développement embryonnaire. Cette voie a également un rôle majeur dans la neurogénèse chez l'adulte (243). Brièvement, la voie SHH est composée de trois ligands (sonic Hedgehog, Indian Hedgehog et Desert Hedgehog) et du récepteur Patched. Ce dernier inhibe de manière constitutive le récepteur transmembranaire Soothened (Smo). En activant le récepteur Patched, le ligand SHH lève l'inhibition sur Smo (244). Celui-ci, à la suite d'une cascade de voies de signalisation intracellulaires, active les facteurs de transcription de la famille Gli (glioma associated oncogen homolog). La protéine Gli1 entraîne l'expression de c-myc et Bmi1, des protéines impliquées dans l'auto-renouvellement (245,246).

La protéine Gli1 et les récepteurs Smo et Patched sont amplifiés dans les GBMs (247). L'étude de Chen et al., 2014 (223) a montré que la surexpression du récepteur Smo dans des progéniteurs neuraux, entraîne le développement de gliomes. Par ailleurs, la surexpression de Gli1 et Smo est associée à un mauvais pronostic (246,248). Enfin, l'activation de la voie de signalisation SHH augmente la migration et l'invasion des cellules tumorales *in vitro*

c) Wnt

La voie de signalisation Wnt (Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site) permet le maintien et l'expansion des NSCs pendant le développement du cortex cérébral (249). Chez l'adulte, la voie Wnt est impliquée dans la neurogénèse (250).

La voie Wnt est divisée en deux: la voie canonique et la voie non canonique. Je ne développerai que la voie canonique car elle est activée dans la régulation des NSCs (251). Elle est composée du récepteur FZD (Frizzled), de son corécepteur LRP (LDL receptor related protein) et des ligands Wnt. Lorsque la voie Wnt n'est pas activée, la β -caténine est phosphorylée par le complexe GSK3 β (glycogène synthase kinase 3 β)/Axine/CK1 α (caséine kinase 1)/APC (Adenomatous polyposis coli) et est dégradée par le protéasome. La fixation du ligand Wnt sur le récepteur FZD entraîne la phosphorylation du corécepteur LRP puis l'activation du récepteur FZD. Ceci entraîne l'inhibition de GSK3 β et l'accumulation de la β -caténine dans le noyau. La β -caténine nucléaire induit la transcription des gènes c-myc, Sox9 et CD44 (252).

L'expression nucléaire de la β -caténine est augmentée dans les gliomes (221). Il a été montré que l'activation aberrante de cette voie peut être responsable du développement de tumeur cérébrale (253). La voie Wnt est impliquée dans l'invasion, dans la transition épithélio-mésenchymateuse et dans la résistance à la radio/chimiothérapie des cellules de GBMs (254). Par ailleurs, la voie Wnt agit au niveau de la prolifération et de l'auto-renouvellement des CSGs (251,255,256). Enfin, une surexpression des ligands Wnt 1 et 3 a été observée dans les CSGs (257).

Mise en évidence de l'auto-renouvellement

In vitro, les CSGs sont maintenues dans un milieu spécifique, sans sérum et contenant les facteurs mitogènes (FGF et EGF). Ce milieu empêche la différenciation des CSGs et leur permet de proliférer. Dans ces conditions, les CSGs poussent en suspension, sous forme de neurosphères. Il est intéressant de noter que le milieu de culture des CSGs est similaire à celui utilisé dans la culture de NSCs.

Le test de dilution limite permet d'évaluer l'auto-renouvellement des CSGs. Il se base sur la capacité d'un faible nombre de CSGs (1 à 200 cellules) à reformer des neurosphères après dissociation. De plus, l'étude des CSGs reflète davantage l'hétérogénéité du GBM que les lignées cellulaires.

2. Différenciation

La capacité de différenciation, ou la multipotence des CSGs, est liée à leur capacité à se diviser de manière asymétrique, dans les trois lignages neuraux (neurone, astrocyte et oligodendrocyte). Les CSGs donnent naissance aux cellules tumorales différenciées «classiques», qui formeront la masse de la tumeur (258). Cette division asymétrique est régulée par les protéines BMPs (bone morphogenetic protein). A titre d'exemple, la protéine BMP7 induit la différenciation astrocytaire des CSGs (259).

In vitro, la différenciation est induite par l'ajout de sérum avec ou sans acide tout trans rétinolique (ATRA). Dans ces conditions, les cellules différenciées sont cultivées sous forme adhérente. La différenciation s'étudie par l'analyse transcriptomique et protéique de la perte de marqueurs souches et le gain de marqueurs différenciés.

3. Tumorigénèse

Les CSGs également appelées «cellules initiatrices de GBMs» ou «cellules propagatrices de GBMs», sont capables de former des tumeurs chez des souris immunodéprimées (213,214,260). C'est pourquoi, elles seraient impliquées dans l'initiation du GBM et dans la formation de la récurrence chez les patients (261).

In vivo, la tumorigénèse est étudiée en réalisant des transplantations en série, par injection orthotopique, chez des souris immunodéficientes. Les CSGs de la tumeur formées sont prélevées, dissociées puis réinjectées dans un nouveau modèle. Chaque GBM nouvellement formé présente les mêmes caractéristiques phénotypiques et génomiques que la tumeur initiale (262–264). Contrairement aux cellules tumorales différenciées, les CSGs sont capables de former des tumeurs avec l'injection d'un faible nombre de cellules (100 cellules) (263).

4. Marqueurs souches

Comme indiqué précédemment, les CSGs peuvent se diviser soit en reformant une CSG, soit en se différenciant en cellules tumorales. Selon ces deux phénotypes, les CSGs expriment des marqueurs spécifiques. Bien qu'il n'existe pas un marqueur unique confirmant le statut souche d'une cellule, plusieurs marqueurs souches ont été proposés :

- Des marqueurs membranaires: CD133, CD44, A2B5, CD15 (ou SSEA1; Stage-Specific Embryonic Antigène 1), Notch1, ABCG2 (ATP-Binding Cassette transporters), l'intégrine $\alpha 6$ (265).
- Des marqueurs intracellulaires: STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), Nestine, Nanog, Oct4 (octamer-binding transcription factor 4), Sox2 (Sex Determining Region Y-box 2), Bmi-1 (B cell-specific Moloney murine leukaemia virus Interaction site), c-myc

L'étude de Bien-Möller et al., 2018 (266) a analysé un ensemble de marqueurs souches (CD44, CD133, CD95, nanog, et nestin) et a mis en évidence une corrélation entre l'expression, d'ARNm ou de protéines, et la survie des patients uniquement avec la Nestine et CD133.

Parmi les marqueurs de cellules différenciées, la GFAP (Glial fibrillary acidic protein) (différenciation astrocytaire), TUJ1 (neuron specific class III beta-tubulin) ou TUBB3 (Tubulin beta 3 class III) (différenciation neuronale), MBP (myelin basic protein) ou OLIG2 (différenciation oligodendrocytique) sont les plus utilisés.

En résumé, l'auto-renouvellement des CSGs est impliqué dans la formation de la tumeur initiale et récurrente. En revanche, la différenciation leur confère un caractère moins agressif. C'est pourquoi, les 3 voies de signalisation, Nocth, Wnt et SHH, et les protéines BMPs représentent des cibles thérapeutiques pertinentes. Les différentes stratégies thérapeutiques visant l'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation des CSGs seront décrites dans la partie VI.

Les CSGs résident dans des foyers tumoraux spécifiques. Il s'agit d'un microenvironnement qui permet non seulement de maintenir le phénotype souche mais également de protéger les CSGs des thérapies (260,267). Les différentes niches ont en commun d'interagir directement avec les CSGs et de contrôler leur prolifération,

leur auto- renouvellement et leur différenciation. Les données de la littérature décrivent les niches périvasculaire, invasive, hypoxique et immunosuppressive.

III. Microenvironnement des CSGs

1. Niche périvasculaire

Les CSGs résident dans la niche périvasculaire, caractérisée par une vascularisation aberrante et désorganisée. La niche périvasculaire a été mise en évidence par l'étude de Calabrese et al., 2007 (268). Cette analyse a montré, sur des coupes de GBMs de patients, une colocalisation de CSGs (CD133+ et nestine+) et des capillaires tumoraux (CD34+). L'interaction des CSGs avec la niche est régulée par un contact direct, notamment avec les protéines de la matrice extracellulaire (MEC), ou par des facteurs sécrétés par les cellules composant la niche (**Figure 12**). A titre d'exemple :

- Les récepteurs Notch1/2, présents sur les CSGs, et les ligands DLL4 et JAG1, exprimés par les cellules endothéliales (269)
- Le récepteur CXCR4, exprimé par les CSGs, et le ligand CXCL2 sécrété par les cellules endothéliales (270) ou l'ostéopontine, une protéine de la MEC (271)
- L'intégrine $\alpha 6$, présente sur les CSGs, et la laminine, un élément de la MEC (272)

Il a été observé, *in vitro*, que la co-culture de cellules endothéliales et de CSGs induit une augmentation de leur prolifération (268). En effet, leur interaction permet de maintenir le statut souche des CSGs, en activant les voies impliquées dans leur auto-renouvellement (Hedgehog, Notch et Wnt) (268,273). Les cellules endothéliales sécrètent le ligand SHH et expriment les ligands DD4 et JAG1, ce qui active la protéine GLI1 et les récepteurs Notchs exprimés par les CSGs et assure l'auto-renouvellement des CSGs (273,274). *In vivo*, l'injection orthotopique simultanée de CSGs et de cellules endothéliales délétées pour JAG1 (shRNA), diminue la taille des tumeurs formées (269). Par ailleurs, les cellules endothéliales sécrètent du monoxyde d'azote (NO) qui est également impliqué dans l'activation des voies SHH et Notch (274,275).

Les CSGs ne sont pas de simples cellules résidentes de la niche périvasculaire. Elles ont un rôle majeur dans la formation de leur propre foyer. En effet, elles sécrètent différents facteurs angiogéniques (VEGF, FGF2, HDF), afin d'assurer la migration et la croissance de cellules endothéliales (276). Il est intéressant de noter que la sécrétion de VEGF par les CSGs est plus élevée que par les cellules différenciées (273,277). De plus, les CSGs sont également capables d'effectuer une transdifférenciation, c'est-à-dire de se différencier en cellules endothéliales, qui formeront de nouveaux vaisseaux tumoraux. En effet, l'étude de Wang et al., 2010 (278) a montré *in vitro* que les CSGs induisent la formation de progéniteurs endothéliaux (CD133+/CD144+) puis des cellules endothéliales matures (CD31). La transdifférenciation semble être régulée par les voies de signalisation Notch et VEGF. Bien que ce mécanisme ait été confirmé par l'expression d'altérations génétiques identiques dans les cellules endothéliales et les CSGs (260,273), d'autres études suggèrent qu'il ne s'agit pas d'une transdifférenciation mais d'une fusion entre les CSGs et les cellules endothéliales (279).

Les CSGs sont également capables d'attirer les péricytes. Il s'agit de cellules musculaires vasculaires lisses, impliquées dans le maintien de l'intégrité et la maturation vasculaire (260,280). Les cellules endothéliales entraînent la transdifférenciation des CSGs en péricytes, en sécrétant le facteur TGF- β (281,282). De plus, une étude récente a montré que les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse, attirées par les CSGs, s'attachent au niveau de l'endothélium et se différencient en péricytes (283). Les CSGs sont impliquées dans leur transformation maligne, où les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse deviennent plus prolifératives, plus invasives et capables de former une tumeur lorsqu'elles sont implantées en sous cutanée (284).

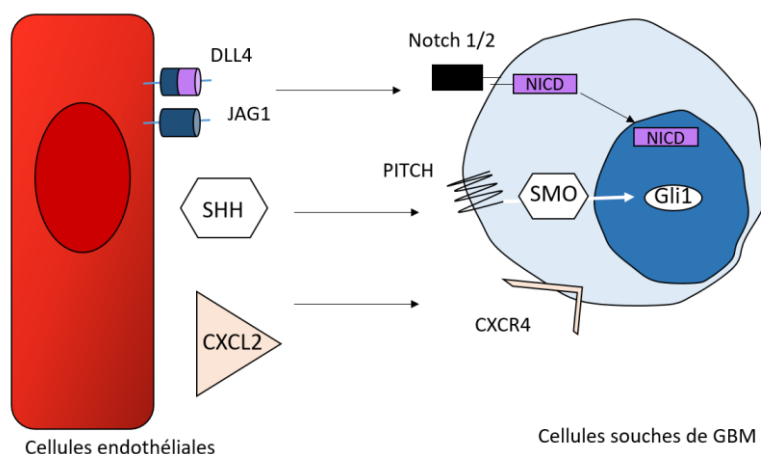


Figure 12 - Stimulation de l'auto-renouvellement des cellules souches de GBM par les cellules endothéliales. Adapté de Codrici et al.,2016 (273).

2. Niche invasive

Egalement nommée niche périneuronale, cette niche est encore peu connue. La niche invasive est une prolongation de la niche périvasculaire (285). Contrairement à la niche angiogénique, où les CSGs assurent la néoangiogénèse, la niche invasive est composée de vaisseaux sanguins pré-existants, permettant aux CSGs d'envahir le parenchyme sain (286). L'isolement des CSGs, présentes dans la niche invasive et dans la masse tumorale, a montré des caractéristiques phénotypiques différentes : les CSGs situées à la marge du GBM sont adhérentes *in vitro* et incapables de former une tumeur *in vivo* (287).

Par ailleurs, l'échec du Bevacizumab peut être expliqué par l'expansion de la niche invasive. En effet, bien que son effet anti-angiogénique normalise la vascularisation de la tumeur, il stimule la niche invasive et entraîne la prolifération des cellules invasives *in vivo* (208,288,289).

3. Niche hypoxique

Le GBM est connu pour être une tumeur hautement hypoxique. Les régions hypoxiques représentent 0,1 à 10% de la masse tumorale (290). Physiologiquement, le cerveau sain présente une concentration d'oxygène de 12,5 à 2,5% ($pO_2 = 200$ à 100 mmHg). Chez les patients atteints de GBM, la concentration tumorale varie de 2,5-0,5% ($pO_2 = 20-4$ mmHg) à 0,5-0,1% ($pO_2 = 4$ à $0,75$ mmHg) en cas d'hypoxie modérée et intense (220).

L'hypoxie joue un rôle majeur dans de nombreuses caractéristiques des GBMs (résistance aux thérapies, métabolisme glycolytique, angiogenèse...) via différents facteurs inducteurs d'hypoxie (HIF), dont les plus connus sont HIF-1 α et HIF-2 α . En condition normoxique, les facteurs HIFs sont hydrolysés par les enzymes PHDs, elles-mêmes activées par l'oxygénation, puis sont dégradés par le protéasome 26S (291). En condition hypoxique, l'activité des enzymes PHDs est inhibée, entraînant une accumulation de facteurs hypoxiques HIF-1 α et HIF-2 α . L'augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α et HIF-2 α induit la transcription de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, l'angiogenèse, l'inflammation, la migration et la croissance tumorale (194,292,293). La niche hypoxique est également un lieu privilégié pour les CSGs, notamment au niveau des régions pseudo-palissadiques qui entourent les cœurs nécrotiques. L'hypoxie entraîne *in vitro* la formation de neurosphères et la prolifération des CSGs, et *in vivo* leur tumorigénicité (294). Par ailleurs, l'hypoxie augmente l'acidité du microenvironnement, qui maintient le phénotype souche (295).

HIF-1 α est exprimé dans les gliomes de haut grade, par les cellules tumorales et les CSGs, et est associé à un mauvais pronostic (296). HIF-1 α est impliqué dans l'auto-renouvellement des CSGs, en activant la voie de signalisation Notch, (186,297) et dans leur résistance au TMZ (295,298). De plus, il a été montré que HIF-1 α entraîne la dédifférenciation des cellules tumorales, caractérisée par l'augmentation de marqueurs souches (CD133, oct4, nanog) (299,300). En ce qui concerne le facteur HIF-2 α , exprimé uniquement dans les CSGs (301), il induit également l'expression de différents marqueurs souches impliqués dans l'auto-renouvellement des CSGs (CD133, Sox2, Oct4 et c-Myc) (302–305). Une étude récente a mis en évidence que les deux facteurs HIF-1/2 α ont des rôles différents chez les CSGs. En effet, la déplétion de HIF-1 α , par siRNA, diminue l'expression de CD133 rapidement et entraîne une sensibilisation des CSGs au TMZ. En revanche, la délétion de HIF-2 α entraîne la diminution de CD133 de manière temps-dépendant et une sensibilisation au Cisplatine (290). L'inhibition de HIF-2 α , par l'agent PT2385, est actuellement en cours d'un essai clinique chez les patients atteints de GBMs récurrents (NCT03216499).

4. Niche immunitaire

Une quatrième niche est décrite comme réservoir de CSGs : la niche immunitaire. Celle-ci est caractérisée par l'infiltration de cellules immunitaires créant un microenvironnement inflammatoire et immunosuppresseur. Au sein de la niche immunitaire, les différentes cellules immunosuppressives assurent la survie des CSGs et le maintien de leur condition souche. En effet, les macrophages augmentent la prolifération et l'auto-renouvellement des CSGs en sécrétant les interleukines IL6 et IL8 (186). De manière similaire à la niche vasculaire, les CSGs sont impliquées dans la formation de la niche immunitaire. Plusieurs interactions entre les CSGs et les cellules inflammatoires périphériques ont été explorées afin de comprendre l'origine de la niche immunitaire dans le GBM.

Parmi celles-ci, nous pouvons citer l'axe SDF1/CXCR4, exprimé par les CSGs, qui attire les macrophages circulants (TAMs ; tumor-associated macrophages) (306,307). Les CSGs sont impliquées dans le changement phénotypique des macrophages : elles inhibent le phénotype M1 (proinflammatoire) et favorisent le phénotype M2 (anti-inflammatoire, immunosuppresseur et proangiogénique) en sécrétant les cytokines sCSF-1 (soluble colony-stimulating factor), TGF- β 1 et MIC-1 (308). De manière similaire, les CSGs recrutent les lymphocytes T régulateurs, immunosuppresseurs, et entraînent l'apoptose des lymphocytes T via la voie de

signalisation STAT3 (309). Les CSGs assurent également la survie des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSCs), en sécrétant le facteur MIF (migration inhibitory factor) (310). Enfin, les CSGs empêchent le déclenchement de la réponse immunitaire. En effet, les CSGs sous-expriment le récepteur TLR4 (toll like récepteur 4), un composant de l'immunité innée inflammatoire, essentiel pour recruter des cellules du système immunitaire (311).

Pour résumer, les différentes niches ont une importance majeure dans le maintien et l'expansion des CSGs mais également dans leur protection face aux thérapies. Les CSGs ne sont pas passives, elles ont un rôle primordial dans le remodelage et la formation de leur niche. Il s'agit d'une relation complexe et bidirectionnelle. L'existence de ces différentes niches complexifie la prise en charge du GBM et l'éradication des CSGs. Par ailleurs, les différents exemples décrits précédemment démontrent la capacité des CSGs à s'adapter à un microenvironnement. Comme nous l'avons écrit dans le V.3.b), le microenvironnement est impliqué dans l'hétérogénéité intra-tumorale du GBM. Il paraît ainsi évident, que les différentes niches ont un rôle majeur dans l'hétérogénéité des CSGs.

IV. Hétérogénéité des CSGs

L'étude de Dehcordi et al., 2017 (217) a généré 13 lignées de CSGs à partir de 20 tumeurs de patients et a montré que leurs temps de génération et leurs morphologies sont différents. Certaines CSGs forment des neurosphères en 10 jours et d'autres en plus de 30 jours; certaines sont organisées en agrégats de tailles différentes et d'autres sont flottantes ou semi-adhérentes. Ces résultats démontrent une hétérogénéité inter-tumorale des CSGs. De plus, l'étude de Piccirillo et al., 2009 (287) a montré que différentes populations de CSGs peuvent exister au sein du même GBM, démontrant une hétérogénéité intra-tumorale des CSGs.

1. Hétérogénéité protéique

Comme décrit précédemment, il existe différents marqueurs permettant d'identifier les CSGs. Parmi ceux-ci, CD133 (prominin 1) est l'un des premiers marqueurs à avoir été utilisé afin d'identifier et d'isoler des cellules souches tumorales de différents cancers, notamment dans le GBM. CD133 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée uniquement pendant le développement embryonnaire. Dans un contexte tumoral, CD133 active l'auto-renouvellement et la formation des neurosphères *in vitro* et l'initiation tumorale avec une faible quantité de cellules (100 CSGs CD133+) (312,313).

L'évaluation de l'expression de CD133 repose sur la détection de l'épitope AC133 (localisé au niveau du domaine extracellulaire de CD133). Néanmoins, plusieurs études ont remis en cause la corrélation entre le taux de détection d'AC133 et l'expression de CD133. Ainsi, deux études ont montré que l'analyse de l'expression de CD133 n'est pas idéale pour confirmer le statut souche d'une cellule. La première montre que CD133 est sujet à une glycosylation induisant la formation de différents épitopes et l'absence de reconnaissance par l'anticorps pour la forme non glycosylée. Cette étude a également mis en évidence une expression de CD133 fluctuante en fonction du cycle cellulaire, avec une expression élevée pendant les phases S/G2/M (314). La deuxième étude a démontré que l'expression membranaire de CD133 n'est pas

stable selon le microenvironnement (312). Enfin il a été montré que son expression n'est pas corrélée à la tumorigenèse ni au grade tumoral (315).

La découverte de cellules n'exprimant pas CD133 (CD133-) et présentant les mêmes caractéristiques que les CSGs CD133+ (auto-renouvellement *in vitro* et formation de GBM *in vivo*), a confirmé l'existence de deux types de CSGs : des CSGs CD133+ et des CSGs CD133- (316–318). Cultivées dans les mêmes conditions, les deux types de CSGs présentent des morphologies différentes. Les CSGs CD133+ poussent sous forme de neurosphères, caractéristiques des CSGs, et les CSGs CD133- se cultivent sous forme adhérente (319). Deux types de CSGs sont aujourd'hui décrits, les CSGs proneurales et les CSGs mésenchymales (320–322). Les CSGs proneurales sont caractérisées moléculairement par un profil CD133+, Olig2+ et PDGFR α +. Les CSGs mésenchymales expriment le marqueur CD44+ (OLIG2- et PDGFR α -) (203,320). Récemment, d'autres marqueurs ont été identifiés pour différencier les deux types des CSGs. L'expression de PATZ1 (POZ, AT-hook and Zinc-finger) est associée aux CSGs proneurales, tandis que l'expression de la tTG (tissue transglutaminase) et d'ALDH1A3 (Aldehyde dehydrogenase 1A3) a été mise en évidence dans les CSGs mésenchymales (323,324). D'un point de vue phénotypique, les CSGs proneurales sont plus prolifératives et forment, *in vivo*, une tumeur délimitée. Au contraire, les CSGs mésenchymales sont plus invasives et induisent, *in vivo*, une tumeur infiltrante (203,321). Les souris xénotreffées par les CSGs mésenchymales ont une survie plus faible que celles ayant reçu les CSGs proneurales (15 jours vs 123 jours) (320). Par ailleurs, les CSGs mésenchymales sont plus résistantes à la radio-chimiothérapie (314). Il est intéressant de noter que les deux types de CSGs coexistent au sein d'un même GBM et une plasticité entre les deux sous-types est possible, notamment après traitements (320,321).

Bien que les deux types de CSGs présentent un phénotype souche, les CSGs CD133+ sont considérées comme souches totales, similaires aux cellules souches neurales fœtales, car elles sont capables de se différencier en trois lignages. En revanche, les CSGs CD44+, plus proches des cellules souches neurales adultes, seraient des cellules souches « partielles » notamment car elles ont une capacité de différenciation plus limitée (325). Par ailleurs, l'étude de Chen et al., 2009 (316) a démontré l'existence d'une hiérarchie entre différentes CSGs, basée sur la clonogénicité des CSGs après différenciation :

- Les CSGs de type 1 n'expriment pas CD133 en condition souche et se différencient en formant des cellules tumorales hétérogènes (CD133+ et CD133-)
- Les CSGs de type 2 expriment CD133 en condition souche et se différencient en formant des cellules tumorales hétérogènes.
- Les CSGs de type 3 n'expriment pas CD133 en condition souche et se différencient en formant des cellules tumorales n'exprimant pas CD133.

In vivo, l'injection des CSGs de type 1 et 2 forme des tumeurs invasives alors que les CSGs de type III initient des tumeurs bien délimitées. Bien que les trois types de CSGs présentent un phénotype souche (auto-renouvellement, différenciation et formation de tumeur), les CSGs de type III ont un taux de renouvellement faible et prolifèrent lentement. Selon l'étude, le type I correspond au statut le plus indifférencié, alors que le type III correspond à une CSGs plus mature.

Ces différentes études confirment l'existence de différentes CSGs, selon leurs profils moléculaires et phénotypiques. Néanmoins, aucun marqueur, utilisé seul, ne semble pouvoir identifier de manière spécifique un type de CSGs. Une combinaison pourrait permettre de différencier les CSGs. Une autre possibilité d'identifier différentes CSGs pourrait se baser sur leurs localisations.

2. Hétérogénéité de localisation

Les différentes niches décrites précédemment sont des lieux privilégiés pour le maintien du phénotype souche des CSGs. Néanmoins, certaines CSGs semblent être préférentiellement localisées dans un microenvironnement spécifique.

La niche périvasculaire est enrichie en CSGs exprimant CD44 et l'intégrine $\alpha 6$, deux protéines qui interagissent avec les protéines de la matrice extracellulaire (l'ostéopontine et la laminine respectivement) (272,326). Plus récemment, il a été montré que le marqueur CD109 est également exprimé par les CSGs présentes dans la niche périvasculaire (327). Il est intéressant de noter que le taux d'expression d'un marqueur peut varier selon la localisation des CSGs. Comme nous l'avons dit, les CSGs exprimant fortement CD44 sont localisées dans la niche périvasculaire. Néanmoins, certaines CSGs expriment plus faiblement CD44 et sont localisées au niveau de la niche invasive. En plus de présenter une localisation différente, le taux d'expression de CD44 influence également le phénotype de CSGs. Dans la niche périvasculaire, l'activation de CD44 assure l'auto-renouvellement des CSGs alors qu'au niveau de la niche invasive, CD44 favorise l'infiltration des CSGs (286,328). Des résultats similaires ont été observés selon l'état de phosphorylation d'Olig2 (Oligodendrocyte transcription factor). Non phosphorylé, Olig2 induit la transcription du facteur TGF β , une protéine impliquée dans l'invasion, alors que la phosphorylation d'Olig2 stimule la prolifération des CSGs (329).

La niche hypoxique semble également être enrichie en CSGs particulières, capables de survivre dans ces conditions. La glycolyse anaérobie est un processus métabolique permettant aux cellules de proliférer malgré l'absence d'oxygène. La préférence des cellules cancéreuses à utiliser la glycolyse anaérobie au lieu de la phosphorylation oxydative a été observée par Warburg (effet Warburg). Récemment il a été mis en évidence la corrélation entre le métabolisme glycolytique et le phénotype souche (330). L'étude de Bayin et al., 2017 (236) a montré que les CSGs dont la voie de signalisation Notch est activée (une caractéristique des CSGs résidant dans la niche périvasculaire) sont incapables à survivre sans oxygène ni nutriments. De manière intéressante, l'expression ectopique du domaine intracellulaire du récepteur Notch1 dans des CSGs hypoxiques suffit à entraîner un changement métabolique vers un métabolisme oxydatif. Plusieurs voies de signalisations, impliquées dans la glycolyse anaérobie, assurant la survie des CSGs en condition hypoxique ont été mises en évidence. Récemment, l'étude de Fidoamore et al., 2017 (331) a montré que le récepteur PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor) régule la transcription de gènes impliqués dans l'augmentation des transporteurs du glucose (GLUT-3), la conversion du glucose en glycogène et le stockage de glycogène, la ressource d'énergie la plus rapidement métabolisable. Son expression est induite par l'hypoxie et permet aux CSGs de survivre. De manière intéressante, il a été observé que le métabolisme glycolytique est sur-régulé (ALDH1A3) dans les CSGs mésenchymales comparées aux CSGs proneurales (320).

Ces données semblent montrer que certaines CSGs sont « programmées » à résider dans une niche particulière selon leur profil moléculaire.

Ces derniers résultats montreraient que les différentes niches gouvernent les propriétés des CSGs : la niche périvasculaire stimule l'auto-renouvellement et la prolifération des CSGs alors que dans la niche invasive les CSGs restent quiescentes (286). Mais il est également possible que ce soient les différentes caractéristiques des CSGs qui influencent leurs localisations : les CSGs capables de réaliser la glycolyse anaérobie pourront s'adapter et continuer à s'autorenouveler en condition hypoxique. Ces deux hypothèses peuvent coexister. Néanmoins, ces données montrent l'importance du métabolisme des CSGs à s'adapter au microenvironnement. Cette capacité d'adaptation peut expliquer leur résistance aux thérapies (332). En effet, les CSGs sont capables de passer d'un état quiescent à un état prolifératif afin de repeupler les tumeurs (295).

V. Résistance

L'un des principaux enjeux dans le traitement du GBM est d'éliminer les cellules tumorales résiduelles, résistantes à la chimio et radiothérapie. La découverte des CSGs a permis d'émettre l'hypothèse que les thérapies actuelles éliminent les cellules tumorales différenciées, mais pas les CSGs. Ainsi, en raison d'une plus grande résistance et de leur capacité d'auto-renouvellement, les CSGs vont former la récurrence.

1. Chimiothérapie

Les CSGs auraient une chimiorésistance intrinsèque au TMZ, plus forte que les cellules tumorales différenciées. Ces données ont été suggérées suite à l'étude de Chen et al., 2012 (333), qui a mis en évidence la prolifération de cellules exprimant la nestine (marqueur souche) après traitement par TMZ. L'échec thérapeutique peut être expliqué par une réparation de l'ADN accrue au sein des CSGs. Il a en effet été montré une surexpression de la protéine de réparation MGMT dans les CSGs comparées aux cellules tumorales. Néanmoins, il est intéressant de noter que les CSGs ont une expression hétérogène de cette enzyme. En effet, certaines CSGs n'expriment pas la MGMT et entrent en apoptose après traitement au TMZ. En revanche, le TMZ est inefficace avec une CSG l'exprimant. Par ailleurs, l'étude de Pistollato et al., 2010 (298) a montré que les CSGs localisées au centre du GBM, (environnement hypoxique) ont une expression de MGMT plus élevée, comparées aux CSGs situées à la périphérie. De plus, les CSGs surexpriment la protéine réparatrice d'ADN, KDM2B (334). Son inhibition diminue l'auto-renouvellement des CSGs et augmente leur apoptose. Enfin, la protéine Gli1 (voie de signalisation SHH) est également impliquée dans la résistance au TMZ, en activant les mécanismes de réparation de l'ADN dont ATM (248,335).

Les CSGs expriment également un taux élevé de gènes anti-apoptotiques (FLIP, BCL-2, BCL-XL) et de protéine inhibitrice d'apoptose (XIAP, XIAP1/2, survivine) (320).

En plus des mécanismes de réparation augmentés, la surexpression des protéines de transport ABC (ATP binding cassette) dans les CSGs peut expliquer leur résistance. Il s'agit de protéines localisées au niveau de la membrane, permettant d'expulser de manière active (hydrolyse de l'ATP) un ensemble de molécules

thérapeutiques. Ces protéines sont capables d'expulser de nombreuses molécules thérapeutiques (la carboplatine, le TMZ, le taxol et le VP16), ce qui participe au phénomène MDR (multidrug resistance) (336). Les protéines de transport, MRP1 et P-gP, sont surexprimées dans les CSGs notamment après traitement par le TMZ (337). L'inhibition de MRP1 diminue la résistance des CSGs à la vincristine, l'étoposide et le taxol (338). Par ailleurs, l'activation d'ABCG2 augmente l'auto-renouvellement et la migration des CSGs (265,339).

Enfin, les chimiothérapies actuellement utilisées ciblent le cycle cellulaire, ce qui explique leur inefficacité sur les CSGs, qui sont quiescentes (340).

2. Radiothérapie

La résistance aux radiations ionisantes a été confirmée par l'augmentation du nombre de CSGs CD133+ après radiothérapie *in vitro* et *in vivo* (341–343). L'étude de Bo et al., 2014 (344) a montré que la protéine Chk2 (kinase des points de contrôle du cycle cellulaire) est impliquée dans leur radiorésistance. Par ailleurs, l'activation constitutionnelle de Cd25c, un effecteur de la voie ATM/chk1 dans les CSGs, explique également leur radiorésistance (343). De plus, les voies de signalisation STAT3 et Notch sont impliquées dans la résistance à la radiothérapie : la première en diminuant la réparation de l'ADN (activation des axes ATM/chk2 et ATR/chk1) et la deuxième en inhibant la différenciation des CSGs (329,330). En effet, la radiothérapie induit l'augmentation du ligand Jagged exprimé par les cellules endothéliales, ce qui augmente leur auto-renouvellement (242,345).

3. Plasticité

En plus de présenter une résistance intrinsèque élevée, les CSGs ont également de grandes capacités d'adaptation en réponse à la radio et chimiothérapie. En effet, la résistance des CSGs s'explique également par leur plasticité cellulaire. Il s'agit d'un changement morphologique, fonctionnel et moléculaire d'une cellule. Cette reprogrammation peut être induite par des modifications du microenvironnement ou par des thérapies. Comme nous l'avons indiqué, les CSGs peuvent se transdifférencier en péricytes ou en cellules endothéliales et peuvent se différencier en cellules tumorales. Un troisième type de plasticité a été décrit : la dédifférenciation. Ce processus se définit par la génération de CSGs à partir de cellules différenciées tumorales.

La dédifférenciation a notamment été mise en évidence après radio ou chimiothérapie (346). L'étude de Lee et al., 2016 (347) a mis en évidence *in vitro* que des cellules différenciées (CD133-), malgré des conditions de culture favorisant leur différenciation, acquièrent le phénotype souche (CD133+) après traitement par TMZ. Il a été montré que les cellules tumorales non éradiquées par le TMZ présentent un phénotype quiescent similaire au statut souche (348). En effet, les thérapies peuvent induire cet arrêt de prolifération réversible qui mime une fausse efficacité thérapeutique car les cellules quiescentes restent asymptomatiques (348–350). Ces données ont également été confirmées *in vivo*, où un modèle murin de récurrence a montré une augmentation de l'expression des marqueurs souches, par rapport à la tumeur initiale. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la dédifférenciation peuvent être activés par l'hypoxie, induite ou non par le TMZ, et la radiothérapie (232,300). Par ailleurs, il est intéressant de noter que selon

Kawamura et al., 2017 (233), une plasticité entre une cellule tumorale proneurale «différenciée» et mésenchymale «immature» peut être considérée comme une dédifférenciation.

Ayant une capacité de résistante accrue et une capacité d'auto-renouvellement, les CSGs sont responsables des récidives. Il a été montré que les CSGs isolées de GBM récurrents sont plus invasives *in vivo* (351). Trouver de nouvelles cibles pour éradiquer les CSGs est un enjeu nécessaire dans le traitement du GBM.

VI. Traitement

La découverte des CSGs a apporté de nombreux espoirs pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi, éradiquer les CSGs permettrait d'empêcher l'initiation de GBM à la périphérie de la résection chirurgicale et de diminuer les résistances et récidives (267). Trois stratégies sont actuellement étudiées pour induire l'apoptose des CSGs:

- Cibler directement les voies de signalisation impliquées dans l'auto-renouvellement des CSGs
- Induire leur différenciation pour les rendre plus sensibles aux thérapies
- Inhiber les voies qui contrôlent leur résistance

1. Cibler l'auto-renouvellement des CSGs

a) Voie Wnt

Inhiber la voie de signalisation Wnt dans les CSGs entraîne leur sensibilisation au TMZ, en diminuant la transcription des protéines de transport ABCC2 et ABCC4 (352). Deux protéines font l'objet de recherches dans l'inhibition de la voie Wnt : la β -caténine et la protéine GSK3- β .

Il a été démontré que le Diclofenac et le Celecoxib, des anti-inflammatoires non stéroïdiens, inhibent la β -caténine et induisent une diminution de la prolifération et de la migration des cellules de GBMs (353). Testé en phase II dans les GBMs nouvellement diagnostiqués, associé au TMZ, le Celecoxib n'a pas montré de gain de survie (NCT00112502) (354). Deux inhibiteurs de GSK3- β ont été analysés dans les cellules de GBMs : l'AR-A01441 et le LiCl. Ces deux agents permettent une augmentation de l'apoptose des cellules de GBMs, une diminution de la formation de neurosphères et de la clonogénicité (355). Deux nouveaux inhibiteurs sélectifs de la voie Wnt ont été synthétisés : le SEN461 et le XAV939 (251). *In vitro*, l'agent SEN461 est responsable de l'inhibition de la croissance de cellules de GBMs. Aucune donnée clinique n'a étayé l'efficacité de l'inhibition de GSK3- β (356).

Par ailleurs, l'étude de Adamo et al., 2017 (357) a montré que la voie Wnt peut être activée par le récepteur à tyrosine kinase RYK. La surexpression de RYK dans les CSGs, et son implication dans la dédifférenciation des cellules de GBM, font de lui une future cible thérapeutique.

b) Voie Notch

La voie Notch est impliquée dans l'invasion, dans la résistance aux thérapies anti-VEGF et dans les récurrences des GBMs (235,239,358). Comme nous l'avons dit, l'activation de cette voie induite par un de ses ligands (Delta et Jagged), entraîne un clivage du récepteur Notch, permettant la libération du domaine intracellulaire du récepteur et sa translocation au noyau. Le clivage de Notch est médié par l' α et la γ -sécrétase (359). Il a été proposé de cibler la voie Notch en inhibant l'enzyme γ -sécrétase (360,361). Plusieurs inhibiteurs ont été testés *in vitro*, parmi ceux-ci :

- Le MRK003, qui induit l'apoptose de CSGs, notamment des CSGs de type mésenchymal (362).
- Le dnMAML, un inhibiteur peptidique, a montré une diminution de la croissance tumorale de cellules de GBMs (363). Cet inhibiteur a été conjugué à un peptide mimant l'élastine afin de cibler spécifiquement les cellules tumorales. L'induction d'une hyperthermie, au niveau de la tumeur, provoque l'activation du peptide localisé. Ceci réduit le risque d'effets indésirables médiés par l'inhibition systémique de la voie Notch.
- Le GSI (R04929097), qui associé à la RT et au TMZ, entraîne une diminution de la taille de la masse tumorale et une survie prolongée de souris immunodéficientes, comparé au traitement standard. *In vivo*, il réduit le nombre de CSGs dans le GBM (238). Associé à un inhibiteur de la farnesyltransferase (anti-Ras), l'activité cytotoxique du GSI est augmentée (364).

En ce qui concerne les données cliniques, seul le composé GSI (R04929097) est actuellement testé. Une étude de phase I étudiant la toxicité du GSI associé au Bevacizumab, a montré des résultats encourageants (NCT01189240) (365). Deux études de phases II sont en cours chez les patients atteints de GBM récurrent en monothérapie (NCT01122901) ou associé au Bevacizumab (NCT01189240).

c) Voie Hedgehog (SHH)

Deux principaux effecteurs de la voie SHH font l'objet de stratégies thérapeutiques : le récepteur SMO et la protéine Gli1 (245,246,366).

L'inhibition de SMO est possible via deux inhibiteurs, LDE225/Sonidegib et GDC-0449/Vismodegib (367). Le vismodegib diminue la capacité tumorigène et est actuellement en cours d'essais cliniques (phase II) dans les GBMs récidivants (NCT00980343).

Gli1 peut être inhibée par la cyclopamine. Celle-ci induit une diminution du nombre de CSGs au sein de neurosphères et entraîne leur sensibilisation à la RT (368). L'optimisation de la cyclopamine, par l'ajout du groupement glucuronide, a montré une diminution de la masse tumorale sans avoir les effets toxiques de l'inhibition de Gli1 dans les astrocytes. Cette formulation permet de cibler spécifiquement les cellules tumorales exprimant l'enzyme β -glucuronidase (369). De manière similaire, la formation de cyclopamine au sein de micelles entraîne une inhibition de la prolifération et de l'invasion de cellules de GBMs. Cette formulation potentialise également l'effet cytotoxique du TMZ *in vivo* (370).

L'inhibition simultanée de Gli1 et Gli2 par le GANTT61 potentialise la cytotoxicité du TMZ. Ce composé est particulièrement intéressant car il empêche l'activation de la voie Notch par le TMZ (248). Par ailleurs, la voie de signalisation SHH peut être activée par la voie NfκB. Il est possible de cibler indirectement cette voie par des anti-inflammatoires régulant la voie NfκB. Selon Ming et al., 2017 (371), l'aspirine peut augmenter la sensibilité au TMZ *in vivo*. Aucune étude clinique ne teste l'inhibition de Gli1.

2. Induire la différenciation des CSGs

Comme nous l'avons dit précédemment, induire la différenciation des CSGs permettrait de les sensibiliser aux thérapies actuelles. Stimuler la voie BMP est possible par différents mécanismes. Il a été proposé :

- D'activer un effecteur de la voie BMP : l'activation de BMP-7 permet un arrêt de la progression tumorale *in vitro* (372).
- De mimer des effecteurs de la voie BMP : le peptide mimant la protéine BMP-2, GBMP1, a été développé afin d'activer cette voie et est en cours de recherche (373).

Activer la voie BMP est actuellement en cours d'essais cliniques. Une étude de phase I teste la protéine recombinante hrBMP4 dans les GBMs récurrents (NCT02869243). Néanmoins, les BMPs entraînent la différenciation des CSGs en type astrocytaire (374). Les astrocytes formés peuvent devenir prolifératifs, contrairement à une différenciation neuronale, considérée comme un stade de différenciation terminal (375). L'inhibition de Notch, qui induit une différenciation neuronale, semblerait être une stratégie de différenciation plus pertinente (233).

De plus, la progression de gliomes de bas grade à un GBM secondaire, la transition proneurale à mésenchymale, la dédifférenciation ou l'acquisition de chimio et radiorésistance sont des processus régulés par des mécanismes épigénétiques. La dérégulation de ces mécanismes est une cible thérapeutique potentielle car ils peuvent être modifiés de manière réversible et facilement par des enzymes (376).

Enfin, une dernière stratégie thérapeutique permettant d'induire une différenciation des CSGs repose sur leur métabolisme. En effet, inhiber le métabolisme glycolytique des CSGs (anti effet Warburg) est possible avec l'AMPC qui stimule la biogenèse mitochondriale et la phosphorylation oxydative (330).

3. Inhiber les voies qui contrôlent la radiorésistance des CSGs

Cibler la voie mTOR en inhibant mTORC1 et 2 induit une radiosensibilisation des CSGs et une augmentation de la survie des souris (127). Une double thérapie, inhibant les voies AKT/mTOR (FC85) et MDM2 (mouse double 2 homolog) (ISA27), conduit à une diminution des marqueurs souches et une augmentation des marqueurs de différenciation neuronale et gliale, mais également l'apoptose des CSGs (377).

Par ailleurs, le facteur de transcription STAT3 est surexprimé dans les CSGs et est impliqué dans leur radiorésistance. L'étude de Masliantsev et al., 2018 (378) a montré que son inhibition entraîne une diminution de la viabilité, l'auto-renouvellement et une augmentation de la radiosensibilité *in vitro* de deux lignées de CSGs. La cucurbitacine, un inhibiteur de STAT3, ralentit la progression tumorale *in vivo*, et est actuellement en étude clinique de phase I (379).

Enfin, une activité basale plus élevée de l'EGFR dans les CSGs a été observée et son inhibition par le Gefitinib est impliquée dans la radiosensibilité. Seul, le Gefitinib diminue la prolifération des cellules tumorales mais pas des CSGs. Associé à la Doxorubicine ou à la radiation, le Gefitinib entraîne une cytotoxicité dans les CSGs (380).

Partie 3 : les intégrines

I. Le microenvironnement tumoral et les intégrines

1. Le matrisome

Le processus tumoral n'est pas limité à l'accumulation de mutations, le microenvironnement participe également à l'initiation et à la progression tumorales. En effet, celui-ci apporte aux cellules cancéreuses des facteurs de survie, les protège des thérapies via l'infiltration de cellules immunitaires et leur permet de se disséminer. La matrice extracellulaire (ECM) est un élément majeur du microenvironnement tumoral, permettant l'interaction entre les cellules tumorales et les cellules stromales. Une étude portant sur le cancer du poumon a montré, à partir de différentes banques de données de patients, la corrélation entre la surexpression de protéines issues de l'ECM et le risque de récurrences et de métastases. Ainsi, la surexpression du récepteur de l'acide hyaluronique permet aux cellules tumorales pulmonaires de se disséminer via la co-option de l'ECM, et d'induire des métastases cérébrales (381).

L'importance de l'ECM est mise en évidence à l'aide de l'étude du matrisome. Celui-ci, de plus en plus étudié ces dernières années, comprend les gènes codant pour les protéines composant et régulant l'ECM (**Figure 13**). Il est estimé que 300 gènes codent pour des protéines qui participent à l'architecture et à l'organisation de l'ECM (glycoprotéine, laminine, tenascine, collagène, fibronectine...) et que 700 gènes codent pour les protéines régulant l'ECM (382).

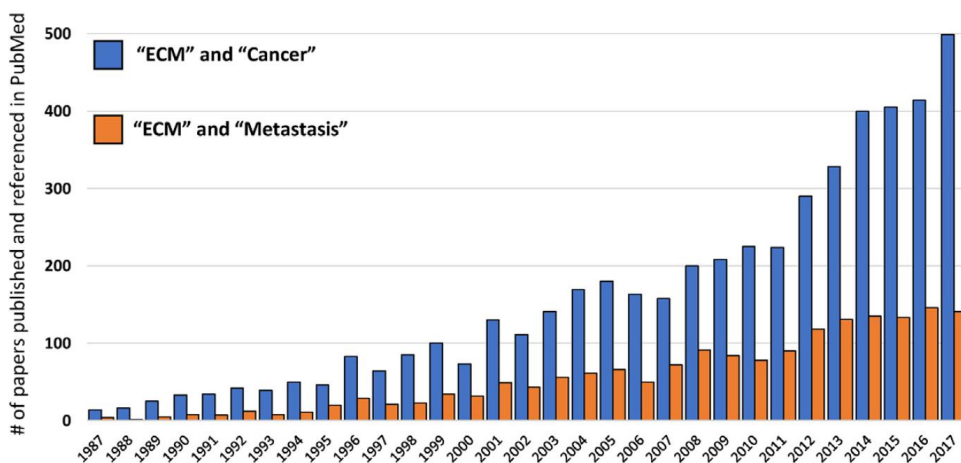


Figure 13 - Intérêt scientifique de l'implication de l'ECM dans la progression tumorale. Recensement des publications, par an, contenant la combinaison de mots « ECM AND cancer » OR « ECM AND metastasis » (382).

Plusieurs études ont mis en évidence l'augmentation de gènes du matrisome dans un contexte tumoral. A titre d'exemple, l'analyse de tissus cancéreux et normaux du sein a montré que 15 gènes sont sur-régulés, dont 7 appartiennent au matrisome et que 15 gènes sont sous-régulés, dont 9 sont également impliqués dans le matrisome (383). De même, parmi les 43 et 51 gènes sur-régulés dans les cancers du sein et du poumon métastatiques, 6 et 14 sont impliqués dans l'organisation de l'ECM (382). L'analyse du matrisome

permet également de stratifier les patients. En effet, l'étude de Lim et al., 2017 (384) a démontré sur 2000 patients atteints d'adénomes pulmonaires non à petites cellules précoces, que 29 gènes codant pour des protéines de l'ECM permettent de diagnostiquer les patients selon un pronostic à faible ou haut risque.

De plus l'ECM peut évoluer au cours de l'initiation ou la progression tumorale. La matrice peut être altérée au niveau des constituants cellulaires qui la composent, de son organisation et de ses propriétés physiques. En effet, la rigidité de l'ECM dans le cancer du sein, due à un dépôt de protéines, est corrélée à un phénotype plus agressif. Un remodelage plus rigide de l'ECM permet aux cellules tumorales de migrer et d'envahir de nouveaux organes (385–387). Les récepteurs d'adhésion cellulaire (intégrines, cadhérines, immunoglobulines et sélectines) assurent l'interaction de cellules et de l'ECM. Il s'agit de véritables carrefours entre les cellules tumorales et le microenvironnement. Parmi les récepteurs d'adhésion, les intégrines sont particulièrement étudiées dans un contexte tumoral.

De nombreuses études ont mis en évidence que l'expression des intégrines est souvent augmentée dans les cellules tumorales et qu'elles participent à leur agressivité. Néanmoins, il est intéressant de noter que les intégrines, exprimées par les cellules du microenvironnement, sont également impliquées dans la progression tumorale. A titre d'exemple, l'hypoxie entraîne une augmentation de l'expression de la sous-unité $\beta 1$ dans les fibroblastes et des intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 5$ dans les cellules endothéliales (388). De plus, il a été montré que les intégrines exprimées par les plaquettes sont également impliquées dans le processus tumoral. En effet, une méta-analyse sur des patients atteints de maladies cardiovasculaires et bénéficiant de traitements antiplaquettaires présentent un risque plus faible de développer des métastases (389). Effectivement, les plaquettes interagissent avec les cellules tumorales lors de l'intravasation et les protègent contre les cellules du système immunitaire (390). Cette interaction est médiée par les intégrines exprimées sur les plaquettes, notamment par les intégrines $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha IIb\beta 3$, qui participent à la formation de métastases pulmonaires (391,392).

2. Les intégrines

Les intégrines sont une famille de glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires, appartenant à la famille des récepteurs d'adhérence cellulaire. Elles sont composées de deux sous-unités, reliées par une liaison non covalente. On dénombre 24 intégrines, représentées par 18 sous-unités α et 8 sous-unités β (393). Les intégrines sont impliquées dans l'adhésion entre les cellules et la matrice extracellulaire, dans la cohésion intercellulaire et dans de nombreux processus biologiques.

a) Structures des intégrines

Chaque intégrine contient trois domaines. Le domaine extracellulaire (700 à 1000 acides aminés), également appelé « tête globulaire », permet l'adhésion des ligands. La tête est soutenue par une partie linéaire contenant le domaine transmembranaire (20 à 30 acides aminés) et le domaine cytoplasmique (70 acides aminés ; sauf la sous-unité $\beta 4$ qui contient 1000 acides aminés). Ce dernier, également appelé « queue » ou « patte », interagit avec les protéines cytosoliques (394) (**Figure 14**).

i. Structure de la sous-unité alpha

La sous-unité α (> 1100 acides aminés) est composée d'une chaîne légère (correspondant au domaine cytoplasmique et au domaine transmembranaire (25kD)) et d'une chaîne lourde (représentant la partie extracellulaire (120kD)). Les deux chaînes sont reliées par un pont disulfure (394).

La partie extracellulaire de la sous-unité α contient le domaine β -propeller (propulseur), qui est organisé en 7 séquences répétées (de 60 acides aminés), et d'une région linéaire composée de 3 domaines : *thigh* (cuisse), *genu* (genou) et *calf*s1/2 (mollets). La partie transmembranaire de la sous-unité α contient le motif GFFKR permettant l'interaction avec la queue de la sous-unité β . Enfin, la partie cytosolique de la sous-unité α ne contient pas de motif particulier et est variable.

Il existe deux types de sous-unités α , qui diffèrent selon leur partie extracellulaire. Les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, αv et $\alpha 1b$ présentent la structure détaillée précédemment. En revanche, les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αM , αL , αD , αX et αE possèdent, entre deux séquences répétées du domaine β -propeller, le domaine α -I (ou α -A).

ii. Structure de la sous-unité beta

La partie extracellulaire de la sous-unité β (800 acides aminés) est composée de plusieurs domaines : le domaine β -I-like (également appelé β a), le domaine d'hybridation, le domaine PSI (plexin, semaphorin, integrin) et trois domaines EGF-like. Sa partie cytoplasmique contient un ou deux motifs spécifiques et conservés (NPxY, NPxxY), permettant l'interaction avec de nombreuses protéines intracellulaires possédant une séquence PTB (phosphotyrosine-binding) (393).

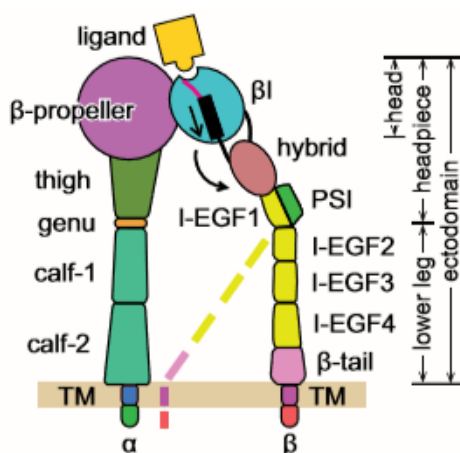


Figure 14 - Structure des sous-unités α et β des intégrines (248)

iii. Relation structure-fonction

Les ligands se fixent à l'interface entre les domaines β -propeller et β -I-like (des sous-unités α et β respectivement) (393). Lorsque le domaine α -I est présent, il sert exclusivement d'ancrage aux ligands. L'adhésion de protéines extracellulaires sur les domaines α -I et β -I-like est possible via les sites MIDAS (Metal Ion-Dependent Adhesion Site, sur les sites α -I et β -I-like), ADMIDAS (Adjacent Metal Ion-Dependent Adhesion

Site, sur le site α -I) ou SyMBS (sur α -I). Ces trois sites fixent des cations divalents (calcium, magnésium ou manganèse) qui interagissent avec différents ligands.

La sous-unité α définit la spécificité de l'intégrine pour son ligand. On note 4 types d'intégrines ; celles qui reconnaissent la laminine ($\alpha 7\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$), le collagène ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ et $\alpha 11\beta 1$) et le motif RGD ($\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 8$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha 11\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$). Le motif RGD est composé de la séquence Arginine-Glycine-Acide aspartique, présente sur la fibronectine, la vitronectine et le fibrinogène. Un 4^{ème} type d'intégrine reconnaît les leucocytes ($\alpha X\beta 2$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha D\beta 2$, $\alpha L\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ et $\alpha E\beta 7$) (**Figure 15**).

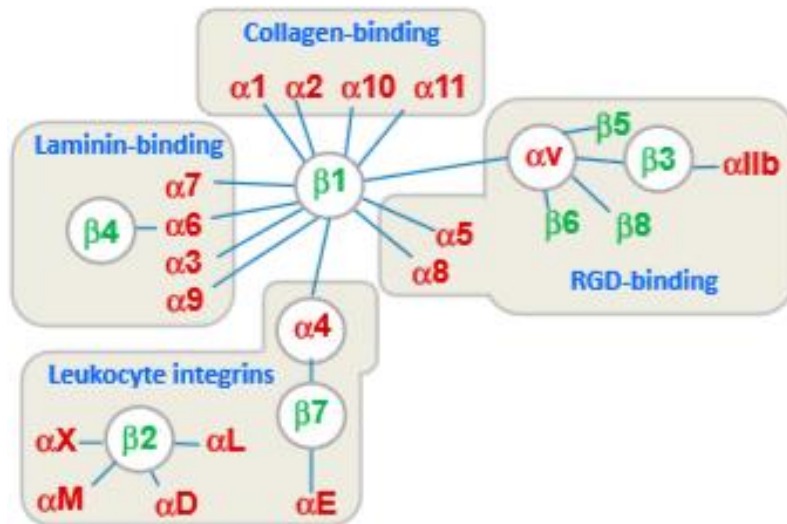


Figure 15 - Classification des 24 intégrines selon la combinaison des sous-unités α et β . La sous-unité α définit la spécificité de la reconnaissance des ligands intracellulaires (395).

b) Activation des intégrines

Les intégrines existent selon trois conformations (393) :

- Repliée et fermée : la tête de l'intégrine est courbée et dirigée vers la membrane. Les deux sous-unités sont reliées par un pont salin au niveau transmembranaire et cytoplasmique, ce qui rend impossible la fixation de ligands intracellulaires.
- Extension-fermée : la tête de l'intégrine se soulève au-dessus de la membrane cellulaire, mais les deux sous-unités restent liées. Dans cette conformation, l'intégrine peut lier son substrat.
- Extension-ouverte : les deux sous-unités, au niveau transmembranaire et cytoplasmique, se séparent et s'éloignent. Ce changement conformationnel permet aux protéines intracellulaires de se fixer à la sous-unité β . Il s'agit de la conformation active de l'intégrine.

Plus récemment, l'étude de Miyazaki et al., 2018 (396) a montré par microscopie électronique que les mécanismes de conformation des intégrines sont plus diversifiés, plus complexes (ne se limitant pas aux trois conformations) et dépendent de chaque intégrine. A titre d'exemple, en condition de repos l'intégrine $\alpha\beta 3$ présente une conformation fortement courbée tandis que les intégrines possédant les sous-unités $\beta 1/\beta 4$ ont des conformations intermédiaires (demi-courbée ou demi-étendue) (396,397). En ce qui concerne l'intégrine

$\alpha\beta_8$, celle-ci a une conformation constitutivement étendue, de manière indépendante de l'affinité pour son ligand (383). De plus, bien que les intégrines ne puissent pas lier leur substrat extracellulaire en condition de repos, il a été démontré que certaines peuvent interagir avec leur ligand malgré une conformation fermée (398).

L'activation des intégrines est possible par deux mécanismes : soit via les protéines intracellulaires qui interagissent au niveau du domaine cytoplasmique de la sous-unité β (activation Inside-Out), soit via les protéines extracellulaires qui se fixent sur la tête de l'intégrine en conformation « Extension-fermée » (activation Outside-In) (**Figure 16**) :

- L'activation « Inside-Out » est médiée par la fixation des protéines cytosoliques (taline, vinculine, paxiline, kindline) sur la sous-unité β . Ceci entraîne la rupture du pont salin qui sépare les deux sous-unités α et β et la réorganisation de la partie extracellulaire via le pivotement du domaine d'hybridation de la sous-unité β . La tête se redresse, augmentant son affinité pour les ligands.
- L'activation « Outside-In » est initiée par la fixation d'un ligand extracellulaire, ce qui entraîne l'agrégation de plusieurs intégrines et le recrutement de protéines intracellulaires au niveau de la membrane (399).

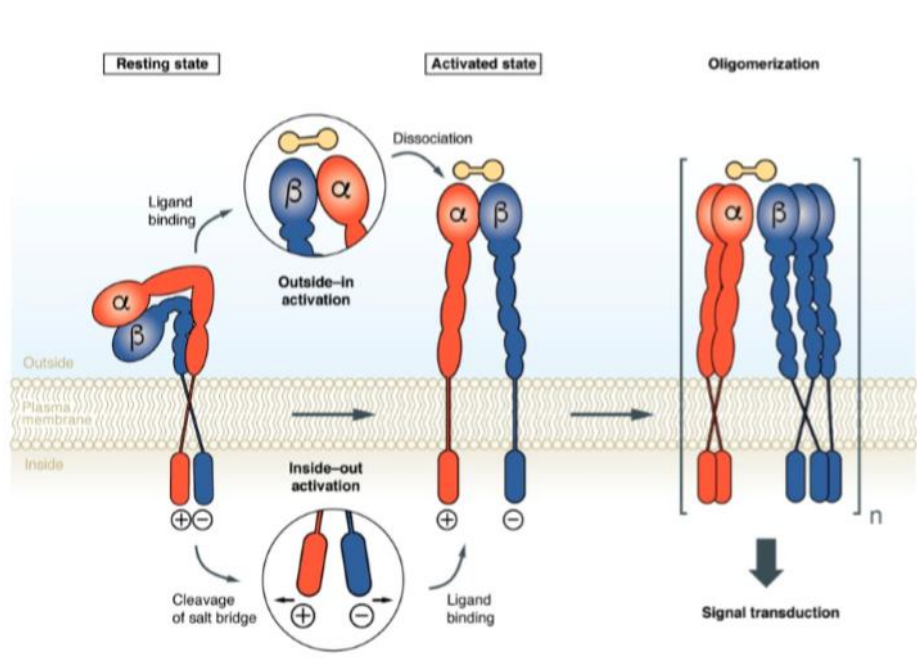


Figure 16 - Schéma illustrant l'activation des intégrines selon la voie « Inside-out » et « Outside-in » (400).

La voie « Inside-Out » régule l'adhésion à l'ECM et permet aux cellules de migrer (401,402), tandis que la voie « Outside In » permet de contrôler la polarité cellulaire et la structure du cytosquelette. L'ensemble des protéines intracellulaires, recrutées à la sous-unité β , forment un complexe membranaire multi-protéique nommé adhésome (393,403,404).

c) L'adhésome

L'adhésome est défini comme un complexe multi-protéique formé entre les intégrines et l'actine du cytosquelette. Celui-ci est impliqué dans la survie, la polarité et la migration cellulaires (387). L'adhésome est une structure dynamique et de composition hétérogène selon l'intégrine et le tissu (405). Il est composé de protéines nommées ICA (Intégrine-Cytosquelette-Actine). Parmi les protéines recrutées lors de l'adhésion cellulaire, FAK (focal adhesion kinase) qui se lie à la sous-unité β via ses domaines FERMs, est l'une des plus étudiées. L'activation de la protéine FAK est induite par l'autophosphorylation de son domaine tyrosine 397, ce qui augmente son affinité pour le domaine SH2 du proto-oncogène à activité tyrosine kinase Src. Celui-ci entraîne la phosphorylation d'un autre domaine de la protéine FAK, créant un site de liaison pour d'autres protéines (406). Le complexe FAK/Src recrute à la membrane et active différentes protéines : MAPK, PI3K et les protéines appartenant à la famille des GTPases (Rac, CDC42, Ras et Rho) (407).

Bien que FAK soit l'une des plus étudiées, plus de 200 composants sont recrutés lors de l'adhésion cellulaire (408) (**Figure 17**). Les protéines qui composent l'adhésome peuvent être caractérisées en deux types : les protéines d'échafaudage (intégrines, protéines adaptatrices, protéines du cytosquelette) et les molécules de régulation (kinase, phosphatase, GTPases, protéase...) (409). De plus, une étude de microscopie de fluorescence a mis en évidence les différentes étapes dans la formation de l'adhésome. Celui-ci est initié par la formation d'adhésion naissante puis de complexes focaux, d'adhésion focale puis d'adhésion fibrillaire (410). Le recrutement de la paxiline, de la vinculine et de la taline à la sous-unité β de l'intégrine est une étape initiale et permet à son tour le recrutement d'autres protéines (409). En revanche, la tensine est recrutée pendant les phases intermédiaires et la zyxine et l' α -actinine sont présentes dans l'adhésome mature, à des phases plus tardives (411). Les kindlines renforcent l'adhésion de l'adhésome (398). La cycline CDK1 présente également un rôle central dans la régulation de la formation des complexes. Lors du désassemblage, les protéines se retirent également à des vitesses et temps différents (412).

Enfin, l'analyse de l'état de phosphorylation dans les complexes d'adhésion sur fibronectine a montré que parmi les 1100 protéines identifiées, 499 sont phosphorylées. Ainsi, de nombreuses kinases et phosphatases sont recrutées au niveau de l'adhésome, ce qui confirme l'importance majeure de la phosphorylation dans la régulation de l'adhésion cellulaire (405).

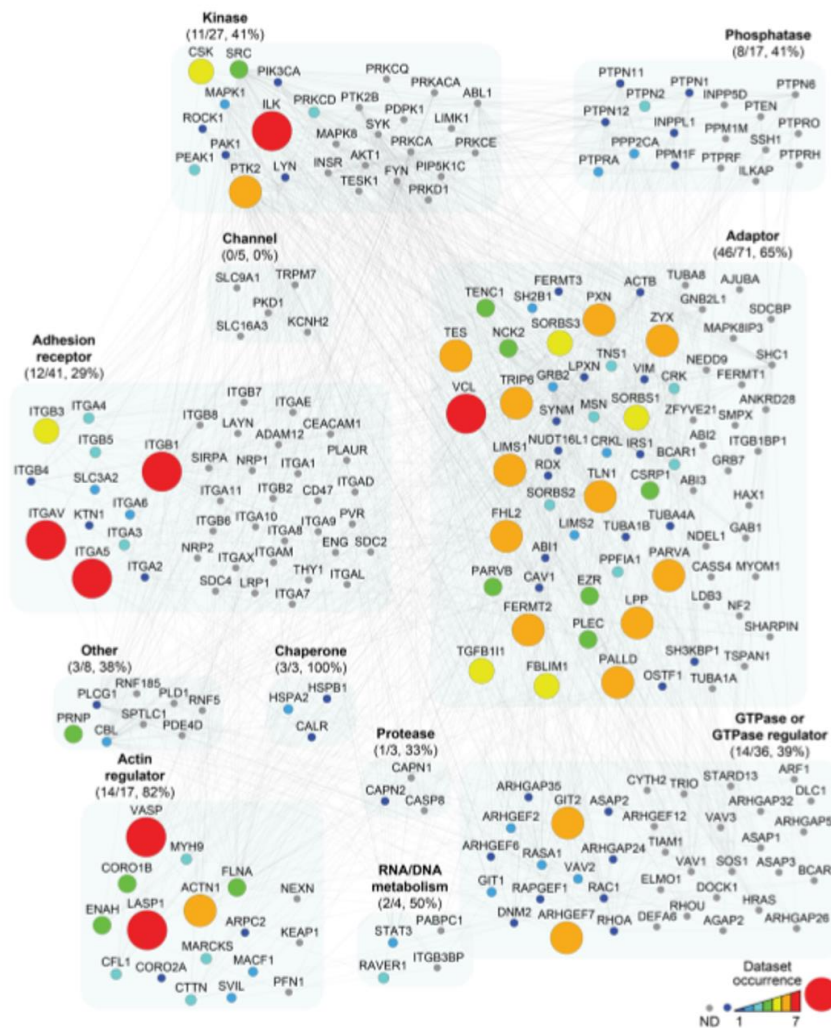


Figure 17 - Représentation schématique d'un méta-adhésome des intégrines (408).

d) Les intégrines et la mécanotransduction

De par leur interaction avec l'ECM, les intégrines ont un rôle majeur dans la transmission de signaux du microenvironnement et dans l'adaptation des cellules (413). Ce processus est appelé mécanotransduction (**Figure 18**). Il s'agit de la régulation cellulaire réalisée suite aux signaux mécaniques de l'environnement (414).

Les intégrines détectent et apportent aux cellules des informations concernant leurs propriétés mécaniques de l'ECM (rigidité, élasticité) (411,414–416). En effet, les différentes topologies de la matrice affectent l'organisation du cytosquelette et la morphologie cellulaire. A titre d'exemple, sur un substrat rigide les cellules ont une forme allongée et polarisée, tandis que sur un substrat souple, les cellules sont arrondies (409).

De plus, les intégrines influencent également les forces exercées par les cellules sur leur substrat. Ces forces sont initiées par l'actomyosine et par les adhésions des intégrines (411). Chaque intégrine semble générer des forces différentes. En effet, des études analysant les forces, exercées au niveau des adhésions, ont montré que celles médiées par l'intégrine $\alpha5\beta1$ sont plus élevées que celles de l'intégrine $\alpha\beta3$ (417).

Enfin, les protéines de l'adhésome ont des propriétés mécanosensitives : elles sont capables de s'étirer en fonction des forces de contraction de l'actomyosine. En détectant les forces médiées par le cytosquelette, elles modifient l'affinité des intégrines pour leur substrat (417–419).

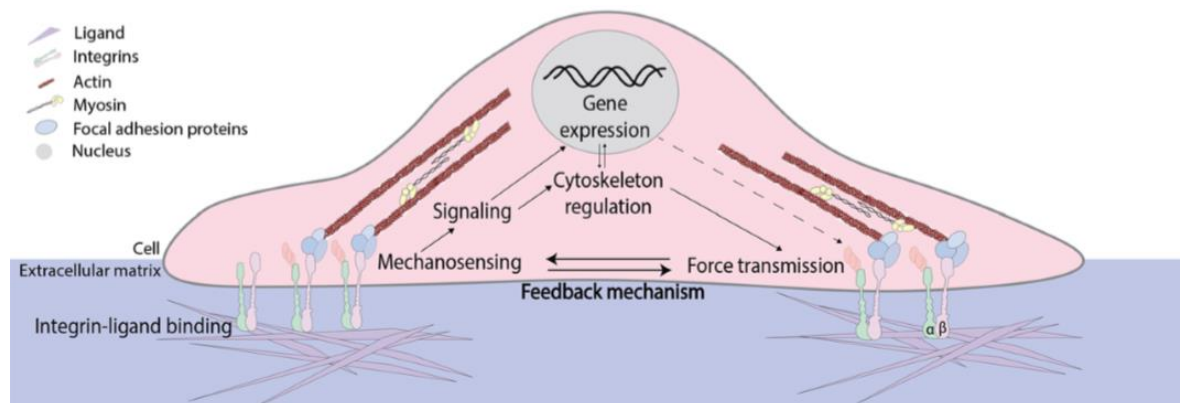


Figure 18 - Mécanotransduction. Les intégrines participent à l'attachement des cellules à l'ECM via la détection de ses propriétés physiques. Les cellules s'adaptent en modifiant l'organisation du cytosquelette et les fonctions cellulaires. Les forces médiées par les cellules sont régulées par les intégrines (411).

Pour résumer, les intégrines sont des récepteurs dynamiques et bidirectionnels. Leur activation permet d'intégrer les signaux du microenvironnement et de les transmettre aux cellules. Néanmoins, elles ne sont pas seulement impliquées dans la reconnaissance du substrat matriciel, mais elles régulent également le comportement cellulaire (migration, motilité, prolifération...) des cellules via l'activation de voies de signalisation (PI3K, MAPK). Enfin, de par leur interaction avec les protéines adaptatrices intracellulaires qui interagissent avec l'actine du cytosquelette (taline, paxiline), elles modulent la structure et l'adhérence cellulaire. Du fait de leurs multiples fonctions, la dérégulation des intégrines entraîne de nombreuses pathologies.

II. Rôle des intégrines dans les pathologies

1. Pathologies non cancéreuses

Certaines intégrines sont spécifiques d'un type cellulaire: l'intégrine $\alpha 11\beta 3$ est exprimée au niveau des plaquettes, $\alpha 6\beta 4$ des kératinocytes, $\alpha E\beta 7$ des lymphocytes T et des cellules dendritiques et la sous-unité $\beta 2$ sur les leucocytes (393). Ainsi, elles possèdent des rôles physiologiques spécifiques, notamment dans la vasculogénèse, la formation de thrombus ou de la peau, l'activation de la réponse immunitaire et la lymphoangiogénèse (393). La mutation ou la perte d'expression de ces intégrines sont associées à différentes pathologies : l'inhibition de la sous-unité $\beta 2$ entraîne des déficits immunitaires, celle de la sous-unité $\alpha 4$ des maladies inflammatoires (sclérose multiple, maladie de Crohn) et l'inhibition de la sous-unité $\beta 4$ des maladies de peau (épidermolyse bulleuse et atrésie pylorique) (402). Elles représentent des cibles thérapeutiques pertinentes dans la prise en charge de pathologies inflammatoires/auto-immunes et dans les troubles vasculaires thrombotiques (420).

L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ régule l'agrégation plaquettaire (402,421,422). Son inhibition bloque la liaison entre les plaquettes et le fibrinogène, empêchant la formation de thrombus (423,424). Plusieurs antagonistes de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Abiciximab et l'Eptifitanib et le Tirofiban) sont utilisés en clinique dans la prévention de thromboses ou dans le traitement de l'angor instable. L'inhibition de la sous-unité α4 bloque le trafic des leucocytes à travers la barrière hématoencéphalique ($\alpha\text{4}\beta\text{1}$) et du tractus digestif ($\alpha\text{4}\beta\text{7}$), ce qui régule l'inflammation. Ainsi, le Natalizumab, un antagoniste de l'intégrine $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ et $\alpha\text{4}\beta\text{7}$, est indiqué dans la sclérose en plaques et dans la maladie de Crohn. Un nouvel antagoniste de l'intégrine $\alpha\text{4}\beta\text{7}$, le Védolizumab, est également proposé dans la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (425).

2. Pathologies cancéreuses

Bien que n'étant pas des oncogènes et étant rarement mutées, les intégrines participent à la progression et l'agressivité tumorales. Les intégrines sont capables d'induire une augmentation de la migration/invasion et de la prolifération de cellules tumorales. Elles agissent également dans la résistance aux thérapies, dans l'angiogenèse et dans la formation de métastases (402,426) (**Figure 19**). Les intégrines $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, $\alpha\text{v}\beta\text{5}$, $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, $\alpha\text{4}\beta\text{1}$, $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ et $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ sont surexprimées dans les cancers ; les intégrines **$\alpha\text{v}\beta\text{3}$, $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ et $\alpha\text{5}\beta\text{1}$** étant les plus étudiées (402,427). Leur activation ou leur surexpression est souvent corrélée à la diminution de la survie des patients.

a) Implication des intégrines dans la progression tumorale

i. Prolifération

Les intégrines peuvent potentialiser la prolifération cellulaire en interagissant avec les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) de manière directe ou indirecte (modulation de leurs expressions ou activation de facteurs de croissance). Plusieurs interactions directes entre RTKs et intégrines ont été décrites : les intégrines $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ et $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ activent respectivement c-Met et l'EGFR dans les cancers ovariens (428,429). De manière similaire, la sous-unité β4 forme un complexe avec le récepteur ErbB2, ce qui entraîne un gain de prolifération et une résistance à l'apoptose dans les cancers du sein (430).

En ce qui concerne la stimulation indirecte des RTKs par les intégrines, l'hétérodimère $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ est nécessaire à la fixation du ligand IGF-1 (insulin-like growth factor 1) sur son récepteur IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor). Ainsi, l'étude de Fujita et al., 2013 (431) a montré que le complexe $\alpha\text{v}\beta\text{3}/\text{IGF-1}/\text{IGF1R}$ active les protéines Src, Akt et MAPK. Dans le cancer du sein, l'intégrine $\alpha\text{3}\beta\text{1}$ entraîne l'homodimérisation et l'activation du récepteur ErbB2, via la protéine RhoA, ce qui augmente la prolifération des cellules tumorales (432). De plus, dans des cellules du cancer du poumon, la sous-unité β1 assure le renouvellement de l'EGFR au niveau de la membrane cellulaire. Son inhibition induit une diminution de la prolifération et de la migration *in vitro* et *in vivo* (433). L'intégrine $\alpha\text{6}\beta\text{4}$ réduit la dégradation de l'EGFR dans les carcinomes pancréatiques (434). Enfin, il est intéressant de noter que la surexpression des intégrines peut être induite suite à l'inhibition de RTKs. A titre d'exemple, la sous-unité β1 est un mécanisme compensatoire à l'EGFR dans la survie de cellules de cancers du sein, traitées par thérapies anti-EGFR (435).

ii. Migration

Dans un contexte physiologique ou tumoral, les intégrines stimulent la migration cellulaire en activant les protéines appartenant à la famille des GTPases (notamment la protéine Rac1). Celles-ci entraînent la formation de protrusions via la polymérisation de l'actine, ce qui est nécessaire à la migration cellulaire (436). Les intégrines activent également les voies de signalisation PI3K et MAPK, qui stimulent la survie, la croissance et la progression du cycle cellulaire (436). Ainsi, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ stimule la prolifération des cellules de cancers colorectaux et la formation de métastases hépatiques via l'augmentation de la cycline D1 (437).

De manière intéressante, une revue récente a montré l'implication des intégrines dans la déformation du noyau, permettant de se mouvoir en même temps que la migration des cellules (385). A titre d'exemple, l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ régule la rigidité du noyau de lymphocytes lors de leur migration (438).

iii. Survie/autosuffisance et résistance à l'apoptose

Les intégrines participent également à la survie et l'autosuffisance des cellules tumorales, entraînant une résistance à l'apoptose. Elles peuvent notamment augmenter l'expression de protéines anti-apoptotiques (Bcl2, Flip) (439,440) et inactiver des protéines pro-apoptotiques (Bax) (441). La sous-unité $\beta 1$ entraîne la dégradation de la protéine p53 dans les cellules tumorales du cancer du poumon (442). Dans le GBM, la sous-unité $\beta 1$ régule l'expression de la protéine TERT, impliquée dans le rétrécissement des télomères, ce qui induit une réplication illimitée (443).

De plus, les intégrines peuvent être responsables de la survie des cellules cancéreuses non adhérentes. Physiologiquement, une perte d'adhésion à la matrice extracellulaire entraîne l'apoptose des cellules. Ce processus, appelé anoïkis, résulte de la perte d'interaction de la protéine FAK et du cytosquelette, ce qui entraîne l'activation de la protéine p53 puis de la caspase 8 (444). Les cellules cancéreuses peuvent être résistantes à l'anoïkis en raison de la surexpression de la protéine FAK ou d'une diminution de l'expression de la caspase 8, via la méthylation du promoteur de son gène (436,445–447). La dérégulation des intégrines peut également participer à la résistance à l'anoïkis. Une étude récente a montré que la sur-régulation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ favorise la survie des cellules détachées de cancers ovariens (448). Enfin, l'implication de l'endocytose des intégrines a été mise en évidence dans la résistance à l'anoïkis via le maintien de leur activation dans les endosomes (449). Ainsi, la détection de cellules circulantes tumorales confirme la résistance des cellules cancéreuses à l'anoïkis.

iv. Résistance aux thérapies

Les intégrines sont impliquées dans la résistance à la chimio et/ou radiothérapie. A titre d'exemple, la sous-unité $\beta 1$ inhibe l'apoptose médiée par le Paclitaxel dans le cancer du sein et l'intégrine $\alpha v\beta 3$ augmente la résistance à l'Imatinib dans les leucémies myéloïdes chroniques (440,450). La surexpression de la sous-unité $\beta 1$ induit l'activation des protéines Akt et ERK, stimulant la survie cellulaire et inhibant les effets antiprolifératifs de thérapies anti-EGFR (Trastuzumab) dans les cellules issues de cancers du sein métastatiques (451). Dans le GBM, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ empêche l'activation de la protéine p53 induite par la TMZ (452,453). Par ailleurs, il est intéressant de noter que la sous-unité $\beta 1$, surexprimée dans les cellules résistantes au Bevacizumab, augmente l'invasion de cellules de GBM *in vitro*. Selon cette étude, l'inhibition

de la sous-unité $\beta 1$ associée au Bevacizumab permet d'augmenter l'apoptose cellulaire (454). Enfin, une radiorésistance médiée par la sous-unité $\beta 1$ a également été mise en évidence dans le cancer du sein (264,455) et dans les tumeurs de la tête et du cou (456).

v. Angiogenèse

Les intégrines ont un rôle particulièrement important dans l'angiogenèse, notamment les hétérodimères $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ et $\alpha 5\beta 1$ (457). L'intégrine $\alpha v\beta 3$ interagit avec le facteur de croissance des fibroblastes (FGF2) et les intégrines $\alpha v\beta 5$ et $\alpha 6\beta 4$ augmentent l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Ces deux protéines permettent de former de nouveaux vaisseaux (458,459). Par ailleurs, de par leur interaction avec le microenvironnement, les intégrines sont impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire et dans la migration/prolifération des cellules endothéliales (436). En effet, étant surexprimées par les cellules endothéliales, les intégrines assurent leur survie. A titre d'exemple, l'étude de Lee et al., 2014 (460) a montré que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, en interagissant avec l'angiopoietine-2, assure l'adhésion et l'invasion des cellules endothéliales. Enfin, les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$ participent à la maturation et la stabilisation des vaisseaux via le recrutement des péricytes (457,461).

vi. Invasion et métastase

Les intégrines sont impliquées dans toutes les étapes du processus métastatique: dans l'intravasation, la survie de cellules tumorales circulantes, l'extravasation dans un autre site et dans la prolifération. Ainsi, leur dérégulation peut être associée à une augmentation du nombre de métastases. Les intégrines $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ participent à la formation de métastases de cancers du rein, de la peau, du poumon et de la prostate tandis que la surexpression de la sous-unité $\beta 1$ est impliquée dans des métastases de cancers du sein et de l'ovaire (387,402). Le processus métastatique requiert différentes étapes : le changement morphologique cellulaire, permettant aux cellules de migrer et nécessitant une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), une résistance à la non adhérence et une capacité de dégrader la matrice extracellulaire afin d'envahir le nouvel environnement. La protéine TGF $\beta 1$ (transforming growth factor beta) est une protéine nécessaire à l'EMT. Celle-ci est localisée à la membrane de manière inactive, liée par deux peptides LAP et LTB. En se fixant au motif RGD du peptide LAP, les intégrines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 6$ induisent la sécrétion de TGF $\beta 1$ (436,462). De plus, l'activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est également impliquée dans l'EMT des cellules de cancers des voies aérodigestives supérieures (463) et dans les GBMs (464).

Par ailleurs, les intégrines sont également impliquées dans le développement de métastases dans un tissu spécifique (organotropisme). En effet, elles sont fortement exprimées à la surface des exosomes et les guident vers une future niche métastatique (465). Par exemple, les exosomes exprimant les intégrines $\alpha 6\beta 1/\alpha 6\beta 4$ et $\alpha v\beta 5$ présentent un tropisme pulmonaire et hépatique (387).

Les intégrines peuvent dégrader indirectement la matrice extracellulaire via l'induction de l'expression de l'urokinase ou activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et de son récepteur uPAR, et de métalloprotéases matricielles (MMPs) (436). En effet, l'intégrine $\alpha v\beta 6$ augmente l'expression de MMP2 *in vitro* dans les cellules de cancers du pancréas et de l'ovaire (466,467), l'intégrine $\alpha v\beta 3$ induit la production

de MMP9 dans le cancer du sein (468,469) et l'intégrine $\alpha\beta1$ stimule la sécrétion de MMP2 dans les gliomes (470).

Enfin, les intégrines dictent le destin des cellules métastatiques dans la prolifération et l'état de dormance (387). Dans un contexte métastatique, il est intéressant de noter que l'activation de la sous-unité $\beta1$ induit la transformation de cellules tumorales dormantes en cellules tumorales actives. Ainsi la sous-unité $\beta1$ est impliquée dans les métastases ou les récurrences à long-terme (471).

La **Figure 19** représente l'implication des intégrines dans le processus tumoral.

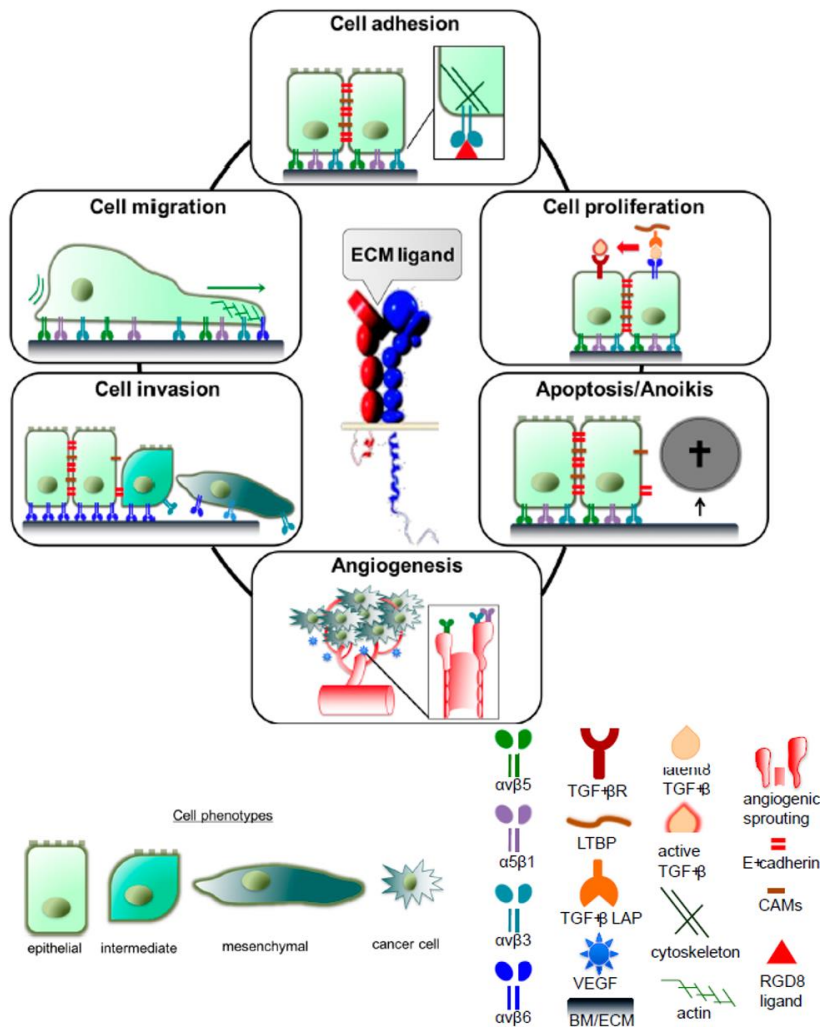


Figure 19 - Implication des intégrines dans le processus tumoral. Les intégrines participent à l'adhésion, la prolifération et la migration/invasion cellulaire, à la résistance à l'apoptose/anoïkis et à l'angiogénèse (400).

vii. Cellules souches tumorales

Comme nous l'avons décrit dans le GBM, l'existence de CSGs est responsable de l'initiation tumorale et de la formation de récives. Certaines intégrines sont exprimées par les cellules souches tumorales et sont impliquées dans leur auto-renouvellement et leur potentiel de croissance illimité. Dans le cancer du sein et le carcinome épidermoïque, l'intégrine $\alpha6\beta1$ contribue à l'auto-renouvellement des cellules souches tumorales *in vitro* (472). Il est important de noter que l'intégrine $\alpha6$ est exprimée dans plusieurs types de cellules souches tumorales, celles issues du cancer du sein, de la prostate, du colon et des GBMs (473–475).

Les sous-unités $\beta 4$ et $\beta 3$ sont également des marqueurs de cellules souches tumorales dans les cancers du poumon et du sein, respectivement (476–478). Plus récemment, il a été montré que la sous-unité $\alpha 7$ est également exprimée par les cellules souches tumorales de carcinomes de l'œsophage (479).

Dans le GBM, plusieurs intégrines sont exprimées par les CSGs et stimulent leur phénotype souche. La sous-unité $\alpha 6$ a été la première intégrine mise en évidence comme marqueur de CSGs. Selon l'étude de Lathia et al., 2010 (272), l'intégrine $\alpha 6$ permet d'identifier les CSGs quelle que soit l'expression de CD133. Elle est impliquée dans leur auto-renouvellement et leur interaction avec les cellules endothéliales présentes dans la niche périvasculaire (268,272). De manière similaire, une étude récente a montré que la sous-unité $\beta 8$ est exprimée par les CSGs localisées dans la niche périvasculaire (480). Au contraire de ces deux intégrines, les intégrines $\alpha 7$ et $\alpha 3$ sont exprimées par les CSGs présentes dans la niche invasive (481–483).

b) L'intégrine $\alpha 5\beta 1$

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$, le récepteur de la fibronectine, participe à la progression et l'agressivité tumorales de nombreux cancers. Elle est notamment surexprimée dans les cancers de l'ovaire (484), du poumon (485), du rein (486), du côlon (487), du sein (488) et des mélanomes (489,490). Ces observations ont mis en évidence le potentiel oncogénique de l'intégrine $\alpha 5$.

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ stimule la prolifération de cellules issues de tumeurs du poumon (491). De plus, elle apporte des signaux d'autosuffisance via la sur-régulation des protéines Akt et survivine, dans le cancer du sein, des mélanomes et du GBM (453,488,492). Dans les cellules de cancers ovariens, l'intégrine $\alpha 5$ assure également la survie de cellules non adhérentes en induisant l'expression de la protéine p53 mutée, leur permettant de se disséminer (448).

Par ailleurs, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ semble être également impliquée dans la résistance à la radio ou chimiothérapie de nombreux cancers. L'analyse immunohistochimique sur des coupes de tumeurs issues de patientes atteintes de cancer du col de l'utérus, a montré qu'une expression élevée de l'intégrine $\alpha 5$ est corrélée à une mauvaise réponse à la Cisplatine (493). Dans les cancers du rein et du pancréas, l'intégrine $\alpha 5$ augmente respectivement la résistance à la Mytomycine et à la radiothérapie (494,495). L'intégrine $\alpha 5$ régule également la sensibilité à la 5-azacytidine chez les patients atteints de myélodysplasie et de leucémies myéloïdes (496).

L'intégrine $\alpha 5$ augmente la capacité de migration des cellules tumorales. Sa surexpression, induite par l'hypoxie, amplifie la mobilité et la migration des cellules du cancer du sein *in vitro* et la formation de métastases pulmonaires *in vivo* (388,497). Sa dérégulation augmente l'invasion de cellules issues de cancers ovariens via l'activation du récepteur c-Met. Son inhibition montre une diminution de la croissance tumorale et du nombre de métastases *in vivo* et apporte une survie prolongée (428).

Enfin, son implication dans l'induction de métastases a été démontrée dans plusieurs cancers (388,486,498–500). A titre d'exemple, l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est augmentée dans les tumeurs rénales de haut grade métastatique comparé au bas grade (486). Des résultats similaires ont été mis en

évidence dans les tumeurs de l'œsophage ou de la prostate, où l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ favorise les métastases des ganglions lymphatiques et de la moelle osseuse respectivement (501,502).

Pour résumer, la surexpression et l'activation des intégrines peuvent être responsables de la progression et de l'agressivité tumorale (387,402,427). L'inhibition des intégrines $\alpha \beta 3$, $\alpha \beta 5$ et $\alpha 5 \beta 1$ est proposée comme une stratégie thérapeutique prometteuse dans certains cancers.

c) Utilisation clinique des inhibiteurs d'intégrines dans les cancers

Il existe différentes classes d'inhibiteurs d'intégrines : les anticorps monoclonaux, les molécules peptidiques et les molécules non peptidiques. Néanmoins, il est intéressant de noter que la sous-régulation de certaines intégrines peut également être corrélée à différentes caractéristiques de cancers. L'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ est sous-exprimée dans le cancer du sein, ce qui entraîne la dissémination tumorale. L'augmentation de son expression peut être une cible anti-tumorale dans ce cancer (402,503). De plus, dans le mélanome, l'inhibition de l'intégrine $\beta 1$ induit la perte d'adhésion cellulaire et rend les cellules chimiorésistantes. L'association d'un agent qui stimule $\beta 1$ avec une chimio ou radiothérapie semble être efficace dans les mélanomes métastatiques (504). Dans ces cas, la recherche d'agonistes peut être utile (395).

Différents antagonistes d'intégrines ont été proposés et testés en études cliniques dans la prise en charge de cancers avec un intérêt particulier pour l'intégrine $\alpha \beta 3 / \alpha \beta 5$.

L'**Intetumumab** est un anticorps monoclonal humain ciblant l'intégrine $\alpha \nu$. Des études précliniques ont montré que l'Intetumumab diminue l'adhérence, la migration et l'invasion de cellules tumorales de mélanome *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo* (505). Ce composé a été testé dans différents essais cliniques de phase I (mélanome, tumeurs solides réfractaires, cancer de la prostate métastatique et lymphome), dont les résultats ont montré une bonne tolérance (506,507). En ce qui concerne les essais cliniques de phase II, son association avec la Dacarbazine n'a pas mis en évidence de bénéfices cliniques dans le mélanome de stade IV (PFS = 2,5 mois vs 1,8 mois ; OS= 11 vs 8 mois comparé à la Dacarbazine seule) (NCT00246012) (508). De façon similaire, chez les patients atteints de cancer de la prostate métastatique, l'association du Docetaxel et de l'Intetumumab n'améliore pas la survie des patients (PFS=7 vs 11mois ; OS=17,2 vs 20,6 mois comparé au Docetaxel seul) (509) (NCT00537381).

L'**Etaracizumab** (MEDI-522 ou Abegrin) est un anticorps monoclonal humanisé, dirigé contre l'intégrine $\alpha \nu \beta 3$. Son efficacité a été testée dans une étude de phase II chez les patients atteints de mélanome. Associé ou non à la Dacarbazine, il n'augmente pas la survie des patients comparé au traitement standard (NCT00066196) (510). D'autres études de phase II chez les patients atteints de tumeurs rénales non opérables ou métastatiques (NCT00684996), de carcinomes métastatiques de la prostate (NCT0007293) et des cancers colorectaux (NCT00027729) ont été réalisées. Aucun résultat n'a été trouvé.

Le **Volociximab** (M200) est un anticorps monoclonal chimérique humanisé, inhibant l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$. Les études précliniques et cliniques seront décrites dans le paragraphe III.3a).

L'**Abituzumab**, un antagoniste ciblant l'intégrine αv , est un anticorps monoclonal humanisé. Il a été analysé dans les cancers de la prostate métastatiques (NCT01360840). Les résultats n'ont pas montré de gain de PFS. En revanche il diminue l'incidence de progressions osseuses (511). De façon similaire, aucune augmentation de survie n'a été mise en évidence chez les patients atteints de cancers colorectaux métastatiques, associé au traitement standard (Cetuximab et Irinotecan) (NCT01008475). Néanmoins, les données suggèrent une efficacité thérapeutique chez les patients exprimant fortement l'intégrine $\alpha v\beta 6$ (512).

Le **Cilengitide** (EMD121974) est un antagoniste peptidique (RGD cyclique) des intégrines $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$. *In vitro*, le Cilengitide sensibilise à la radiothérapie les cellules tumorales issues de cancers du poumon non à petites cellules, du sein et des GBMs (513,514). *In vivo*, il inhibe la formation de métastases pulmonaires d'ostéosarcomes (515). Il a été proposé pour traiter les tumeurs cérébrales pédiatriques, pour lesquelles les résultats d'une étude de phase II n'ont pas montré de bénéfice clinique (516). Dans trois études cliniques de phase II, l'absence d'efficacité clinique a également été mise en évidence chez les patients atteints de cancers de la prostate non métastatiques, de tumeurs du pancréas non résécables (associé à la Gemcitabine) et de mélanomes métastatiques (517–519). Enfin, il a été analysé chez les patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules. Une première étude de phase II a montré que le Cilengitide (à différentes doses) n'améliore pas la survie des patients comparé au Docétaxel (PFS=54, 63, 63 vs 67 jours et OS=173, 117, 181 et 194 jours pour le Cilengitide à 240, 400 et 600 mg/m² vs le Docétaxel)(520). En revanche, la deuxième étude de phase II a testé l'association du Cilengitide et du Cetuximab et a montré un bénéfice clinique comparé au Cetuximab seul (PFS=6,2 vs 5 mois et OS=13,2 vs 11,8 mois pour Cilengitide vs traitement standard) (521). Le Cilengitide a également été testé dans plusieurs études de phase II/II chez les patients atteints de GBM. Ces résultats seront présentés dans la partie III.1.

Pour conclure, les principaux antagonistes d'intégrines cités précédemment n'apportent pas de bénéfices cliniques dans différents cancers, associés ou non à d'autres chimiothérapies. Leur échec peut être expliqué par la redondance des intégrines. A titre d'exemple dans le cancer du sein, le TGF- β est activé par la sous-unité $\beta 1$. L'inhibition de cette intégrine entraîne une sur-régulation de la sous-unité $\beta 3$ qui maintient l'activation du facteur TGF- β (522). La pharmacologie des antagonistes est également pointée du doigt dans l'échec thérapeutique. En effet, ces molécules thérapeutiques sont conçues à partir de la nature des ligands, ce qui explique leur activité agoniste (398). Ces données ont été démontrées avec les antagonistes utilisés dans un contexte tumoral, mais également dans la prise en charge de troubles cardiovasculaires. A titre d'exemple, les antagonistes de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ à faible dose par voie orale induisent l'activation plaquettaire (398).

Enfin, il est intéressant de noter que détecter l'expression des intégrines peut être utilisé en diagnostic. En effet, la détection de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ dans le cancer du sein, à l'aide d'un radio traceur (^{99m}Tc-3P-RGD₂) permet d'évaluer l'efficacité d'un anti-angiogénique et de déterminer quel patient pourrait bénéficier d'anti-angiogéniques (523). Deux études cliniques (NCT00565721) évaluent l'angiogenèse tumorale à l'aide de la détection de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ ([¹⁸F]AH-111585) et de l'intégrine $\alpha v\beta 6$ ([¹⁸F]-R01-MG-F2) (NCT02683824).

III. Les intégrines dans le GBM

1. Les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$

Plusieurs intégrines sont surexprimées dans le GBM, par les cellules endothéliales et les cellules tumorales. Parmi celles-ci, les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ sont les plus étudiées. Une surexpression de ces hétérodimères est associée au grade tumoral et à un mauvais pronostic (524–526). Les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ sont particulièrement impliquées dans l'angiogenèse tumorale. Il a en effet été montré que la délétion transitoire de leur gène entraîne l'apoptose des cellules endothéliales tumorales *in vitro* et réduit la formation de nouveaux vaisseaux. Les intégrines $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ sont également responsables de la radiorésistance (527). Ainsi, cibler ces deux intégrines a semblé être une stratégie thérapeutique intéressante dans la prise en charge du GBM, dans le cadre de l'inhibition de l'angiogenèse. Des antagonistes spécifiques de ces deux hétérodimères ont été synthétisés afin de confirmer leur intérêt.

a) La synthèse d'inhibiteurs des intégrines $\alpha\beta3/\alpha\beta5$

La synthèse d'antagonistes des intégrines $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ est basée sur la structure RGD contenue dans les ligands qu'elles reconnaissent. Plusieurs intégrines reconnaissent ce motif via différentes protéines : les intégrines $\alpha5\beta1/\alpha\beta6/\alpha\beta8$, $\alpha11\beta3$ et $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ interagissent avec la fibronectine, le fibrinogène et la vitronectine (528). Ceci explique la complexité à synthétiser des ligands/antagonistes spécifiques pour chaque hétérodimère. L'équipe de H. Kessler (Munich) s'est attachée depuis de nombreuses années à obtenir des ligands sélectifs, en particulier des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha5\beta1$.

Une des premières étapes dans la synthèse d'antagonistes des intégrines $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ a été d'empêcher leurs interactions avec l'intégrine $\alpha11\beta3$. En effet, son inhibition non spécifique entraînerait des effets indésirables, notamment dans le système cardiovasculaire. Bien que ces deux intégrines possèdent en commun la sous-unité $\beta3$, le motif RGD ne présente pas la même conformation lorsqu'il se lie à l'une des deux intégrines (**Figure 20**). Cette différence a permis de synthétiser des antagonistes spécifiques de l'intégrine $\alpha\beta3$ (401,529).

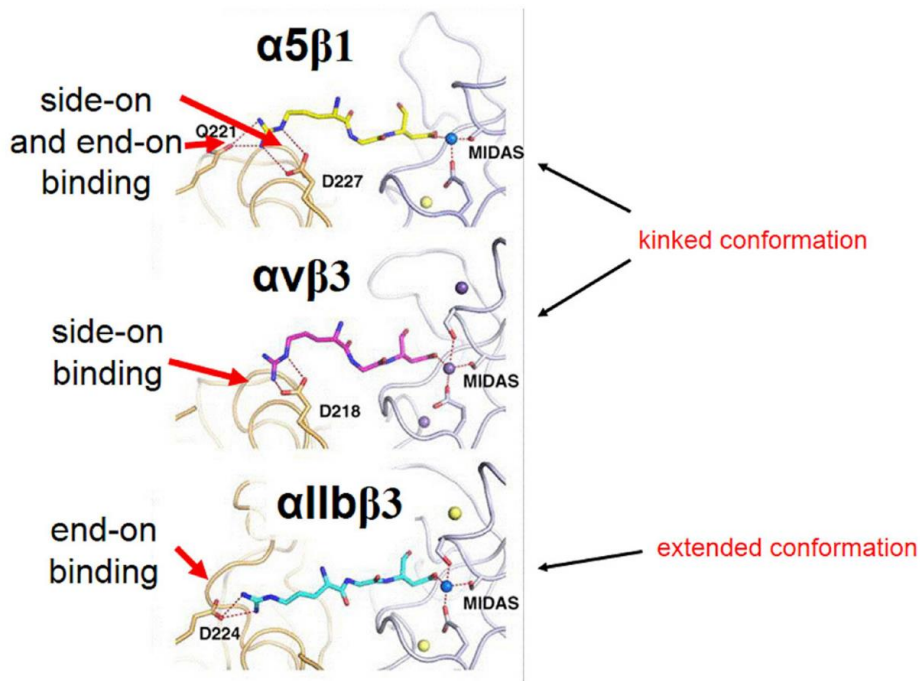


Figure 20 - Illustration des différentes interactions entre le motif RGD linéaire et les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ ou $\alpha IIb\beta 3$.

La synthèse d'antagonistes spécifiques de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ a reposé sur :

- **la cyclisation** : la sélectivité des intégrines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha IIb\beta 3$ repose sur la distance entre l'arginine et l'acide aspartique qui modifie la conformation du peptide (424). Un motif RGD linéaire peut présenter plusieurs conformations, induisant une absence de spécificité, tandis que la cyclisation réduit l'espace conformationnel et améliore l'affinité pour l'intégrine $\alpha v\beta 3$ (530). De plus, la poche de liaison de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ étant plus étroite, un ligand hexapeptidique présente une plus forte affinité, contrairement aux poches $\alpha v\beta 3/\alpha 5\beta 1$ pouvant recevoir un ligand pentapeptidique. Ainsi, la cyclisation du motif RGD a permis de diminuer l'affinité pour l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ et d'augmenter celle des intégrines $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ et $\alpha 5\beta 1$. A noter, la cyclisation permet également d'augmenter la stabilité.
- **Ajout d'un groupement aminé** : le groupement guanine, présent sur l'arginine du motif RGD, reconnaît la sous-unité αIIb . Sa substitution par un acide aminé (valine) permet de se fixer spécifiquement sur la sous-unité αv (528). Ainsi, l'affinité du motif c(RGDfV) présente une sélectivité 350 fois plus élevée pour $\alpha v\beta 3$ que $\alpha IIb\beta 3$ (401).
- **N-Méthylation** : l'ajout d'un groupe méthylé induit également des contraintes conformationnelles du squelette peptidique, ce qui améliore la sélectivité pour l'intégrine $\alpha v\beta 3$ au regard des hétérodimères $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 5$ (401,531,532).

Ces processus ont permis de synthétiser le Cilengitide, un peptide cyclique (c(RGD)(NMe)Val) (528). Néanmoins, comme la plupart des ligands décrits comme sélectifs, il présente une activité résiduelle vis-à-vis d'autres intégrines. De nouvelles améliorations ont été proposées, notamment :

- la substitution du groupement carboxylique, présent sur l'acide aspartique et interagissant avec le site MIDAS, par un acide hydroxamique apporte une meilleure sélectivité pour l'intégrine $\alpha\beta3$ au regard de l'intégrine $\alpha5\beta1$ (529),
- l'alkylation du groupement guanidine (présent sur l'arginine) empêche la liaison sur la sous-unité $\alpha5$ et améliore la sélectivité pour l'intégrine $\alpha\gamma$ (528),
- l'incorporation d'un résidu méthoxypyridine permet d'optimiser la liaison dans la poche de l'intégrine $\alpha\beta3$ au regard de l'intégrine $\alpha5\beta1$ (533).

b) Etudes pré-cliniques du Cilengitide

Comme nous l'avons écrit précédemment, le Cilengitide est un antagoniste sélectif des intégrines $\alpha\beta3/\alpha\beta5$. Celui-ci possède une IC_{50} de $0,61 \pm 0,06$ nM, de $8,4 \pm 2,1$ nM et de $14,9 \pm 3,1$ nM pour les intégrines $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ et $\alpha5\beta1$ (528). Il s'agit d'un inhibiteur peptidique cyclique contenant le motif RGD et bloquant la liaison des intégrines à la vitronectine (534). *In vitro*, le Cilengitide induit l'apoptose des cellules de GBM et la diminution de leur migration (535,536). En ce qui concerne les données *in vivo* issues de xénogreffes orthotopiques, le Cilengitide diminue la croissance et l'angiogénèse tumorales (537,538). De plus, il augmente la sensibilité des cellules endothéliales et tumorales de GBM à la radiothérapie *in vitro* et *in vivo* (539). Enfin, associé au Bevacizumab, le Cilengitide diminue l'invasion des cellules de GBM *in vivo* (540).

c) Etudes cliniques de phase I du Cilengitide

L'étude de phase I de Nabors et al., 2007 (541) a analysé l'action du Cilengitide (de 120 à 2400 mg/m² administré deux fois par semaine en i.v) chez 51 patients atteints de GBMs récurrents. L'étude confirme l'activité anti-tumorale clinique. En effet, une réponse complète, partielle et une stabilisation de la maladie ont été observées chez 2, 3 et 16 patients respectivement. La survie médiane est de 5,6 mois.

En parallèle, une étude de phase I/II a testé l'efficacité du Cilengitide (500mg/m², deux fois par semaine en iv) associé au protocole Stupp chez les patients nouvellement diagnostiqués (165). Les résultats de l'étude montrent qu'il apporte un bénéfice clinique, comparé au traitement standard (PFS=8 mois et OS=16,1). De manière intéressante, cette étude a mis en évidence une amélioration de la survie des patients atteints de GBM dont le promoteur de la MGMT est méthylé avec l'association du Cilengitide au protocole Stupp (PFS=13,4 vs 3,4 mois et OS=23,2 vs 13,1 mois pour les GBMs dont le promoteur de la MGMT est méthylé vs non méthylé). Selon cette étude, le gain clinique apporté par le Cilengitide peut être expliqué par la normalisation de la vascularisation, induite par l'inhibiteur d'intégrine, qui améliore la délivrance et l'efficacité du TMZ chez les patients non résistants aux agents méthylants (165).

Plus récemment, une étude de phase I a testé l'association du Cilengitide et du Cediranib (pan inhibiteur du VEGF) dans les GBMs récurrents (542). L'étude montre des résultats décevants, le Cilengitide n'apportant pas d'amélioration de la survie des patients comparés aux thérapies anti-VEGF (OS de 6,5 mois et PFS de 1,9 mois).

d) Etudes cliniques de phase II du Cilengitide

Compte tenu des résultats encourageants des essais cliniques précédents de phase I, l'étude du Cilengitide chez les patients atteints de GBM a été poursuivie. L'étude de Reardon et al., 2008 (543) a analysé l'efficacité du Cilengitide (500 et 2000 mg/m², deux fois par semaine en i.v) dans les GBMs récurrents. Bien que les résultats mettent en évidence une meilleure efficacité à haute dose, ils restent modestes (PFS de 6 mois = 15% ; OS= 9,9 vs 6,5 mois). En effet, un agent thérapeutique est considéré comme intéressant lorsqu'il apporte une amélioration de 10% de la PFS à 6 mois, soit une PFS de 6 mois de 25%.

En ce qui concerne les patients nouvellement diagnostiqués, l'étude de Nabors et al., 2012 (166) a testé le Cilengitide (500 vs 2000 mg/m², deux fois par semaine en i.v) associé au protocole Stupp. Les résultats montrent un bénéfice clinique plus important avec le Cilengitide à haute dose (OS= 17,4 vs 20,8 mois à 500 mg/m² vs 2000 mg/m²). De manière similaire à l'étude de phase I (544), il a également été mis en évidence une meilleure efficacité chez les patients atteints de GBM dont le promoteur de la MGMT est méthylé (OS=30 vs 17.4 mois). Face à ces résultats encourageants, une étude de phase III CENTRIC (NCT00689221) a analysé l'efficacité de l'association Cilengitide/TMZ/RT chez les patients nouvellement diagnostiqués, dont le promoteur de la MGMT est méthylé (167). Les résultats prometteurs observés dans les études précédentes n'ont malheureusement pas été confirmés (OS=26,3 vs 26,3 mois ; PFS= 13,5 vs 10,7 mois pour les patients traités avec et sans le Cilengitide). En parallèle, l'étude de phase II (CORE) a testé deux rythmes d'administration (2000 mg/m² deux fois par semaine ou 2000 mg/m² cinq fois par semaine) de Cilengitide, associé au protocole Stupp, chez des patients nouvellement diagnostiqués dont le promoteur de la MGMT est non méthylé (168). Cette étude avait pour but de déterminer l'efficacité et la tolérance du Cilengitide à dose intensive, chez les patients ayant un plus faible pronostic de survie. De façon similaire à l'étude CENTRIC, les résultats ne montrent pas de bénéfice clinique du Cilengitide comparé au protocole Stupp (OS=13,4 vs 16,3 vs 14,5 mois ; PFS= 4,1 vs 5,6 vs 5,9 mois pour le traitement standard et le Cilengitide à moyenne et haute dose). Néanmoins, il est étonnant de constater de meilleurs résultats avec le Cilengitide à dose standard (2000 mg/m² deux fois par semaine) comparé à une plus forte dose.

Ces deux essais cliniques n'ayant pas mis en évidence d'amélioration de la survie par le Cilengitide, le développement de ce composé a été arrêté en 2013 par Merck.

e) L'échec du Cilengitide

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'échec du Cilengitide.

- **Problème pharmacologique** : selon sa concentration, l'effet biologique du Cilengitide est soit antagoniste soit agoniste de l'intégrine $\alpha\beta3$. Il est pro-angiogénique à faible dose et anti-angiogénique à haute dose (545,546) . En effet, à faible dose, le Cilengitide empêche le trafic membranaire de l'intégrine $\alpha\beta3$ et du VEGFR2, ce qui augmente l'angiogenèse (546). Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'étude de Wong et al., 2015 (547) propose d'utiliser le Cilengitide à faible dose couplé à la Gemcitabine, afin d'améliorer sa délivrance dans le cancer du pancréas.

- **Problème pharmacocinétique** : la demi-vie du Cilengitide est faible (2-4h), ce qui ne semble pas idéal pour un effet anti-angiogénique prolongé.
- **Protocole thérapeutique non adéquat** : l'étude de Christmann et al., 2017 (548) a montré que la radiothérapie stimule l'expression de l'intégrine $\alpha\beta3$, ce qui pourrait diminuer l'efficacité du Cilengitide. Selon cette étude, le Cilengitide pourrait être plus efficace associé uniquement avec le TMZ. Ces données sont contradictoires avec l'étude qui a montré que le traitement de Cilengitide sensibilise les cellules à la radiothérapie (539).
- **Stratification des patients** : l'étude de Wick et al., 2016 (123) a analysé, à posteriori, l'expression par immunohistochimie des intégrines $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ chez les patients recensés dans les études CORE et CENTRIC. Les résultats montrent une corrélation entre le taux élevé de l'intégrine $\alpha\beta3$ dans la tumeur (mais pas dans les vaisseaux) et une amélioration de la survie des patients ayant bénéficié de l'association Cilengitide/TMZ/RT dans l'étude CORE. Ces résultats n'ont pas été mis en évidence dans l'étude CENTRIC. Cette étude souligne trois points. Premièrement, la stratification des patients en fonction de l'expression de la cible semble indispensable. Deuxièmement, le statut MGMT ne semble pas être un marqueur indiquant l'intérêt clinique du Cilengitide. En revanche, une étude récente a mis en évidence une sous-population de GBM sensible au Cilengitide. Celle-ci est définie par une signature génétique basée sur une forte expression de l'intégrine $\alpha\beta3$ et du transporteur à haute affinité du glucose (Glut3) et sur l'addiction pour Glut3 (549). Troisièmement, les effets du Cilengitide ne seraient pas en relation avec son effet anti-angiogénique.

Pour conclure, cette première étude clinique de phase III avec un inhibiteur de l'intégrine $\alpha\beta3$ a mis en doute l'intérêt de cibler les intégrines en général. Cependant, malgré cet échec, l'optimisation de l'utilisation du Cilengitide et une meilleure stratification des patients permettraient d'améliorer son efficacité. Par ailleurs, d'autres intégrines sont surexprimées et sont impliquées dans l'agressivité du GBM, faisant d'elles des cibles thérapeutiques pertinentes.

2. Les autres intégrines

De manière similaire aux intégrines $\alpha\beta3/\alpha\beta5$, les intégrines $\alpha6\beta4$, $\alpha5\beta1$, $\alpha\beta6$, $\alpha6\beta1$ et $\alpha\beta8$, et les sous-unités $\alpha3$ et $\alpha7$ sont également surexprimées dans le GBM et leur expression est associée à un mauvais pronostic (272,402,452,462,482,550–552). L'étude récente de Malric et al., 2017 (553) a montré la corrélation entre la survie des patients et l'expression des intégrines selon la banque de données du TCGA. Les résultats montrent que la surexpression des sous-unités $\beta1$, $\beta3$, $\alpha3$ et $\alpha5$ est associée à une mauvaise survie.

Comme nous l'avons décrit, les intégrines $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ et $\alpha5\beta1$ sont particulièrement impliquées dans l'angiogenèse et sont des cibles thérapeutiques pertinentes dans la prise en charge du GBM, une tumeur hautement angiogénique (554). Néanmoins, le rôle pro-angiogénique de l'intégrine $\alpha\beta3$ est sujet à débat. En effet, la délétion des gènes des sous-unités α , $\beta3$ et $\beta5$ chez les souris a montré le maintien de la vasculogenèse et de l'angiogenèse (555,556). Ces données ont été confirmées chez l'homme où la mutation de la sous-unité $\beta3$ (syndrome de thrombasthénie de Glanzmann) est associée à un développement vasculaire (557). De plus, la délétion de la sous-unité $\beta3$ entraîne une augmentation des voies de signalisation

angiogéniques, notamment celle du VEGF (558). Enfin, l'intégrine $\alpha\beta3$ n'est pas exprimée uniquement par les cellules endothéliales lors de l'angiogenèse, mais également par les macrophages et les cellules tumorales. Ceci suggère que l'action biologique de l'intégrine n'influence pas le développement vasculaire et qu'il ne s'agit pas d'un biomarqueur pertinent de l'angiogenèse (559).

En ce qui concerne l'intégrine $\alpha5\beta1$, aucune donnée ne semble contredire son rôle dans l'angiogenèse. En effet, la délétion de son gène dans des modèles animaux empêche la formation de vaisseaux sanguins et entraîne une mort embryonnaire (560). De plus, l'expression de l'intégrine $\alpha5\beta1$ est augmentée pendant l'angiogenèse et est impliquée dans la survie des cellules endothéliales. Il s'agit donc d'un meilleur marqueur reflétant l'angiogenèse et d'une cible thérapeutique pertinente (561–564). De manière intéressante le ligand de l'intégrine $\alpha5\beta1$, la fibronectine, semble également participer à l'agressivité du GBM. En effet, son taux d'ARNm est augmenté dans les GBMs comparé au tissu sain (565). Une analyse immunohistochimique a mis en évidence une sécrétion de la fibronectine par les cellules d'astrocytomes lors de l'angiogenèse (566). Plus récemment, le rôle de la fibronectine dans l'invasion cellulaire a également été montré dans des modèles précliniques (567). Enfin, contrairement à l'intégrine $\alpha\nu$ qui s'assemble à plusieurs sous-unités β , la sous-unité $\alpha5$ est associée uniquement avec $\beta1$. Ces données suggèrent que l'utilisation d'antagonistes ciblant l'intégrine $\alpha5$ apporterait des résultats plus spécifiques.

3. L'intégrine $\alpha5\beta1$

a) Les antagonistes de l'intégrine $\alpha5\beta1$

La recherche de ligands antagonistes de l'intégrine $\alpha5\beta1$ est moins développée que pour l'intégrine $\alpha\beta3$. Les sous-unités $\alpha5/\alpha\nu$ et $\beta1/\beta3$ présentent des homologies de structure de 46% et 45% respectivement, rendant la synthèse de ligands spécifiques difficile (568). Néanmoins plusieurs inhibiteurs spécifiques de l'intégrine $\alpha5\beta1$ ont été formulés.

Il existe trois catégories d'antagonistes de l'intégrine $\alpha5\beta1$: un anticorps humanisé, des inhibiteurs peptidiques et des molécules non-peptidiques (**Figure 21**).

i. **Anticorps humanisé ciblant l'intégrine $\alpha5$**

Le Volociximab est un anticorps monoclonal chimérique humanisé, inhibant l'intégrine $\alpha5\beta1$. Des analyses précliniques ont mis en évidence une diminution de la croissance de métastases hépatiques de tumeurs primaires du colon *in vivo* (569). Les données cliniques de phases I montrent que le Volociximab n'induit pas de toxicité sévère (570). En ce qui concerne les études cliniques plus avancées (phase II), ce composé n'apporte pas d'amélioration de la survie de patientes atteintes de cancers de l'ovaire résistants au Platiniom (NCT00782093) (571). Ce composé a également été testé dans plusieurs études de phase II sans publications des résultats (mélanome, cancers métastatiques rénaux et pancréatiques, et cancer du poumon non à petites cellules de stade III et IV).

ii. Peptides antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

L'ATN-161, est un antagoniste peptidique ciblant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Il ne contient pas le motif RGD, mais une séquence synergique Pro/His/Ser/Arg/Asn (PHSCN) indispensable à la fixation de la fibronectine (471). Il s'agit d'un pentapeptide linéaire (Ac-PHSCN-NH₂) ayant une haute affinité uniquement pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (528). L'ATN-161 présente une activité anti-angiogénique *in vitro* (572,573). Des résultats précliniques montrent que l'administration de l'ATN-161 diminue la croissance tumorale de cellules de cancer du sein et le développement de métastases (574). De manière similaire, associé au 5-FU, l'ATN-161 diminue le nombre de métastases hépatiques de cancer du côlon (569). Plus récemment, l'étude de Zhang et al., 2017 (575) a conjugué l'ATN-161 à la Doxorubicine afin de favoriser la délivrance de la chimiothérapie. *In vivo*, le complexe diminue la croissance de mélanomes et améliore significativement la survie des souris.

L'efficacité de l'ATN-161 associé à la Carboplatine a été analysée dans une étude clinique de phase I/II, chez les patients atteints de tumeurs cérébrales (NCT00352313). Il a également été testé dans une étude de phase II dans les carcinomes rénaux (NCT00131651). Aucun résultat n'a été publié.

iii. Petites molécules non peptidiques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

De manière similaire à la synthèse d'antagoniste de l'intégrine $\alpha v\beta 3$, la recherche de ligands inhibiteurs spécifiques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ s'est reposée sur la présentation du motif RGD lors de son interaction avec l'hétérodimère. Deux éléments majeurs modifient l'orientation du motif RGD lorsqu'il se présente sur l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, comparé à l'intégrine $\alpha v\beta 3$:

- La sous-unité $\beta 3$ contient deux arginines (position 214 et 216), tandis que la sous-unité $\beta 1$ possède une glycine (position 217) et une leucine (position 219). Ainsi, la substitution des arginines entraîne un élargissement de la poche de la liaison de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, qui a pour conséquence de permettre l'introduction de fragments plus volumineux dans l'intégrine $\alpha 5\beta 1$.
- La sous-unité $\alpha 5$ présente une alanine (position 159) et une glutamine (position 221) à la place d'un acide aspartique (position 150) et d'une thréonine (position 212), ce qui induit une structure de pH plus basique que l'intégrine αv .

Au regard de ces deux différences, l'étude de Heckmann et al., 2007 (576) a proposé de synthétiser des antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ contenant un échafaudage de tyrosine, qui augmente l'affinité pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ de 300 fois comparée à l'intégrine $\alpha v\beta 3$. En effet, cette structure contient un groupement carboxylate qui interagit avec le métal (Ca²⁺ ou Mn²⁺) de la région MIDAS localisé sur la sous-unité $\beta 1$ et une pyridine qui s'insère au sommet de la sous-unité $\alpha 5$ (577). Afin d'améliorer la sélectivité, la synthèse d'antagoniste spécifique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ s'est basée sur la substitution de groupement aminé de la tyrosine.

Les travaux de Heckmann et al., 2008 (577) ont fait ressortir l'intérêt d'une liaison amide qui favorise l'affinité pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, au contraire d'une liaison sulfamide qui la diminue. Suite à cette constatation, différents groupements volumineux, de types aromatiques, ont été analysés. A titre d'exemple, un groupement mésitylène (IC₅₀ de 2,5 nM et 703 nM pour les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$), un groupement phénylurée (IC₅₀ de 1094 nM et 37 nM pour les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$) ont été testés. Finalement le composé le

plus sélectif comprend une structure amide et un groupement aromatique méthylé en position « para » (deux groupements méthyles localisés en position 2 et 6 sur le benzène) (IC_{50} de 3,1 nM et 1624 nM pour les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha \nu\beta 3$).

Cette conformation « para » semble être primordiale pour la sélectivité de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. En effet, leur substitution par des groupements chlore diminue l'affinité. Le motif méthylé entraîne une rotation de l'anneau aromatique autour de la liaison amide, qui relie le motif tyrosine, ce qui permet à l'antagoniste de s'insérer dans la poche de la sous-unité $\beta 1$. Au contraire, la sous-unité $\beta 3$ ne peut recevoir ce ligand présenté selon cette orientation. De plus, la présence des groupements méthylés en position 2 et 6 apporte une hydrophobicité qui améliore la fixation sur l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Ces différentes modifications ont permis de synthétiser le composé k34c.

Par ailleurs, dans cette même étude (577), il a été montré qu'un échafaudage composé d'une glycine apporte également une sélectivité pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (de plus de 6000 fois). Ce résidu présente une rigidité augmentée comparée à la tyrosine qui est flexible. Ce gain de rigidité favorise davantage le placement de l'amide aromatique à l'extérieur de l'intégrine $\alpha \nu\beta 3$. De manière similaire à la tyrosine, la glycine est reliée à un groupement aromatique par une liaison amide. Cette synthèse a permis d'obtenir un antagoniste (Fr248) encore plus sélectif envers l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. La structure des antagonistes de l'intégrine est représentée sur la **Figure 21**.

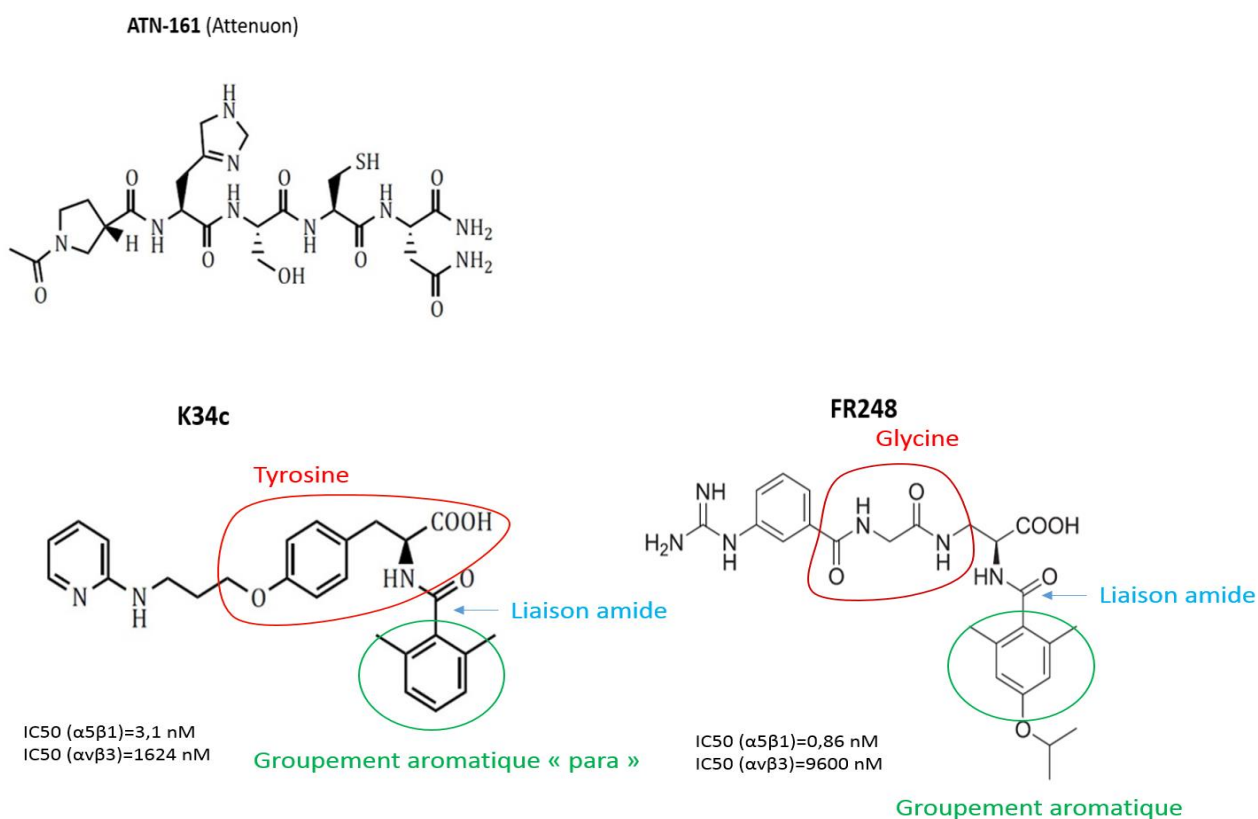


Figure 21 - Ligands antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

Pour résumer, l'intégrine $\alpha\beta3$ représente l'hétérodimère le plus étudié et pour lequel le plus d'antagonistes ont été développés. Néanmoins, l'intérêt grandissant pour l'intégrine $\alpha5\beta1$ a entraîné la synthèse de plusieurs antagonistes spécifiques. Les tests ayant validé leur affinité sont basés sur des tests d'adhérence sur les substrats spécifiques de chaque intégrine et leur IC_{50} a été calculé à partir de tests ELISA. Peu de données ont démontré leur effet dans un contexte cellulaire plus complexe.

b) L'intégrine $\alpha5\beta1$ dans le GBM : les travaux du laboratoire

Comme indiqué précédemment (paragraphe II2b), l'intégrine $\alpha5\beta1$ est impliquée dans de nombreux processus pro-tumoraux et dans différents types de tumeurs. Le laboratoire s'intéresse depuis plus de 10 ans à son impact dans les tumeurs cérébrales. Très peu de données étaient disponibles à ce sujet. Ainsi, les premiers travaux ont porté essentiellement sur les lignées établies de GBM (U87MG, U373...). Son implication dans l'agressivité du GBM a ainsi pu être mise en évidence.

L'intégrine $\alpha5\beta1$ augmente la migration des cellules de GBMs (578). Il a été montré que son activation régule la voie de la β -caténine. En effet, l'inhibition de l'intégrine par un antagoniste empêche la transactivation de la β -caténine, ce qui diminue la migration des cellules de GBMs (464). Un environnement riche en fibronectine favorise l'évasion, à partir de sphères tumorales, et la dissémination des cellules de GBM exprimant l'intégrine $\alpha5$ (579).

Il a également été montré que l'intégrine $\alpha5$ a un rôle majeur dans la résistance à la chimiothérapie (TMZ) via la protéine p53 (452,453,580). En effet, l'équipe a mis en évidence, dans des lignées cellulaires présentant un statut p53 sauvage, une relation croisée négative entre l'intégrine $\alpha5$ et la protéine p53 (qui n'existe pas dans les cellules p53 mutée). L'intégrine $\alpha5$ inhibe l'action pro-apoptotique et au contraire stimule la sénescence cellulaire médiée par la protéine p53 (580). L'apoptose est rétablie par l'inhibition de l'intégrine $\alpha5$ par ses antagonistes (SJ749 ou K34c) (452). Inversement, l'activation de la protéine p53 par un agent non génotoxique (la nutlin-3a) réprime l'expression de l'intégrine $\alpha5\beta1$ (452,453). Cette boucle de rétrocontrôle entre l'intégrine et la protéine p53 fait intervenir les protéines PEA-15 et survivine, que l'on peut proposer comme de nouvelles cibles thérapeutiques (453).

En parallèle, les travaux du laboratoire ont montré que le taux d'ARNm de l'intégrine $\alpha5$ est corrélé au grade du gliome et à la survie des patients (452). Ces résultats ont été confirmés par d'autres équipes (553,581,582). L'analyse immunohistochimique de l'intégrine $\alpha5$ sur des coupes de GBMs de patients (collaboration Pr Chauffert, Lille) confirme au niveau protéique cette tendance (manuscrit en préparation) (**Figure 22**). Ces travaux ont également révélé le caractère hétérogène de l'expression de l'intégrine $\alpha5$ que cela soit entre les différents GBM évalués mais également au sein d'un même GBM.

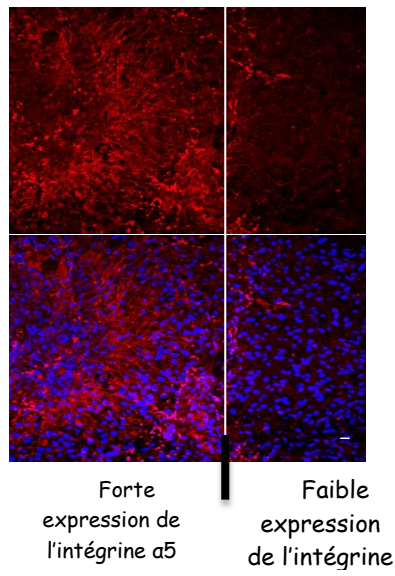


Figure 22 - Des zones de forte expression contiennent des zones de faible expression. Immunomarquage de la sous-unité $\alpha 5$. Noyaux colorés au DAPI.

L'ensemble de ces données suggère que l'inhibition de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ est prometteuse dans la prise en charge des GBMs.

Les objectifs de l'étude

Le glioblastome (GBM) est la tumeur la plus agressive du système nerveux central. Le traitement actuel repose sur l'association d'une résection chirurgicale la plus complète possible et d'une radio- et chimiothérapie concomitante (Témozolomide-TMZ), suivie d'une chimiothérapie adjuvante (TMZ) pendant 6 mois (79). Malgré ce lourd traitement la survie des patients ne dépasse pas 18 mois. Trouver de nouvelles cibles thérapeutiques est un véritable enjeu. Les résultats précliniques, *in vitro* et *in vivo*, sur de nouveaux marqueurs/cibles thérapeutiques apportent des résultats encourageants, qui malheureusement ne se confirment pas chez les patients. Ces échecs s'expliquent par le caractère hétérogène du GBM se traduisant par une hétérogénéité inter-tumorale et intra-tumorale (184,583). Il devient nécessaire de comprendre l'origine et de caractériser cette hétérogénéité pour les cibles thérapeutiques potentielles afin de permettre la proposition de nouveaux traitements. Il est aujourd'hui admis que la masse tumorale d'un GBM est composée de cellules tumorales différenciées hétérogènes mais aussi, en plus faible quantité, de cellules souches de GBM (CSGs). Elles ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en cellules tumorales « différenciées » qui formeront la masse du GBM. Les CSGs seraient responsables de l'initiation tumorale et des récurrences mais également du caractère hétérogène du GBM. Les études sur l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, le récepteur de la fibronectine, montrent son implication dans la chimiorésistance (452,453) et la migration du GBM (464,579). En relation avec la clinique, l'expression élevée de l'intégrine $\alpha 5$ est reliée à un mauvais pronostic.

Cependant, l'expression protéique de l'intégrine $\alpha 5$ est hétérogène lorsque l'on compare les GBMs entre eux (hétérogénéité inter-tumorale) ou lorsque l'on évalue cette expression dans une même tumeur (hétérogénéité intra-tumorale). Nous avons émis l'hypothèse que cette hétérogénéité provenait de l'existence de cellules souches de GBM de caractéristiques moléculaires différentes. Dans ce contexte, les objectifs principaux de cette thèse ont été:

- D'évaluer l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans des cellules souches de GBM, avant et après différenciation.
- De mettre en relation cette expression avec le phénotype plus ou moins agressif des tumeurs.

La 1^{ère} partie de mon manuscrit est consacrée ces objectifs principaux. Ces travaux étudient les différences phénotypiques, en relation avec l'expression de l'intégrine, au sein de lignées, de clones et de modèles génétiquement modifiés pour exprimer l'intégrine $\alpha 5\beta 1$.

En plus de mes travaux se focalisant sur l'expression hétérogène de l'intégrine dans les cellules souches de GBM, j'ai également étudié le rôle de l'intégrine $\alpha 5$ dans les carcinomes utérins. Ces résultats seront décrits dans la Partie 2.

J'ai également participé à des travaux de l'équipe aboutissant à deux publications et à une revue dans des journaux à comité de lecture. Ces études seront détaillées dans la Partie 3.

Matériel et méthodes

I. Partie I

1. Culture et modèles cellulaires

a) Culture en condition souche

Les lignées NCH644 et NCH421k (collaboration Dr Herold-Mende, Heidelberg) et les lignées 5706 et 3731 (collaboration Dr Ahmed Idbah, Paris) sont des cellules souches de GBM issues de patients. Celles-ci sont cultivées dans du milieu DMEM/F12 (Dominique Dutscher) supplémenté avec du BSA Insulin Transferrine (BSA-100° (20%) (Provitro)), et les facteurs de croissance EGF (20ng/mL) (Reliatech), bFGF (20ng/mL) (Reliatech) et 2% d'Ultraglutamine (Lonza). Dans ces conditions les cellules se présentent sous forme de neurosphères. Les neurosphères sont récupérées dans un Falcon et sont centrifugées pendant 5 minutes à 1300 rpm. Afin de dissocier les sphères, le culot est repris par de l'Accutase (Sigma). Le Falcon est maintenu dans un incubateur sous atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂ pendant quelques minutes. Une quantité de 400 000 cellules est repiquée dans 10 mL. Les cellules sont maintenues dans un incubateur sous atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂.

b) Culture en condition différenciée

La différenciation est induite par le milieu DMEM/F12 supplémenté à 10% de sérum de veau fœtal (DMEM/F12/SVF10%) (Lonza) et 2% d'Ultraglutamine (Lonza). Après dissociation des neurosphères par l'Accutase (Sigma), les CSGs sont centrifugées pendant 5 minutes à 1300 rpm. Le culot est repris par le milieu DMEM/F12/SVF10%. Une densité cellulaire de 10⁶ cellules/mL de CSGs estensemencée dans le milieu de différenciation. Les cellules différenciées sont maintenues dans ce milieu sur plusieurs semaines, dans un incubateur sous atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂.

Afin d'obtenir une différenciation totale, le culot de CSGs est repris par le milieu de différenciation DMEM/F12/SVF10% supplémenté par 10µM d'acide tout trans rétinolique (ATRA) (Sigma). Les cellules sont maintenues dans ce milieu pendant une semaine, dans un incubateur sous atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂.

Dans les protocoles suivants, l'utilisation du terme DMEM/F12 correspond au milieu DMEM/F12 supplémenté avec 2% d'Ultraglutamine.

c) Transfection stable de l'intégrine α5

La lignée souche NCH421k a été transfectée de manière stable pour exprimer la sous-unité de l'intégrine α5.

Nous avons testé différents protocoles afin d'améliorer l'efficacité de la transfection. Nous avons notamment fait varier le nombre de cellules transfectées (200 000 à 500 000 cellules), l'agent de transfection (lipofectamine ou Jetprime) et la quantité de plasmide à transférer (1 à 2,5µg). Le protocole suivant décrit les meilleures conditions.

Une quantité de 500 000 cellules par puits (plaque 6 puits) estensemencée dans 2 mL de milieu DMEM/F12 supplémenté par les facteurs de croissance (BIT-100, EGF, bFGF). Le plasmide pcDNA3.1 (Invitrogen) contenant le gène de l'intégrine $\alpha 5$ est transfecté à l'aide de la lipofectamine (Fisher scientific). Brièvement, 2,5µg de plasmide sont dilués dans 150µL de milieu Optimem (Lonza) et 6µL de lipofectamine (Fisher scientific) dans 150µL de milieu Optimem (Lonza). Après 5 minutes, les deux dilutions sont mélangées et maintenues pendant 25 minutes à température ambiante. Le mélange est ensuite ajouté goutte à goutte dans les 2mL de suspension cellulaire. Cette même manipulation est réalisée avec un plasmide non codant.

La sélection des cellules NCH421k transfectées est réalisée 48 heures après la transfection, par tri cellulaire. Les cellules sont récupérées selon le protocole I.1). Une quantité de 300 000 cellules (en duplicata) est centrifugée pendant 5 minutes à 1300 rpm. Les culots sont repris dans 100µL de tampon (PBS/BSA 0,5%/EDTA 2mM). Les cellules sont incubées pendant 15 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière, soit avec 6,5µg/mL d'anticorps primaire fluorescent reconnaissant l'intégrine $\alpha 5$ ($\alpha 5$ -PE, BioLegend), soit sans anticorps (condition non marquée). Suite au marquage, les cellules sont centrifugées à 1500 rpm pendant 8/10 minutes. Le culot est resuspendu dans 1mL de tampon (PBS/BSA 0,5%/EDTA 2mM). Après une seconde centrifugation, les cellules sont reprises dans 200µL de tampon (PBS/BSA 0,5%/EDTA 2mM). Enfin, les cellules sont filtrées (filtre stérile de 50 µm) afin d'obtenir une suspension de cellules isolées. Les cellules sont maintenues à 4°C.

L'ensemble des cellules exprimant potentiellement l'intégrine $\alpha 5$ est sélectionné via l'intensité de fluorescence (cymomètre en flux, IGBMC). La suspension cellulaire est récupérée dans un tube de FACS stérile contenant le milieu souche supplémenté par 1% de Pénicilline/Streptomycine et Fungizone (Lonza). Les cellules sont amplifiées sans agent de sélection.

A l'issue du contrôle de l'efficacité du tri cellulaire, nous avons dû réaliser une seconde sélection. Selon le même protocole, nous avons isolé les cellules exprimant potentiellement l'intégrine $\alpha 5$ par tri cellulaire (1 cellule/puits dans une plaque 96 puits). Un total de 126 clones est récupéré.

Les différents clones et lignées ont été authentifiés tous les 6 mois par la société Multiplexion (Allemagne).

d) Délétion transitoire de l'intégrine $\alpha 5$

Nous avons délété transitoirement le gène de l'intégrine $\alpha 5$ par si-RNA dans les cellules différenciées.

Les cellules sontensemencées à une densité cellulaire de 250 000 cellules/T25, comprenant 4mL de milieu DMEM/F12/SVF 10%, 24 heures avant la transfection.

Une quantité de 25nM de plasmide non codant (siGENOME Non-targeting Dharmacon) et de plasmide ciblant l'intégrine $\alpha 5$ (smart pool ON-TARGET plus $\alpha 5$ si-RNA Dharmacon) est diluée dans 200µL de Buffer

Jetprime (Polyplus Transfection), puis 4µL de Jetprime sont ajoutés. L'ensemble est vortexé 10 secondes, puis laissé à température ambiante pendant 10 minutes. La réaction est ajoutée à la suspension cellulaire goutte à goutte. L'efficacité de la transfection est confirmée après 24 heures.

2. Western blot

Les cellules sont lysées par du tampon de lyse (PBS/Napii 100mM/Na₃VO₄ 1mM/NaF 100mM/Triton 1%). Brièvement le culot cellulaire est repris dans 60-80µL de tampon de lyse. La suspension cellulaire est vortexée toutes les 10 minutes pendant 30 minutes à 4°C. Après une sonication, une seconde série de vortex (toutes les 10 minutes pendant 30 minutes à 4°C) est effectuée. La suspension cellulaire est centrifugée pendant 10 minutes à 13 000 rpm et à 4°C. Le surnageant est récupéré et dosé à l'aide du kit DC Protein Assay kit (Biorad). Enfin, les échantillons sont dilués dans du tampon Laemmli (x2 BioRad) associé à 2,5% de β-mercaptoéthanol (ROTH).

Les protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE (4-20%) (BioRad) pendant 30 minutes à 240V. Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (GE Healthcare) préalablement activée par l'éthanol. Le transfert se déroule à 100V pendant 30 minutes. Les membranes sont saturées par 5% de lait (Biorad) ou 3% de BSA (Euromedex) à température ambiante puis incubées avec l'anticorps primaire à 4°C O/N. Après lavage avec un tampon TBS/Tween (TBST), les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire (1/5000) couplé à la HRP (Promega). Le complexe est révélé par la technique de chimioluminescence (ECL, Biorad) à l'aide du Las4000 (GE Healthcare). Enfin, l'analyse d'images et la quantification des protéines sont réalisées avec le logiciel ImageJ.

Anticorps utilisés : anti-α5 D7B7G (Cell signaling, dilué au 1/1000 dans 5% de lait), anti-α6 3750 (Cell signaling, 1/1000 dans 5% de lait), anti-Sox2 2748S (Cell signaling, 1/1000 dans 3% de BSA), anti-GFAP MAB360 (Millipore, 1/1000 dans 5% de lait), anti-β1 AB1952 (millipore, 1/500 dans 5% de lait) et anti-GAPDH MAB374 (Millipore, 1/5000).

3. RT-qPCR

L'extraction d'ARN est effectuée selon le protocole du kit RNeasy mini kit (Qiagen) et son dosage sur un Nanodrop (ThermoScientific). La transcription des ARNs extraits s'effectue selon le protocole du kit iScript cDNA (BioRad).

La PCR en temps réel utilise l'agent SYBR Green (Fast SYBR green Master Mix, Applied Biosystems) à l'aide de la machine StepOne Plus Real time PCR system (Applied Biosystem). Les données d'amplification pour les gènes d'intérêt (Ct) sont normalisées par rapport à la GAPDH. La comparaison par rapport aux conditions contrôle s'effectue selon la méthode du 2^{-ΔΔCT}.

Le tableau **Tableau 5** récence les primers utilisés :

Gène	Forward 5'-3'	Reverse 3'-5'
GAPDH	GTCACCAGGGCTGCTTTTAAAC	GCAATCATATTGGAACATGTAAACCA
Sous-unité $\alpha 5$	TGCTGACTCCATTGGTTTCACAG	TCTCTCTGCAATCCTCTCGAGC
Sous-unité $\beta 1$	CAATTGTGGGTGGTGCACA	TGGAGGGCAACCCTTCTTT
Sous-unité αv	AGGTGCCTACGAAGCTGAGC	AAGGCTTCATTGTTTCGGACA
GFAP	ACATCGTGGTGAAGACCGTG	GGTCCTGCCTCACATCACAT
CD44	TTTGATTGAGTCAACAGTC	GTTACACCCAATCTTCATGTCCAC
CD133	GCCTTGTCTTGGTAGTGT	ATTGGCATCTTCTATGGTTT
Nestin	CAGGGGCAGACATCATTGGT	CACTCCCCATTACATGCT
Sox2	CCAGCTCGCAGACCTAC	GAGTGGGAGGAAGAGGTAAC
Oct4	TCTGAGACATGATGCTCTTCCTT	TCACTAAGTATCACCCCAG

Tableau 5 - Listes des primers utilisés

4. Migration cellulaire en chambre de Boyden

Une suspension de 20 000 cellules, contenue dans 200 μ L de milieu (souche ou différencié), est ensemencée dans chaque insert des chambres de Boyden. Celles-ci sont ensuite déposées dans un puits (plaque 24 puits) contenant 500 μ L de milieu (souche ou différencié). La plaque est remise à l'incubateur (37°C et 5% CO₂) pendant 3 jours. En cas de traitement, la drogue est ajoutée directement dans la suspension cellulaire.

Les cellules ayant migré sont fixées avec du Glutaraldéhyde 1% pendant 15 minutes. Afin d'analyser uniquement les cellules migrantes, celles n'ayant pas migré sont retirées en passant délicatement un coton-tige sur la membrane. Enfin, les cellules ayant migré sont marquées au DAPI (D9542, Sigma, 10 μ g/mL) pendant 10 minutes à l'abri de la lumière.

L'évaluation des cellules ayant migré est effectuée en prenant cinq photos à l'aide du microscope à fluorescence (ZEISS-Axio, grossissement 10x). Les cellules sont quantifiées à l'aide d'une macro développée sur le logiciel d'analyse d'images ImageJ.

5. Evasion cellulaire à partir d'une sphère tumorale

a) Formation de sphéroïdes tumoraux

Les sphères sont formées par la méthode de la « goutte inversée ».

Une suspension cellulaire de 2000 cellules est préparée dans un milieu de culture différencié (DMEM/F12/SVF 10%) et contenant 20% de méthylcellulose. Les gouttes sont formées en prenant 20 μ L de cette suspension qui est disposée sur un couvercle d'une boîte de Pétri. Le couvercle est ensuite retourné délicatement afin de créer une goutte. Afin d'éviter un dessèchement des gouttes, la boîte de Pétri est posée dans une autre contenant un papier humidifié. La formation des sphéroïdes s'effectue pendant 24 heures selon les lignées cellulaires dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂.

b) Evasion cellulaire

Après formation des sphéroïdes, ceux-ci sont déposés dans des puits (plaque 24 puits) contenant 500µL de milieu différencié (DMEM/F12/SVF 10%). Les puits sont préalablement coatés par une matrice de fibronectine (c-43060, PromoCell) ou de Poly-L-lysine (P9820 0,1%, Sigma). L'évasion cellulaire s'effectue pendant 72 heures selon les lignées cellulaires, dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Une image en contraste de phase (EVOS x1 Core, grossissement 4x) est prise au moment du dépôt du sphéroïde (jour 0) et 3 jours après.

Le cas échéant, l'aire de migration a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ.

6. Prolifération cellulaire

a) Modèle 2D par comptage au bleu trypan

Les cellules souches et différenciées sontensemencées en duplicat à une densité cellulaire de 25 000 et 50 000 cellules/puits (plaque 6 puits) respectivement, dans 1mL de leur milieu respectif. La prolifération s'effectue pendant 7 jours dans un incubateur à 37°C et 5% CO₂. Toutes les cellules sont récupérées (adhérentes et en suspension) et sont comptées en triplicata au bleu trypan (Trypan Blue Dye 0,40%, BioRad) à l'aide du compteur automatique (Bio-Rad, TC20).

b) Modèle 3D par évaluation de la taille de la sphère tumorale

Après formation des sphères (voir paragraphe VI.1) celles-ci sont maintenues dans la goutte inversée, ayant permis sa formation, pendant 7 jours dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Une image en contraste de phase (EVOS x1 Core, grossissement 10x) est prise le 1^{er} et le 7^{ème} jour après leur formation. La taille des sphéroïdes est évaluée en mesurant leur aire à l'aide du logiciel ImageJ. Une expérience représente une taille moyenne de 5 sphéroïdes.

c) Analyse du métabolisme mitochondrial (MTS)

Une densité cellulaire de 5000 cellules dans 100µL de milieu de culture (souche et différencié) estensemencée en triplicata dans des puits (plaques de 96 puits). Ceux-ci ont été préalablement coatés par une matrice de fibronectine (c-43060, PromoCell), de Poly-L-lysine (P9820 0,1%, Sigma) ou de laminine (L2020, Laminine from Engelbreth Holm Swam, Sigma) à une concentration de 10µg/mL. La prolifération s'effectue pendant 7 jours dans un incubateur à 37°C et 5% CO₂. Un volume de 20µL de MTS (20µL) (Cell titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) est ajouté au moment du dépôt des cellules et 7 jours après. L'absorbance est mesurée à 490 nm (Imark microplate reader, BioRad).

Le test de survie cellulaire s'effectue selon le même protocole à la différence que les cellules ne sont pas maintenues dans leur milieu de culture habituel (DMEM/F12/SVF10%) mais dans un milieu dépourvu de sérum (DMEM/F12/SVF0%). Afin de retirer tout le sérum, les cellules sont centrifugées trois fois à 1100 rpm pendant 4 minutes et reprises dans du milieu DMEM/F12. Le cas échéant, un traitement (TMZ à 10µM, 50µM ou Fr248 à 20µM) a été ajouté directement dans les puits au moment d'ensemencement des cellules.

Condition par expérience:

- Test de prolifération standard : coating de laminine.
- Test de survie : coating de fibronectine et poly-L-lysine.

7. Test de dilution limite

Une quantité de 62, 125 et 250 cellules/puits ont été ensemencées en plaques 96 puits. Les cellules sont maintenues dans 100µL de milieu souche (DMEM/F12/BIT/EGF/bFGF) pendant 7 jours dans un incubateur à 37°C et 5% CO₂. L'évaluation du nombre de neurosphères formé est effectuée en prenant cinq photos par puits en contraste de phase à l'aide du microscope EVOS x1 Core (grossissement 20x). L'aire des neurosphères est quantifiée à l'aide du logiciel d'analyse d'images ImageJ.

8. Test de dilution limite sur collagène

Le collagène neutralisé est préparé en mélangeant 8 volumes de collagène, 1 volume de PBS 10x et 1 volume de NaOH 0,1M (pH=7). Le collagène neutralisé est maintenu dans de la glace. Une densité de 200 000 cellules/mL, préalablement filtrée dans un filcon 50µm, est préparée dans le milieu souche. Un volume de 25µL de cette suspension cellulaire est ajouté à 2mL de milieu souche et 1,3mL de collagène neutralisé. Après mélange de la solution, un volume de 1,5 mL est ensemencé dans 2 boîtes de diamètre 35 mm. Celles-ci sont ensuite incubées dans un incubateur à 37°C et 5% CO₂ pendant au moins 7 jours. Si l'expérience nécessite plus de 7 jours, 60µL de milieu souche sont ajoutés.

9. Analyse *in vivo*

L'injection stéréotaxique des lignées souches a été réalisée en collaboration avec le Dr S. Pinel (Nancy).

Une densité cellulaire de 20 000 cellules dans 2µL d'Optimem est préparée en condition stérile (selon le protocole I.1). Les coordonnées d'injection à partir du Bregma de la souris Nude sont de +2 (axe Droite-Gauche), +1 (axe Antéro-Postérieur) et -3,5 (axe Dorso-Ventral). Les souris sont sacrifiées 4 semaines après implantation. Les cerveaux sont inclus en paraffine.

II. Partie 2

1. Culture et modèles cellulaires

a) Culture en condition souche

La lignée HeLa est cultivée dans le milieu DMEM/F12 (Dominique Dutscher) supplémenté avec les facteurs de croissance BIT-100 (20%) (Provitro), EGF (20ng/mL) (Reliatech), bFGF (20ng/mL) (Reliatech) et 2% d'Ultraglutamine (Lonza). Dans ces conditions les cellules se présentent sous forme semi-adhérente. Les agrégats en suspension sont récupérés dans un Falcon et sont centrifugés pendant 5 minutes à 1300 rpm. Pendant ce temps les cellules adhérentes sont récupérées par de l'acutase (Sigma). Le culot cellulaire est resuspendu par la solution contenant les cellules détachées. Le Falcon, contenant les cellules adhérentes et en suspension, est maintenu dans un incubateur sous atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂ pendant

quelques minutes. Une quantité de 400 000 cellules est repiquée dans 10 mL. Les cellules sont maintenues dans un incubateur sous atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂.

b) Culture en condition différenciée

La lignée HeLa est cultivée dans le milieu DMEM/F12 supplémenté à 10% de sérum de veau fœtal (DMEM/F12/SVF10%) (Lonza) et 2% d'Ultraglutamine (Lonza). Les cellules, sous forme adhérente, sont détachées de la flasque de culture par l'accutase (Sigma). Une quantité de 400 000 cellules est repiquée dans 10 mL. Les cellules sont maintenues dans un incubateur sous atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂.

c) Délétion transitoire de l'intégrine $\alpha 5$

Voir protocole de la Partie I.

2. Western blot

Voir protocole de la Partie I.

3. RT-qPCR

Voir protocole de la Partie I.

4. Immunofluorescence et imagerie confocale

Les cellules sontensemencées (200 000 cellules) en plaque 24 puits sur des lamelles coatées avec une matrice de fibronectine (10 μ g/mL). La plaque est maintenue à l'incubateur (37°C, 5% CO₂) pendant 48 heures dans le milieu adéquat (500 μ L) (souche et différencié).

Après retrait du surnageant, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde (PFA 4%/PBS) (Electron Microscopy Sciences) pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. Après 3 lavages au TBS 1%, les cellules sont perméabilisées avec 0,1% de Triton-x100 (Sigma) pendant 5 minutes. Les puits sont lavés au TBS 1% puis sont saturés avec 5% de BSA/TBS pendant 1 heure. Les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire à 4°C O/N. Le lendemain, les cellules sont rincées 3 fois au TBS 1% puis marquées avec l'anticorps secondaire fluorescent et avec du DAPI, pendant 45 minutes à l'abri de la lumière. Les cellules sont lavées 3 fois au TBS 1%. Le montage entre lame et lamelle s'effectue à l'aide du réactif de montage Dako (S3023, fluorescence mounting medium, Dako). Les images sont analysées au microscope confocal (LEICA TCS SPE II, 60x magnification oil-immersion).

Anticorps utilisés : anti- $\alpha 5$ IIa1 (BD Biosciences, à 10 μ g/mL), anticorps secondaires fluorescents AlexaFluor 546 à 5 μ g/mL, DAPI (D9542, Sigma, à 10 μ g/mL).

5. Migration cellulaire en chambre de Boyden

Voir protocole de la Partie I.

6. Evasion cellulaire à partir d'une sphère tumorale

a) Formation de sphéroïdes tumoraux

Voir protocole de la Partie I.

Une suspension cellulaire de 2000 cellules est préparée dans un milieu de culture souche et différencié et contenant 20% de méthylcellulose. La formation des sphéroïdes s'effectue pendant 48 heures dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂.

b) Evasion cellulaire

Après formation des sphéroïdes, ceux-ci sont déposés dans des puits (plaque 24 puits) contenant 500µL de milieu souche différencié. Les puits sont préalablement coatés par une matrice de fibronectine (c-43060, PromoCell). Une image en contraste de phase (EVOS x1 Core, grossissement 4x) est prise au moment du dépôt du sphéroïde (jour 0) et 24 heures après.

7. Prolifération cellulaire

a) Modèle 2D par comptage au bleu trypan

Voir protocole de la Partie I.

Les cellules souches et différenciées sontensemencées en duplicat à une densité cellulaire de 25 000 (plaque 6 puits) respectivement, dans 1mL de leur milieu respectif.

b) Analyse du métabolisme mitochondrial (MTT)

Voir protocole de la Partie I.

Les cellules différenciées ont étéensemencées à une quantité de 25 000 cellules par puits (plaque 96 puits) dans 100µL de milieu DMEM/F12 supplémenté par 10% de sérum ou dépourvu de sérum. Les conditions d'expériences sont réalisées soit sur des puits sans coating (plastique) soit sur des puits préalablement coatés par de la fibronectine (10µg/mL).

8. Test d'adhérence

Une plaque de 96 puits est recouverte d'une matrice de fibronectine diluée dans du PBS (0 à 10µg/mL), de poly-L-lysine (10µg/mL) (contrôle positif) et PBS (contrôle négatif). Chaque condition contient 50µL de matrice et est réalisée en triplicata. La plaque est maintenue à 4°C O/N. Afin de détacher plus doucement les cellules le jour de l'expérience, les cellules sont détachées par l'acutase la veille de l'expérience.

Le lendemain, les cellules sont décollées à l'EDTA (2mM dilué dans du PBS) pendant 5-10 minutes (37°C, 5% CO₂). La suspension cellulaire est ensuite centrifugée pendant 5 minutes à 1000 rpm. Le culot est repris dans du tampon d'adhérence (EMEM/HEPES + 0,2% BSA) (Lonza). Une densité cellulaire de 50 000 cellules/puits est incubée sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante, avec soit un

antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ (Fr248, 20 μ M) soit avec son solvant (DMSO). En parallèle, la plaque de 96 puits est saturée pendant 30 minutes avec 0,2% de BSA (dilué dans du PBS) sur de la glace. Après rinçage des puits avec du tampon d'adhérence, une quantité de 50 000 (50 μ L) cellules par puits estensemencée dans les puits pendant une heure à l'incubateur.

A la sortie de l'incubateur, les puits sont rincés plus de 4 fois avec du milieu EMEM sans HEPES, jusqu'à ce que les cellules ne soient plus visibles à œil nu au fond des puits blancs (contrôle négatif). Les cellules adhérentes sont fixées au glutaraldéhyde 1% (dilué dans de l'eau) (Electron Microscopy Sciences) pendant 20 minutes à température ambiante, puis marquées au cristal violet 0,25% (dilué dans de l'eau) pendant 30 minutes à température ambiante. La plaque 96 puits est ensuite rincée abondamment sous de l'eau claire. Le cristal violet est solubilisé par l'ajout de 0,5% de SDS (dilué dans de l'eau) pendant 15 minutes sous agitation. L'absorbance est lue à 595 nm (Imark microplate reader, BioRad).

9. Analyse *in vivo*

a) Xénogreffes orthotopiques

L'injection stéréotaxique des lignées souches HeLa a été réalisée en collaboration avec le Dr D.Guenot (Strasbourg).

Une densité cellulaire de 10 000 cellules dans 2 μ L d'Optimem est préparée en condition stérile (selon le protocole I.1). Les coordonnées d'injection à partir du Bregma de la souris Nude sont de +2 (axe Droite-Gauche), +1 (axe Antéro-Postérieur) et -3,5 (axe Dorso-Ventral). Les souris sont sacrifiées 4 semaines après implantation. Les cerveaux sont inclus en paraffine.

Pour les conditions analysant l'effet d'un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$, 300 000 cellules HeLa sontensemencées dans une flasque T25 (4mL de milieu DMEM/F12/BIT20%/EGF/bFGF) et traitées par l'antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ (Fr248 à 50 μ M) la veille de l'expérience. Le lendemain, les cellules sont récupérées à une densité de 10 000 cellules/2 μ L et traitées de nouveau par 50 μ M de Fr248. Les cellules sont injectées selon le même protocole.

b) Coloration Hématoxyline/Eosine

Les cerveaux sont coupés au microtome (ThermoScientific, Microm HM340E) à 6 μ m et les coupes sont déposées sur une lame SuperFrost[®]Plus (ThermoScientific).

Les coupes sont déparaffinées par 2 bains d'Histosol (Roti-histol, ROTH) (3 minutes) puis sont déshydratées par 2 bains d'éthanol 100%, d'éthanol 95% et d'eau milliQ, à température ambiante. Les coupes sont colorées dans de l'Hématoxyline (HHS32 Harris Hematoxyline Solution modified, Sigma) pendant 2 minutes. Après un rinçage à l'eau milliQ (3 minutes), les coupes subissent une différenciation (Differentiating Solution, 0,1% HCl, Ethanol 70%, eau milliQ) pendant quelques secondes. Les coupes sont rincées à l'eau milliQ (3 min) puis incubées dans un bain de Scott's Water Tap (NaHCO₃ 20g/L, MgSO₄ 200g/L/H₂O) pendant 30 secondes. Après un rinçage à l'éthanol 95% de 30 secondes, les coupes sont colorées à l'éosine (HT110332 Eosine Y Solution alcoholic with phloxine, Sigma) pendant une minute puis sont déshydratées à l'éthanol 100% et déparaffinées

à l'histosol (Roti-histol, ROTH) (2 x 3 minutes). Les coupes sont montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage Eukitt.

c) Immunomarquage

Les cerveaux sont coupés au microtome (ThermoScientific, Microm HM340E) à 6µm et les coupes sont déposées sur une lame SuperFrost®Plus (ThermoScientific).

Les coupes sont déparaffinées à température ambiante dans 2 bains d'histosol (Roti-histol, ROTH) puis sont déshydratées par 2 bains d'éthanol 100%, d'éthanol 95% puis dans 1 bain d'éthanol 70% et d'éthanol 50%. Les coupes sont ensuite rincées dans 2 bains d'eau milliQ. Chaque bain dure 3 minutes.

Afin de démasquer les antigènes, les lames sont incubées avec de la trypsine (Trypsine 1% + CaCl₂ 10%) pendant 17 minutes à 37°C puis sont lavées dans deux bains de PBS d'une minute. La peroxydase endogène est inactivée en incubant 30 minutes les coupes dans 3% H₂O₂ diluée dans du méthanol, à l'abri de la lumière. Les coupes sont lavées pendant 33 minutes dans du TBS-Tween sous agitation puis saturées pendant une heure avec du sérum normal 5% (dilué dans TBST). Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du sérum 5% à 4°C O/N.

Le lendemain, les lames sont rincées dans 3 bains de TBST de 3 minutes chacun puis incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé au 1/200, pendant 1 heure à température ambiante. Après 30 minutes, le réactif Vectastain AB est préparé (1 goutte du réactif A dilué dans 5mL de TBST contenant 0,5 M de NaCl puis ajout d'une goutte de réactif B). Ce mélange est maintenu dans l'obscurité pendant 30 minutes. Après 1 heure d'incubation avec l'anticorps secondaire, les lames sont rincées dans 3 bains de TBST de 3 minutes chacun, puis sont incubées pendant 30 minutes avec le réactif Vectastain AB. Les lames sont ensuite lavées dans 2 bains de TBST et 1 bain de PBS de 3 minutes. Les coupes sont incubées avec le réactif DAB (1 goutte du tampon dans 2,5mL d'eau milliQ puis ajout de deux gouttes du réactif DAB et d'une goutte de peroxyde d'hydrogène). L'intensité de coloration est analysée sous microscope EVOS. Après coloration, les coupes sont rincées dans deux bains de PBS de 3 minutes puis incubées dans une solution acide (2mL d'acide acétique glacial + 98mL d'éthanol 70%) pendant 1 minute. Après deux rinçages à l'eau milliQ de 3 minutes, les coupes sont déshydratées avec 1 bain d'éthanol 50% et 2 bains d'éthanol 95% et 100%, suivis d'un bain d'histosol de 3 minutes. Les coupes sont montées entre lame et lamelle avec le kit de montage Eukitt.

Anticorps utilisés : Stem 121 (Clontech ; au 1/1000) ; anti-α5 IIaI (BD Biosciences, au 1/300)

Résultats Partie 1:

Les cellules initiatrices de tumeurs à l'origine de l'hétérogénéité de l'expression de l'intégrine $\alpha5\beta1$ dans les glioblastomes.

I. Etude de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules souches de GBM

1. Expression hétérogène de l'intégrine $\alpha 5$ dans des lignées de cellules souches de GBM

a) Expression de l'intégrine avant et après différenciation et validation de l'état souche/différencié.

Le glioblastome étant une tumeur extrêmement hétérogène, nous avons travaillé avec 4 lignées de cellules souches tumorales issues de GBMs de patients. Les lignées NCH644 et NCH421k (collaboration Dr Herold-Mende, Heidelberg) et les lignées 5706, 3731 (collaboration Dr Ahmed Idbah, Paris) ont été cultivées en condition souche et en condition différenciée. Nous avons choisi d'évaluer les caractéristiques moléculaires et phénotypiques de nos différentes lignées après une différenciation de plus de 1 mois par du sérum (10%). Conformément à la morphologie standard des CSGs, les 4 lignées forment des neurosphères en condition souche (NS) et deviennent adhérentes après différenciation (SVF) (**Figure 23.A**).

Nous avons analysé l'expression de la sous-unité de l'intégrine $\alpha 5$ par immunoblot en condition souche et différenciée. Nos résultats montrent que l'intégrine $\alpha 5$ n'est pas exprimée en condition souche dans 3 lignées (NCH421k, 3731 et NCH644). En revanche, nous avons mis en évidence une expression hétérogène de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation ; les lignées différenciées NCH644 et 5706 exprimant l'intégrine $\alpha 5$ et les lignées NCH421k et 3731 ne l'exprimant pas (**Figure 23.B**). Seule une lignée (5706) présente une expression faible de l'intégrine $\alpha 5$ en condition souche, qui augmente fortement au cours de sa différenciation.

Afin de vérifier le statut souche et différencié des lignées, nous avons analysé l'expression de marqueurs exprimés dans les cellules souches de GBM (Sox2 et l'intégrine $\alpha 6$) et dans les cellules différenciées (GFAP) (**Figure 23.C**). Nos résultats confirment la différenciation des cellules des lignées NCH421k, NCH644, 3731 et 5706. En effet, nous observons une diminution de l'expression de l'intégrine $\alpha 6$ dans toutes les lignées et le gain de l'expression de la GFAP, sauf pour la lignée 5706. Cependant, la GFAP étant un marqueur de différenciation de type astrocytaire, il est possible que la lignée 5706 ait une différenciation de type neuronale ou oligodendrocytaire (nous avons notamment constaté une expression élevée de l'ARNm du gène OLIG2, un marqueur de différenciation oligodendrocytaire, dans la lignée 5706 différenciée). De manière intéressante, l'expression du marqueur Sox2 après différenciation est hétérogène selon l'expression de l'intégrine $\alpha 5$. Alors que les deux lignées $\alpha 5+$ (NCH644 et 5706) n'expriment plus Sox2 après différenciation, les deux lignées $\alpha 5-$ (NCH421k et 3731) présentent une expression stable.

Pour résumer, nous avons mis en évidence une expression hétérogène de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation dans 4 lignées de CSGs. Ces résultats reflètent l'hétérogénéité inter-tumorale de l'intégrine $\alpha 5$.

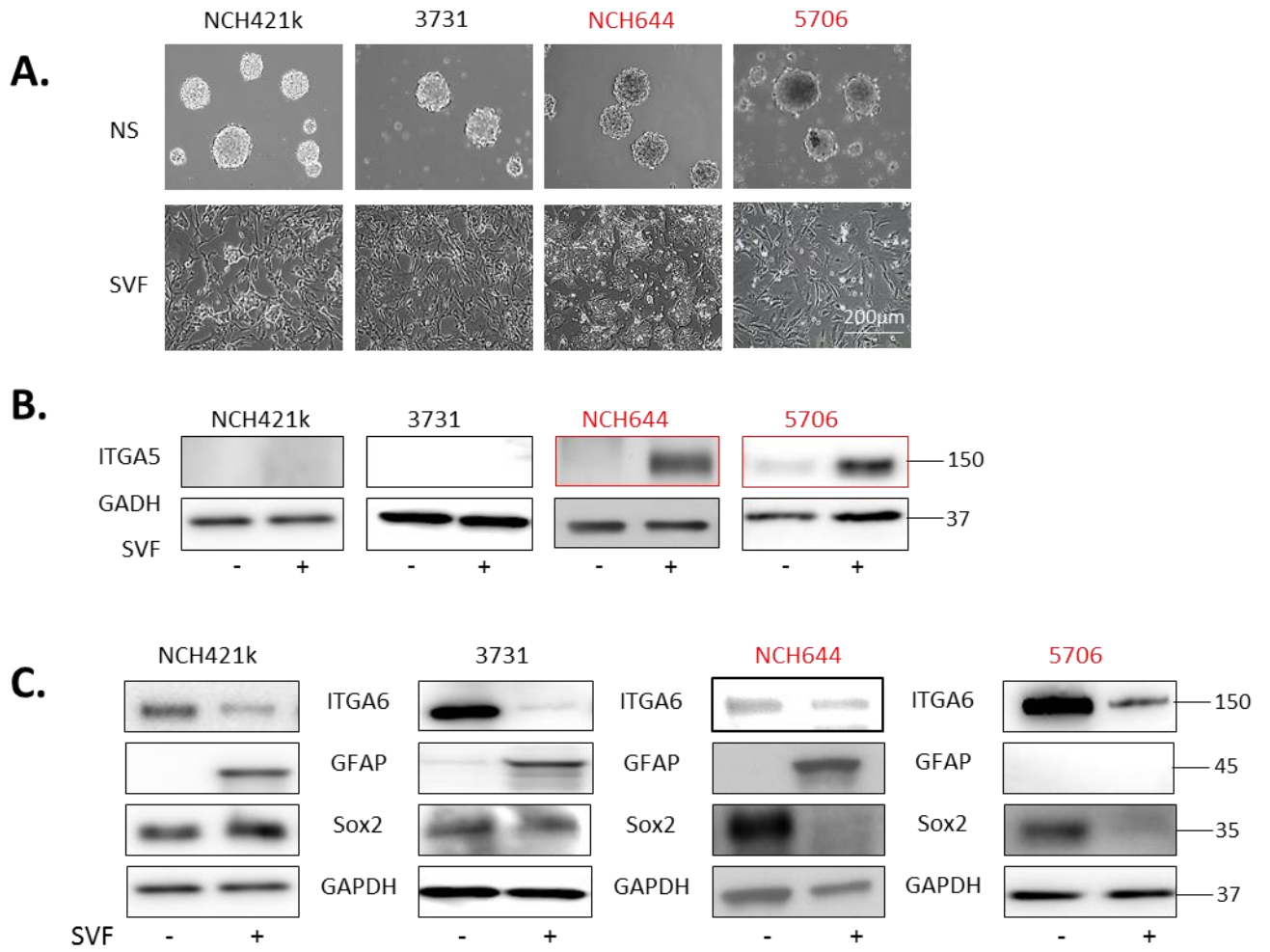


Figure 23 - Hétérogénéité inter-tumorale de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation. (A) Image par contraste de phase de la morphologie des CSGs en condition souche (NS) et en condition différenciée (SVF) des lignées NCH421k, 3731, NCH644 et 5706. La barre d'échelle représente 200 μ m. **(B)** et **(C)** Analyse protéique par Western blot de l'intégrine $\alpha 5$ (ITGA5), de marqueurs souches (ITGA6 et Sox2) et du marqueur de différenciation (GFAP), en condition souche (SVF-) et différenciée (SVF+) dans les lignées NCH421k, 3731, NCH644 et 5706 (n>4 expériences). Les lignées exprimant l'intégrine sont notées en rouges.

b) Caractérisations moléculaires des différentes lignées

Nous avons voulu comprendre et déterminer l'origine de l'expression différentielle de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation. Nous nous sommes notamment demandé si la régulation de l'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$, au cours de la différenciation, était responsable de son expression protéique.

Nous avons représenté sur la **Figure 24.A**, le taux d'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ induit par la différenciation pour chaque lignée. Nous constatons que son expression transcriptomique augmente dans toutes les lignées après leur différenciation. Néanmoins, le taux d'augmentation de l'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$, au cours de la différenciation, n'est pas corrélé à son expression protéique. En d'autres termes, ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'ARNm ne suffit pas à induire son expression.

Nous nous sommes ensuite demandé si les lignées capables d'exprimer l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation, présentaient un taux d'ARNm basal plus élevé. Afin de confirmer cette idée, nous avons comparé le taux d'ARNm des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ en condition souche dans les lignées NCH644 et NCH421k. Les résultats montrent un taux d'ARNm augmenté de plus de 35 fois ($35,49 \pm 19,96$) pour la sous-unité $\alpha 5$ et de plus de 3 fois pour la sous-unité $\beta 1$ ($3,180 \pm 0,319$) dans la lignée NCH644 comparée à la lignée NCH421k (**Figure 24.B**). Cette analyse suggère que les cellules souches, possédant un taux d'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ élevé, sont « programmées » à l'exprimer après différenciation.

Par ailleurs, nos résultats précédents nous ont permis de constater une perte d'expression protéique du marqueur souche Sox2 dans les lignées $\alpha 5+$ différenciées (NCH644 et 5706) et une stabilisation de son expression dans les lignées $\alpha 5-$ différenciées (NCH421k et 3731). Ces résultats suggèrent que les deux types de CSGs ($\alpha 5+$ et $\alpha 5-$) peuvent présenter des caractéristiques moléculaires différentes. Afin de répondre à cette hypothèse nous avons analysé quantitativement la régulation transcriptionnelle de marqueurs souches, induite par la différenciation. De manière intéressante, l'analyse du taux d'ARNm des marqueurs souches montre que les lignées $\alpha 5+$ semblent être capables d'une différenciation plus complète. En effet, alors que le taux d'ARNm des marqueurs souches (Nestine, CD133, Sox2 et la sous-unité $\alpha 6$) est stable ou augmente dans les lignées $\alpha 5-$ différenciées (NCH421k et 3731), il est significativement réduit dans les lignées $\alpha 5+$ (NCH644 et 5706) après leur différenciation (**Figure 24.C**).

Pour résumer, nos résultats ont montré qu'un taux basal élevé d'ARNm du gène de l'intégrine $\alpha 5$ semble « programmer » certaines CSG à exprimer l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation. De plus, nous avons mis en évidence une association entre la perte de tous les ARNm des marqueurs souches et l'expression protéique de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation. Ces données suggèrent une forte capacité de différenciation des lignées programmées à exprimer l'intégrine.

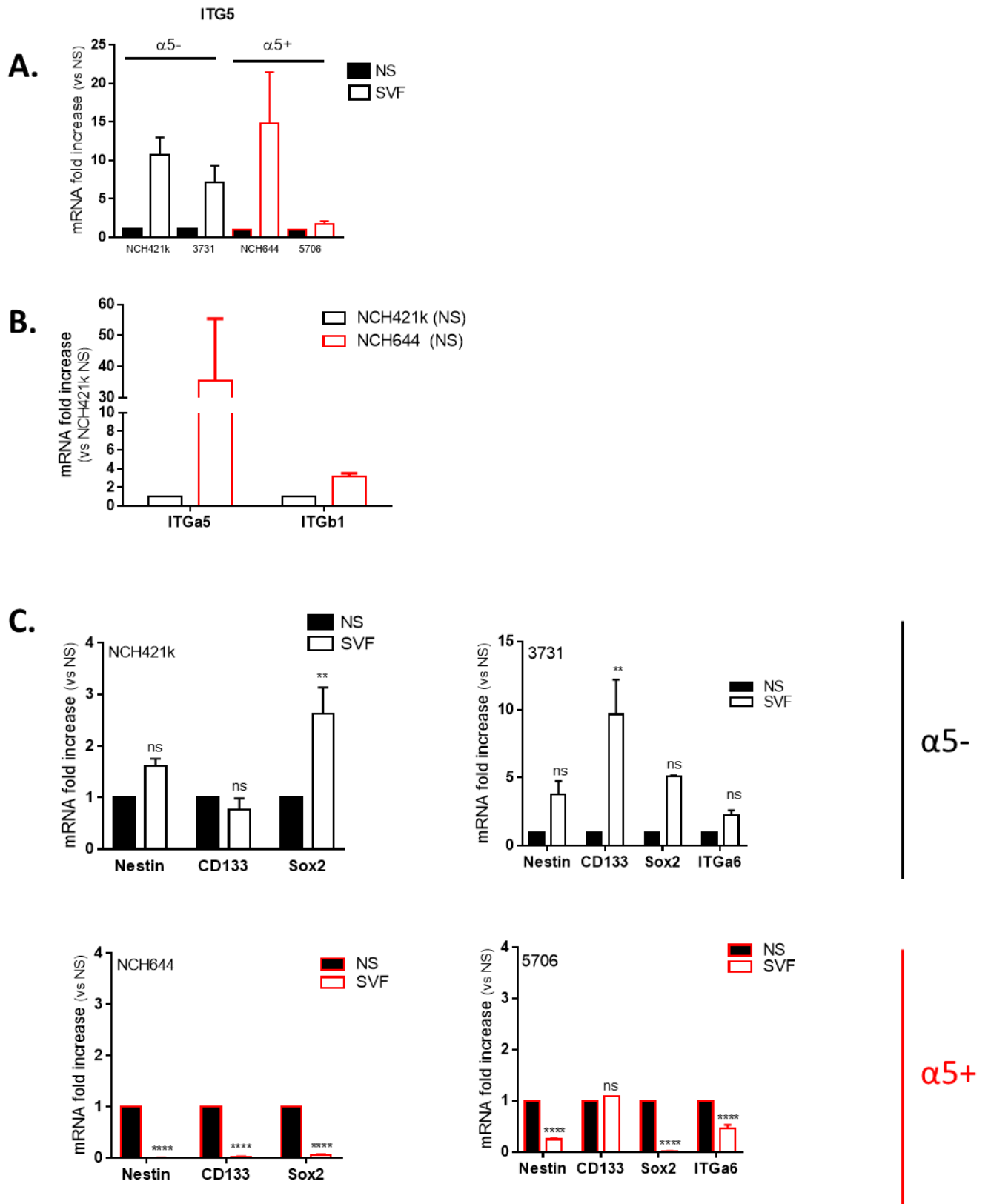


Figure 24 - L'expression protéique de l'intégrine $\alpha 5$ n'est pas induite par la régulation transcriptionnelle de son ARNm et est associée à une différenciation complète. Rapport du nombre de transcrits dans les lignées NCH421k, 3731, NCH644 et 5706 en condition différenciée (SVF) comparé à la condition souche (NS) (A) du gène de l'intégrine $\alpha 5$ ($n > 4$) et (C) des gènes de marqueurs souches (Nestine, CD133, Sox2 et $\alpha 6$) ($n > 4$). (B) Rapport du nombre de transcrits du gène des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$, dans la lignée NCH644 comparé à la lignée NCH421k, en condition souche ($n > 3$).

2. Expression hétérogène de l'intégrine $\alpha 5$ au sein d'une lignée

a) En condition polyclonale

Une sous-population de la lignée 3731 souche a été isolée (collaboration Dr Ahmed Idbaih, Paris). Au cours de ce manuscrit, nous parlerons de la lignée 3731*. De manière étonnante, nous avons observé sur la lignée 3731* une expression de l'intégrine $\alpha 5$, induite par la différenciation, hétérogène d'un point de vue temporel. En condition souche, cette lignée n'exprime pas l'intégrine. Nous avons forcé sa différenciation deux fois, à un intervalle d'une semaine. Nous avons constaté que lors de la première différenciation, les cellules différenciées 3731* expriment l'intégrine $\alpha 5$ (3731* (1)). En revanche, après la deuxième différenciation la lignée 3731* ne l'exprime pas (3731* (2)). Dans les deux cas, l'expression ou l'absence d'expression de l'intégrine reste stable au cours de la différenciation (**Figure 25.A**).

b) En condition clonale

Les données récentes de la littérature montrent la complexité du GBM via l'analyse de cellules uniques. Plusieurs études ont mis en évidence l'existence de plusieurs clones, aux profils moléculaires différents, au sein d'un même GBM, démontrant une hétérogénéité intra-tumorale (184,196). Nos résultats précédents ont montré une hétérogénéité inter-tumorale de l'intégrine $\alpha 5$ dans une cohorte de 4 lignées de CSGs après différenciation. Afin d'évaluer l'expression intra-tumorale de l'intégrine $\alpha 5$, nous avons analysé son expression au sein d'une lignée de CSGs.

Nous avons effectué le clonage des cellules de la lignée NCH644 en condition souche. L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ étant induite par différenciation en condition polyclonale, nous avons différencié les clones préalablement amplifiés. Afin d'obtenir rapidement une différenciation totale, nous avons induit la différenciation des clones par l'acide rétinoïque (ATRA). L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ a été analysée dans 23 clones et dans la lignée polyclonale NCH644 par Western blot. En parallèle nous avons évalué la différenciation des clones via l'expression de la GFAP (**Figure 25.B**).

Nous constatons que tous les clones, pourtant au sein d'une même lignée, ne présentent pas le même type de différenciation. Effectivement, bien que la majorité des clones différenciés expriment la GFAP (différenciation astrocytaire), 9 ne l'expriment pas. En ce qui concerne l'intégrine $\alpha 5$, nous observons des résultats similaires aux travaux précédents. Aucun clone de la lignée NCH644 n'exprime l'intégrine en condition souche. En revanche, après différenciation, les résultats montrent une expression hétérogène naturelle de l'intégrine $\alpha 5$ dans cette lignée. En effet, sur les 23 clones analysés, 5 d'entre eux sont incapables de l'exprimer (Clone E, M, Q, R et S) même après différenciation forte par l'ATRA. De plus, il est intéressant de noter que l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ n'est pas systématiquement corrélée à une différenciation astrocytaire : certains clones coexpriment ces deux protéines, d'autres uniquement la GFAP ou la sous-unité $\alpha 5$.

A l'issue de cette analyse, nous avons sélectionné un clone capable (Clone Z) et un clone incapable (Clone E) d'exprimer l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation (**Figure 25.C**).

Pour résumer, nous avons mis en évidence une expression hétérogène, après différenciation, au sein d'une même lignée en condition clonale (lignée NCH644) et polyclonale (lignée 3731*). Ces résultats reflètent une hétérogénéité intra-tumorale de l'intégrine $\alpha 5$.

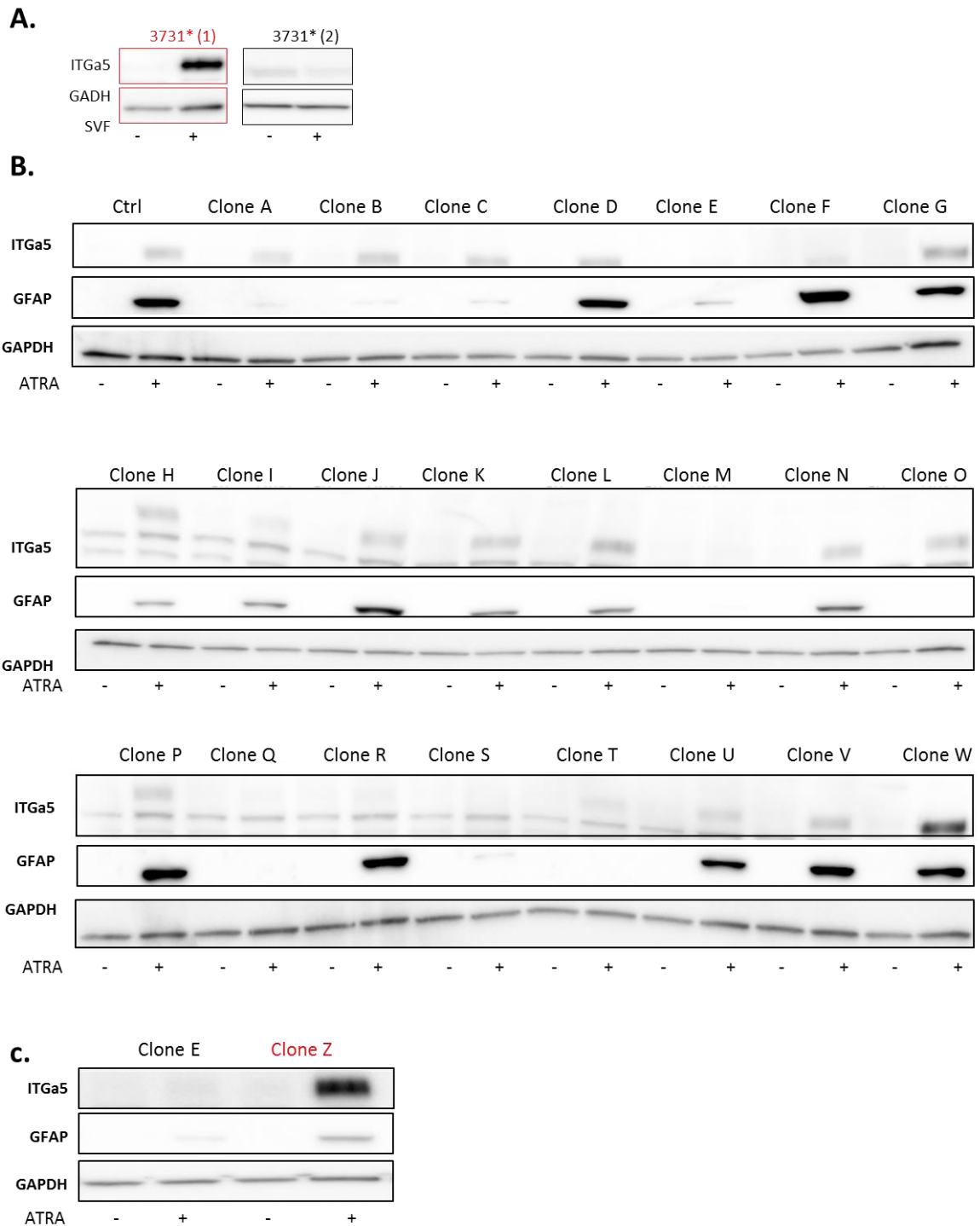


Figure 25 - Hétérogénéité intra-tumorale de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation. Analyse protéique par Western blot **(A)** de l'intégrine $\alpha 5$ (ITGa5) dans une sous-population cellulaire de la lignée 3731* avant (SVF-) et après différenciation (SVF+) ($n > 4$) **(B)** l'intégrine $\alpha 5$ (ITGa5) et de la GFAP dans 23 clones de la lignée NCH644 en condition souche (ATRA-) et différenciée (ATRA+). La bande inférieure pour le marquage de l'intégrine $\alpha 5$ est non spécifique. **(C)** Sélection d'un clone exprimant (clone Z) et d'un clone n'exprimant pas l'intégrine $\alpha 5$ (clone E) après différenciation (ATRA +).

3. Expression de l'intégrine $\alpha 5$ lors d'une dédifférenciation

Nos travaux précédents ont montré que l'intégrine $\alpha 5$ est exprimée après différenciation en condition polyclonale et clonale. Seule la lignée 5706 l'exprime en condition souche. Cependant, son expression est non seulement faible mais est significativement augmentée lors de la différenciation. Ces données suggèrent que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est un marqueur de différenciation. Néanmoins, nous avons également mis en évidence, à partir de la lignée 5706 et des clones de la lignée NCH644, que son expression après différenciation n'est pas corrélée à un type précis de différenciation (astrocytaire, neuronale ou oligodendrocytaire). Ceci fait ressortir le rôle ambigu de l'intégrine $\alpha 5$ comme marqueur de différenciation.

Dans le but d'évaluer l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans une signature moléculaire de cellules différenciées, nous avons induit la dédifférenciation des cellules différenciées et analysé l'expression de l'intégrine $\alpha 5$. Pour cela, nous avonsensemencé les cellules, ayant été différenciées depuis plus de 1 mois, dans un milieu dépourvu de sérum et contenant les facteurs de croissance nécessaire au phénotype souche (milieu DMEM/F12/BIT/EGF/bFGF). Nous avons ainsi forcé la dédifférenciation des lignées NCH644 et NCH421k pendant 10 jours.

La **Figure 26.A** représente l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les lignées NCH421k et NCH644 dédifférenciée (SVF \rightarrow NS) pendant 10 jours. Les contrôles différenciés (SVF) ont également été analysés. Nous constatons que les deux lignées n'expriment plus la GFAP après 10 jours de dédifférenciation. Ceci nous confirme le retour à l'état souche des deux lignées. Etonnamment, nous observons que l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est maintenue lors de la dédifférenciation de la lignée NCH644. Ainsi, ces résultats montrent que l'intégrine n'est pas un marqueur de différenciation.

Nous avons observé dans nos résultats précédents une relation entre un taux d'ARNm élevé de l'intégrine $\alpha 5$ en condition souche et son expression protéique après différenciation (**Figure 24.B**). Ce résultat suggère qu'un taux d'ARNm seuil, en condition souche, pourrait être nécessaire pour induire l'expression protéique de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons analysé le taux d'ARNm de l'intégrine dans la lignée NCH644 en condition souche, différenciée et dédifférenciée (**Figure 26.B**). Les résultats montrent que le taux d'ARNm des cellules NCH644 est similaire en condition différenciée et dédifférenciée et significativement augmenté par rapport aux cellules NCH644 souches. Ainsi, l'augmentation du taux de l'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation est maintenue après un retour au statut souche. Ce résultat semble confirmer la corrélation entre un taux d'ARNm en condition souche et son expression protéique. En parallèle, nous avons étudié le taux d'ARNm de la GFAP dans la lignée NCH644 dans les mêmes conditions. Nos résultats montrent une diminution du taux de l'ARNm de la GFAP dans les cellules NCH644 dédifférenciées comparé aux cellules différenciées, ce qui confirme le phénotype souche après dédifférenciation.

Nous nous sommes ensuite demandé si les cellules dédifférenciées conservent des caractéristiques souches. Pour cela, nous avons effectué un test de dilution limite, où nous avonsensemencé 62, 125 et 250 cellules des lignées NCH644 et NCH421 souches et dédifférenciées (après 10 jours) (**Figure 26.C**). Les neurosphères formées ont été comptées 7 jours après l'ensemencement des cellules. En condition souche,

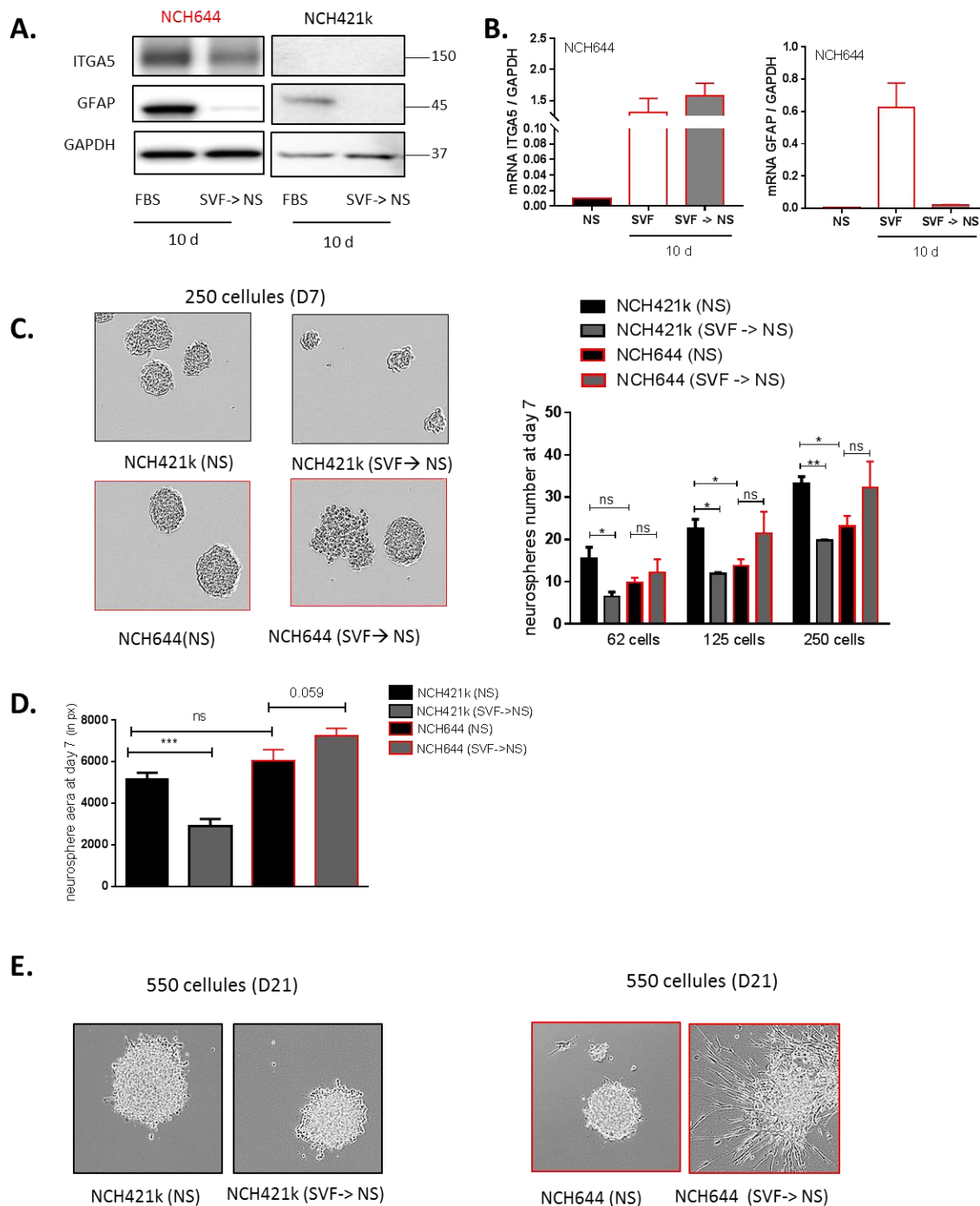


Figure 26 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est maintenue après dédifférenciation et est associée à une capacité d'auto-renouvellement complète. (A) Analyse protéique par Western blot de l'intégrine $\alpha 5$ (ITGA5) et de la GFAP en condition différenciée (SVF) après 10 jours de dédifférenciation (SVF \rightarrow NS) (10 d). (B) Analyse transcriptomique du gène de l'intégrine $\alpha 5$ et de la GFAP dans la lignée NCH644 en condition souche (NS), différenciée (SVF) et dédifférenciée pendant 10 jours (SVF \rightarrow NS). (C) Image par contraste de phase (x20) de neurosphères formées après 7 jours d'ensemencement de 250 cellules issues de la lignée NCH644 et NCH421k en condition souche (NS) et après 10 jours de dédifférenciation (SVF \rightarrow NS). L'histogramme représente le nombre de neurosphères formées, 7 jours après ensemencement de 62, 125 et 250. (D) Quantification de l'aire des neurosphères, 7 jours après l'ensemencement de 250 cellules des lignées NCH421k et NCH644 en condition souche (NS) et après 10 jours de dédifférenciation (SVF \rightarrow NS). (E) Image par contraste de phase (x20) de neurosphères formées après 21 jours d'ensemencement de 550 cellules issues de la lignée NCH644 et NCH421k en condition souche (NS) et après 10 jours de dédifférenciation (SVF \rightarrow NS) sur collagène ($n > 3$ pour toutes les expériences).

nous avons dénombré un plus grand nombre de neurosphères dans la lignée NCH421k comparé à la lignée NCH644 (lorsque 125 et 250 cellules ont étéensemencées). De manière intéressante, nos résultats mettent en évidence une diminution du nombre de neurosphères dans la lignée NCH421k dédifférenciée comparée à la lignée NCH421k souche quelle que soit la quantité de cellulesensemencées. En revanche dans la lignée NCH644 les cellules souches et dédifférenciées forment un nombre de neurosphères similaire (**Figure 26.C**).

Par ailleurs, nous avons observé des neurosphères formées par la lignée NCH421k dédifférenciée de plus petites tailles comparées aux cellules NCH421k souche. Afin de vérifier cette appréciation visuelle, nous avons mesuré l'aire des neurosphères à l'aide du logiciel ImageJ (**Figure 26.D**). L'analyse quantitative confirme que l'aire des neurosphères formées par les cellules NCH421k dédifférenciées est plus faible que celles issues des cellules NCH421k souches. Au contraire, les cellules NCH644 dédifférenciées produisent des neurosphères d'aire similaire, voire d'aire supérieure, à celles formées par les cellules NCH644 souches. Ainsi, lorsque la lignée NCH421k se dédifférencie, celle-ci ne semble pas acquérir une capacité d'auto-renouvellement complète, tandis que la lignée NCH644 présente une capacité souche « totale » (en termes de nombre et taille de neurosphères formées).

Enfin, nous avons observé sur la **Figure 26.C** que les cellules NCH644 dédifférenciées forment des neurosphères mais également des agrégats cellulaires. L'étude de Louis et al., 2008 (584) a montré que l'utilisation de collagène empêche la migration des cellules et l'agrégation de colonies, permettant ainsi de dénombrer plus facilement le nombre de colonies formées. Ainsi, nous avons réalisé un second test de dilution limite sur collagène, sur 21 jours, des lignées NCH644 et NCH421 en condition souche et dédifférenciée (**Figure 26.E**). Les résultats montrent que les deux lignées forment des neurosphères en condition souche. Après une dédifférenciation de 10 jours, des neurosphères sont également formées par les cellules de la lignée NCH421k. En revanche, les cellules NCH644 dédifférenciées ne forment pas de neurosphères. Les cellules NCH644 semblent acquérir un phénotype migratoire lorsqu'elles se dédifférencient.

Pour résumer, nous avons montré que l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est maintenue au cours de la dédifférenciation de cellules différenciées exprimant l'intégrine. Ceci démontre que l'intégrine ne peut être considérée comme un marqueur de différenciation. De plus, l'augmentation du taux de l'ARNm du gène de l'intégrine $\alpha 5$ suite à la différenciation reste stable après la dédifférenciation, ce qui peut expliquer son expression protéique. Enfin, les cellules dédifférenciées exprimant l'intégrine $\alpha 5$ semblent présenter une capacité d'auto-renouvellement complète, caractérisant un phénotype souche, et un phénotype plus invasif.

II. Analyse des différences phénotypiques dans les CSGs en relation avec l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

Nous avons voulu savoir si la « programmation » de l'intégrine $\alpha 5$ en condition souche ou son expression en condition différenciée avaient un impact sur l'agressivité tumorale. Nous avons choisi d'étudier la

prolifération, la migration et l'évasion cellulaire des différentes lignées et des deux clones issus de la lignée NCH644.

1. Comparaison des différences phénotypiques de prolifération selon l'expression de l'intégrine $\alpha 5$

a) Analyse de la prolifération des lignées NCH421k, NCH644, 3731 et 5706

Nous avons évalué le taux de prolifération des lignées NCH421k, NCH644, 3731 et 5706 sur 7 jours, par comptage au bleu trypan, en condition souche. Les résultats montrent que les lignées NCH421k ($\alpha 5^-$) et NCH644 ($\alpha 5^+$) ont une capacité de prolifération équivalente (taux de prolifération de $13,2 \pm 1,6$ et $11,2 \pm 2,3$ respectivement). Des résultats similaires ont été observés avec les lignées 3731 ($\alpha 5^-$) et 5706 ($\alpha 5^+$) (taux de prolifération de $6,1 \pm 0,7$ et $3,7 \pm 0,3$ respectivement) (**Figure 27.A**). Ainsi, la « programmation » de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules souches tumorales n'influence pas leur capacité de prolifération.

L'évaluation de la capacité de prolifération des lignées différenciées a été réalisée dans les mêmes conditions. Nous constatons que les cellules différenciées prolifèrent moins que les cellules souches tumorales (**Figure 27.B**). De plus, les résultats montrent que les deux lignées $\alpha 5^+$ ont une capacité de prolifération significativement plus élevée ($5,1 \pm 2,0$ pour la lignée NCH644 et $2,5 \pm 0,4$ pour la lignée 5706) que les lignées $\alpha 5^-$ ($1,41 \pm 1,41$ pour la lignée NCH421k et $0,97 \pm 0,32$ pour la lignée 3731). Ainsi, l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation est associée à une capacité de prolifération plus importante.

b) Analyse de la prolifération des clones issus de la lignée NCH644

L'analyse de la prolifération de la lignée polyclonale NCH644 (pool $\alpha 5^+$) et des clones Z ($\alpha 5^+$) et E ($\alpha 5^-$) apporte des résultats différents de ceux observés entre les lignées. Bien que les écarts-types entre les différentes expériences soient élevés, nous constatons que les deux clones ont une capacité de prolifération plus faible que la lignée polyclonale en condition souche ($25,5 \pm 13,4$ pour la lignée polyclonale ; $12,6 \pm 10,4$ pour le clone E et $12,2 \pm 10,9$ pour le clone Z) (**Figure 27.C**) et en condition différenciée ($6,9 \pm 0,9$; $3,5 \pm 1,4$ et 4 respectivement pour la lignée polyclonale, le clone E et le clone Z différenciés) (**Figure 27.D**). Ces résultats suggèrent une coopérativité inter-clonale. Nous pouvons imaginer que les cellules $\alpha 5^+$ stimulent la capacité de prolifération des clones $\alpha 5^-$ adjacents, entraînant ainsi une prolifération accrue de la lignée polyclonale, et inversement.

Pour résumer, nos données démontrent que les lignées polyclonales qui expriment l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation ont une capacité de prolifération plus élevée. De plus, nous pouvons émettre l'hypothèse de l'existence d'une interaction entre les différents clones et son importance dans l'agressivité de la lignée polyclonale.

2. Comparaison des différences phénotypiques de migration selon l'expression de l'intégrine $\alpha 5$

Nous avons ensuite analysé l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la migration cellulaire en réalisant un test en chambre de Boyden. Ce test repose sur la migration des cellules à travers une membrane poreuse localisée sur un insert. Afin d'évaluer l'implication de l'intégrine $\alpha 5$, nous avons également réalisé un dépôt de fibronectine (10 μ g/mL) sur la membrane de l'insert. La quantification du nombre de cellules ayant migré à travers l'insert a été effectuée par comptage automatique des noyaux des cellules marqués au DAPI (macro ImageJ).

En ce qui concerne la lignée NCH421k ($\alpha 5^-$), nous constatons premièrement qu'après différenciation les cellules ont une capacité de migration augmentée par rapport aux cellules NCH421k ($\alpha 5^-$) souches et deuxièmement que leur migration est indépendante de la fibronectine. De manière similaire, dans la lignée NCH644 ($\alpha 5^+$), les cellules souches tumorales migrent moins que les cellules différenciées et de manière indépendante vis-à-vis de la fibronectine. En revanche, après différenciation, le chimiotactisme induit par la fibronectine augmente de manière significative la migration des cellules NCH644 (**Figure 28.A**).

Afin de confirmer l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la migration des cellules différenciées de la lignée NCH644, nous avons ajouté dans le compartiment de la chambre de Boyen un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ (Fr248 à 20 μ M). Les résultats montrent que sans dépôt de fibronectine, le traitement par le Fr248 ne modifie pas la migration des cellules. En revanche, il inhibe de manière significative le chimiotactisme induit par la fibronectine (**Figure 28.B**).

Pour résumer, nos résultats ont mis en évidence l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la migration et la mobilité des cellules différenciées NCH644 ($\alpha 5^+$) médiées par le chimiotactisme de la fibronectine.

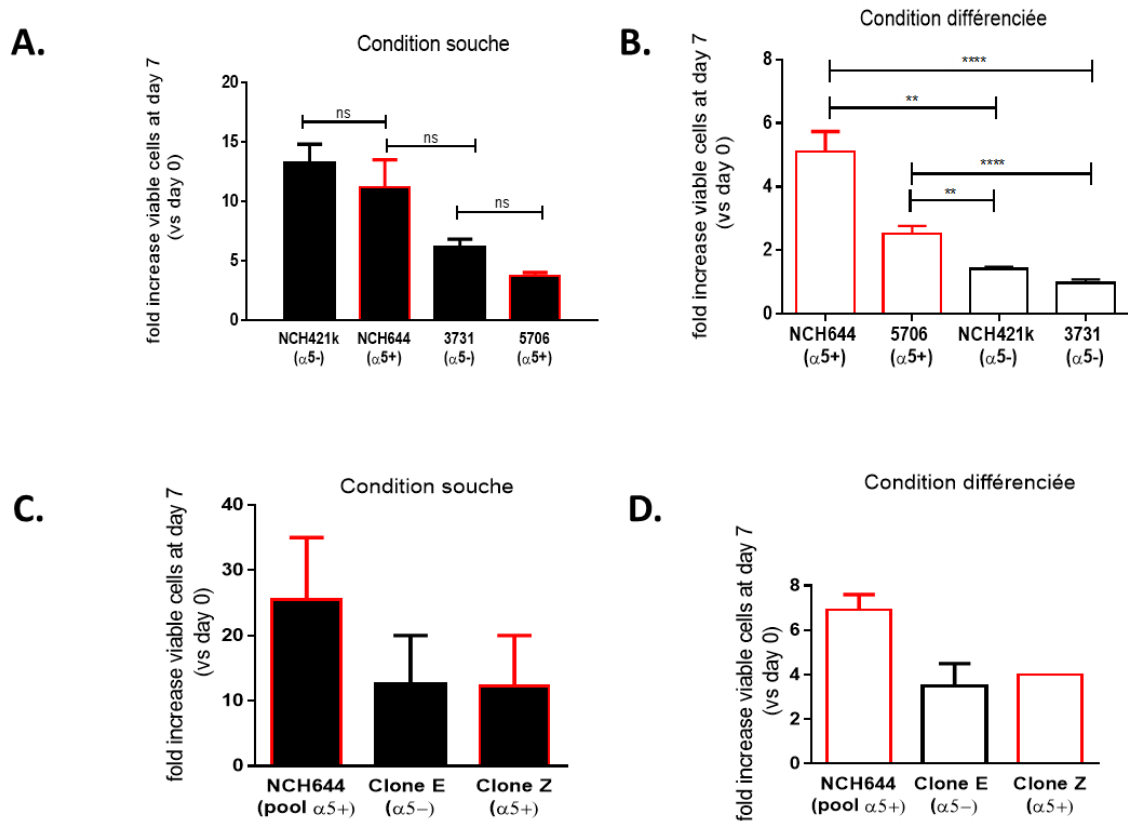


Figure 27 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation est associée à une capacité de prolifération augmentée en condition polyclonale mais pas en condition clonale. Analyse du taux de prolifération sur 7 jours par comptage au bleu trypan, **(A)** des lignées $\alpha 5+$ (NCH644 et 5706) et des lignées $\alpha 5-$ (NCH421k et 3731) en condition souche, **(B)** des lignées $\alpha 5+$ (NCH644 et 5706) et des lignées $\alpha 5-$ (NCH421k et 3731) en condition différenciée, **(C)** de la lignée polyclonale NCH644 ($\alpha 5+$), du Clone E ($\alpha 5-$) et du Clone Z ($\alpha 5+$) en condition souche et **(D)** de la lignée polyclonale NCH644 ($\alpha 5+$), du Clone E ($\alpha 5-$) et du Clone Z ($\alpha 5+$) en condition différenciée ($n > 3$ pour toutes les expériences).

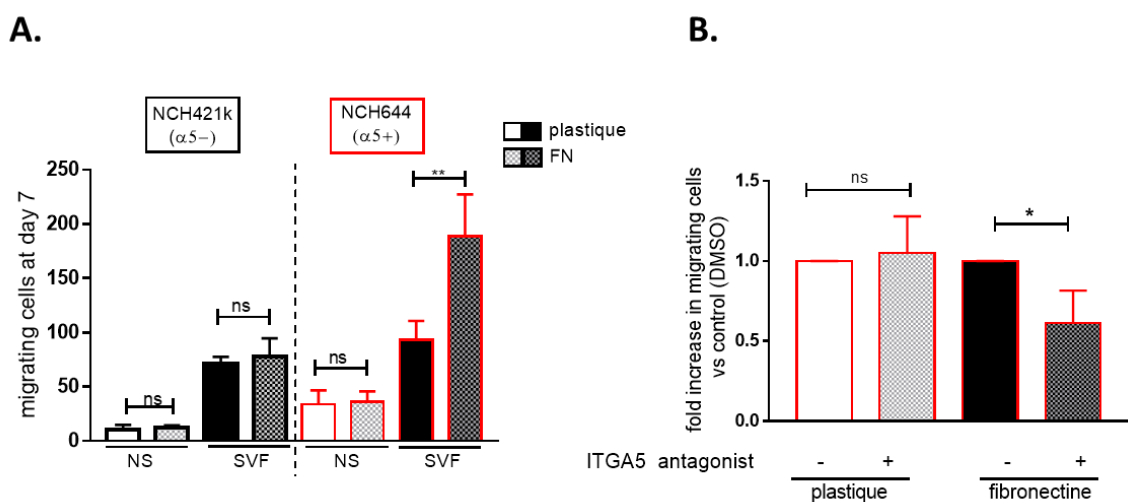


Figure 28 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ induit une migration fibronectine-dépendante dans la lignée NCH644, en condition différenciée. **(A)** Quantification du nombre de cellules ayant migré à travers l'insert (comptage automatique des noyaux colorés au DAPI à l'aide du logiciel d'analyse d'images ImageJ) des lignées NCH421k ($\alpha 5-$) et NCH644 ($\alpha 5+$) avant (NS) et après différenciation (SVF), avec ou sans coating de fibronectine (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($n > 4$). **(B)** Quantification du nombre de cellules ayant migré à travers l'insert de la lignée NCH644 ($\alpha 5+$) différenciée et traitée par un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ (Fr248 à 20 μM) avec ou sans coating de fibronectine (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), par rapport à la lignée non traitée ($n > 4$).

3. Comparaison des différences phénotypiques d'évasion cellulaire selon l'expression de l'intégrine $\alpha 5$

a) Expression de l'intégrine $\alpha 5$ naturelle

Nous avons voulu évaluer la capacité d'évasion des différentes lignées de CSGs selon l'expression de l'intégrine $\alpha 5$. Les résultats phénotypiques précédents ayant montré des différences de prolifération et de migration uniquement en condition différenciée, nous avons étudié l'évasion cellulaire uniquement après différenciation. L'évasion cellulaire a été évaluée en analysant la dispersion des cellules à partir d'une sphère tumorale déposée sur une matrice. Ce modèle, mis au point par l'équipe, permet de garantir les jonctions intercellulaires et de mimer une masse tumorale (579). Afin de déterminer l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans l'évasion cellulaire, nous avons déposé les sphères formées sur fibronectine (15 μ g/mL) et sur polylysine (15 μ g/mL). La migration est analysée 3 jours après le dépôt des sphères.

Nous n'avons pas pu quantifier le nombre de cellules s'échappant de la sphère. Néanmoins, visuellement, nous pouvons constater que la distance de migration des cellules à partir du sphéroïde n'est pas influencée par l'expression de l'intégrine $\alpha 5$. En effet, les sphéroïdes formés par les lignées 3731 ($\alpha 5^-$) et 5706 ($\alpha 5^+$) se délitent totalement et les cellules qui les composaient migrent de manière similaire sur fibronectine (après 3 jours). En revanche, les sphères des lignées NCH421k ($\alpha 5^-$) et NCH644 ($\alpha 5^+$) restent cohésives et les cellules s'évadant du sphéroïde NCH421k présentent une distance de migration plus élevée que la lignée NCH644 sur fibronectine (après 3 jours) (**Figure 29.A**).

De manière intéressante, nos résultats montrent que les cellules n'exprimant pas l'intégrine (NCH421k et 3731) sont capables de migrer quel que soit le substrat matriciel. En revanche, nous avons mis en évidence une migration fibronectine dépendante pour les cellules $\alpha 5^+$ (NCH644 et 5706) (**Figure 29.A**). Cette dépendance à la fibronectine a également été mise en évidence dans les 2 modèles issus de la lignée 3731*. En effet, la lignée 3731* exprimant l'intégrine $\alpha 5$ migre uniquement sur un substrat de fibronectine, tandis que la lignée 3731* $\alpha 5^-$ est capable de migrer sur un substrat de fibronectine ou un substrat neutre de type poly-L-lysine (**Figure 29.B**).

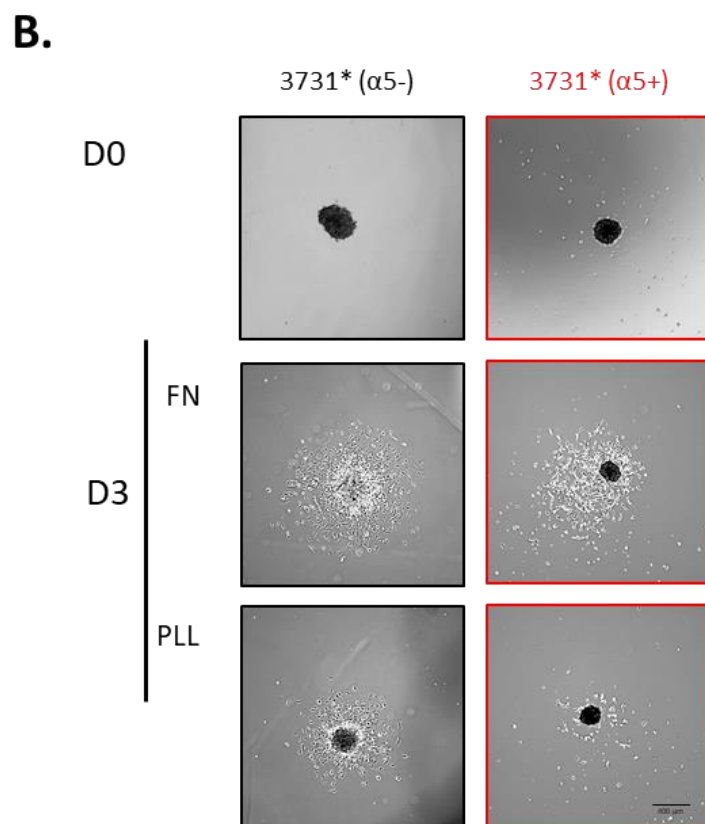
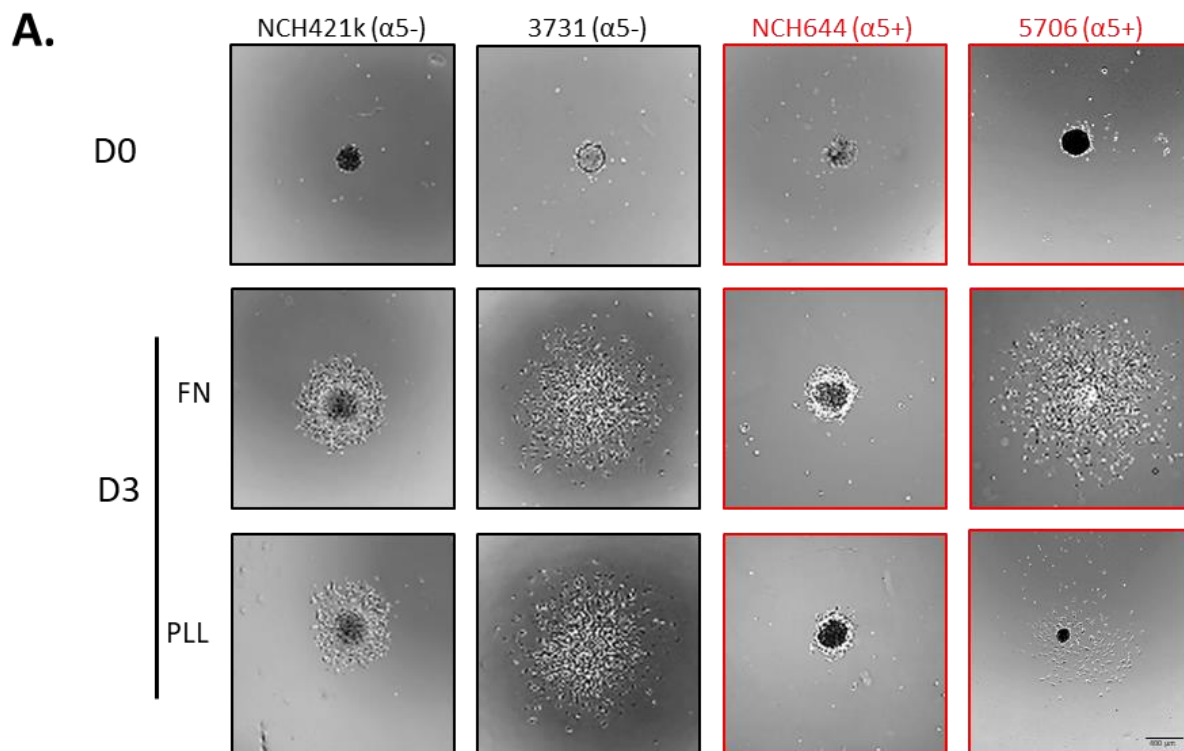


Figure 29 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation rend les cellules dépendantes de la fibronectine pour s'évader du sphéroïde en condition polyclonale. Image par contraste de phase (x4) de l'évasion cellulaire après 3 jours de migration (D3) sur fibronectine (FN, 15 μ g/mL) ou polylysine (PLL, 15 μ g/mL) **(A)** des lignées différenciées $\alpha 5^-$ (NCH421k et 3731) et $\alpha 5^+$ (NCH644 et 5706) et **(B)** des deux modèles des lignées différenciées 3731* $\alpha 5^+$ et $\alpha 5^-$. Barre d'échelle de 400 μ m (n>5).

En ce qui concerne l'analyse de l'évasion cellulaire des clones issus de la lignée NCH644, le clone E ($\alpha 5^-$) n'adhère pas à la fibronectine mais migre sur une matrice de polylysine. En revanche, le clone Z ($\alpha 5^+$) migre uniquement sur fibronectine. Nous avons voulu confirmer l'implication de l'intégrine $\alpha 5^+$ dans l'évasion cellulaire sur fibronectine. Pour cela, nous avons traité les sphères après leur adhérence (4 heures après leur dépôt) par un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ (Fr 248 à $20\mu\text{M}$). Nous constatons que l'inhibition de l'intégrine empêche la migration des cellules $\alpha 5$ (lignée polyclonale NCH644 et Clone Z) (**Figure 30**).

Pour résumer, nous n'avons pas mis en évidence une plus forte capacité à migrer des cellules $\alpha 5^+$ comparé aux cellules $\alpha 5^-$. Néanmoins, nos résultats démontrent une dépendance des lignées $\alpha 5^+$ (NCH644 et 5706) et du Clone Z ($\alpha 5^+$) à la fibronectine dans la migration cellulaire.

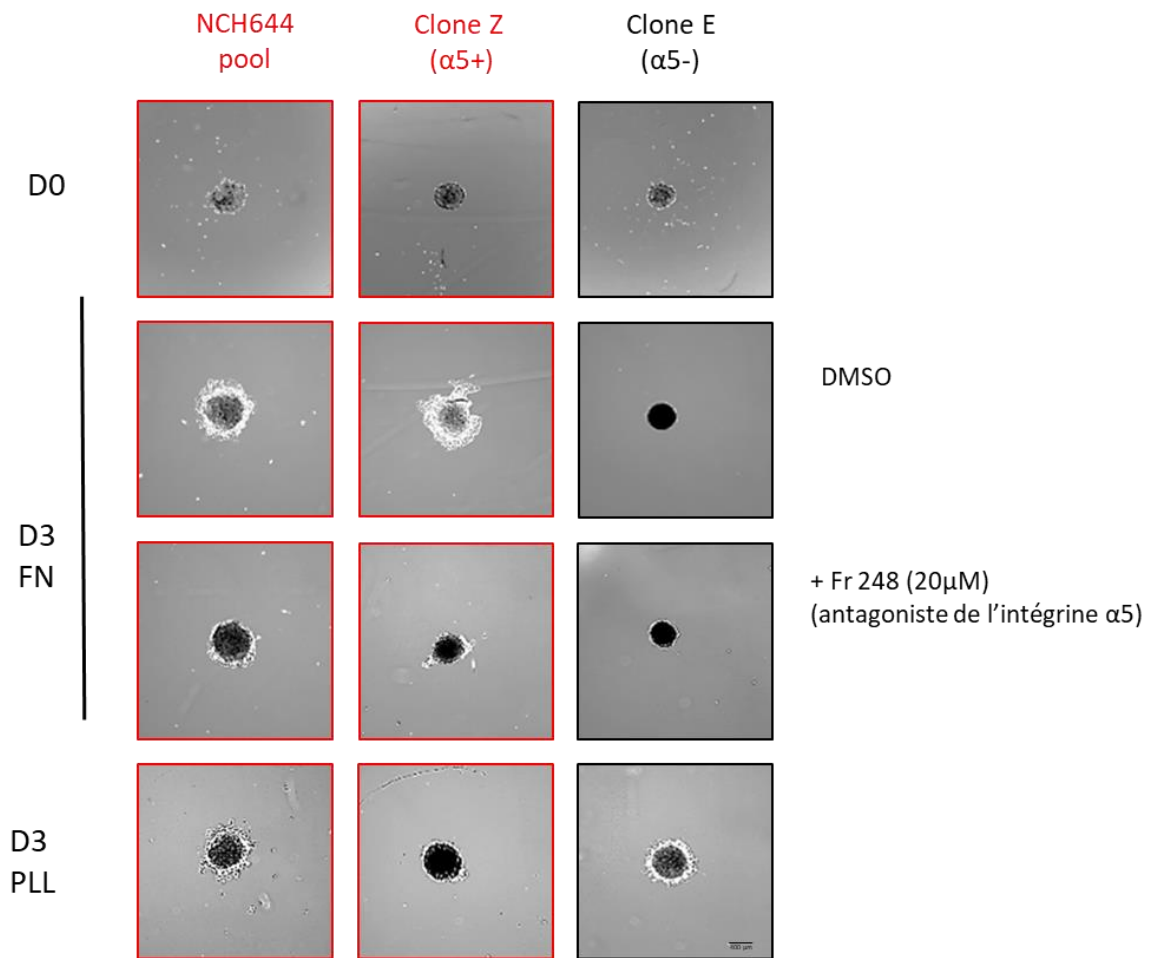


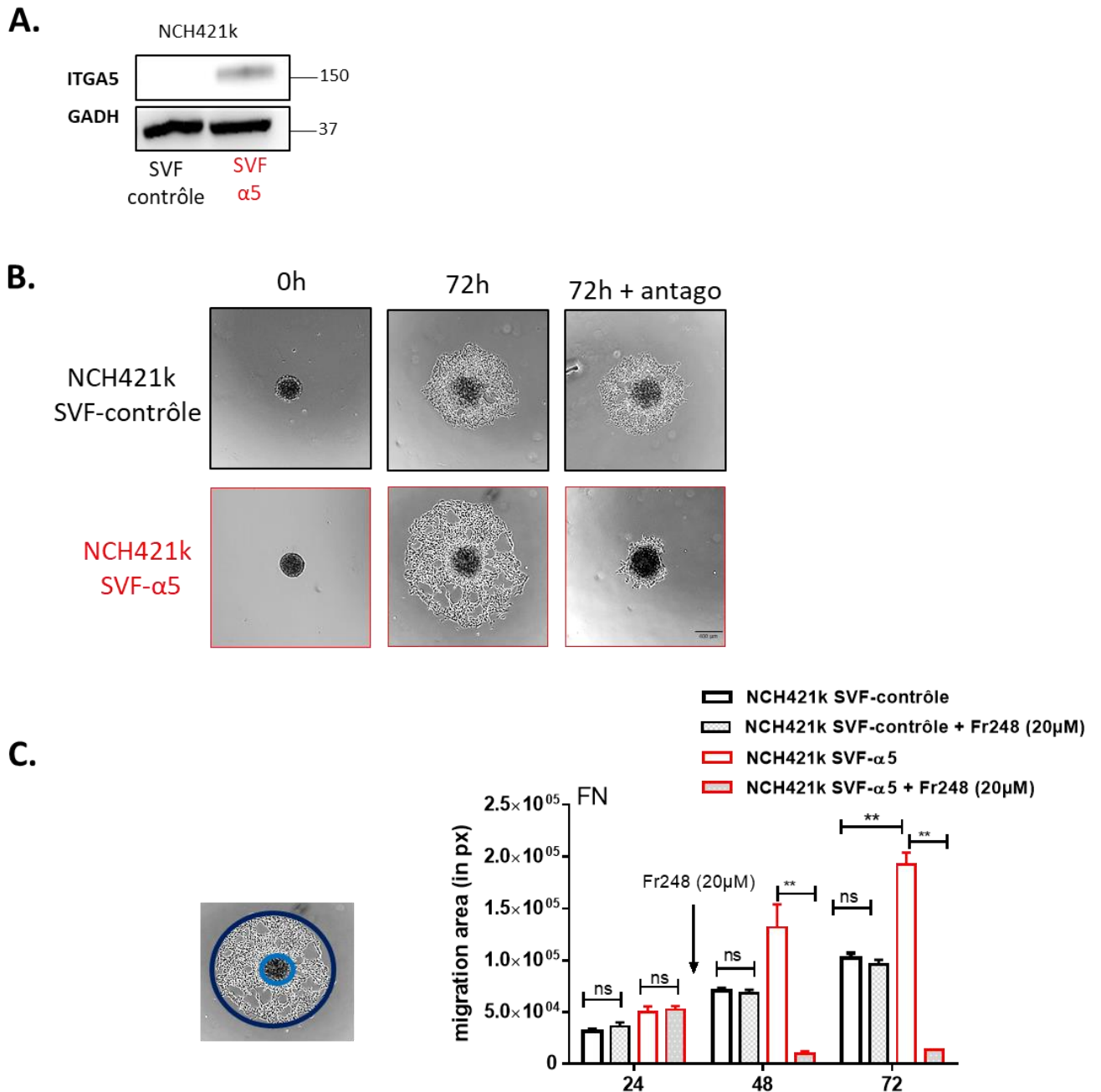
Figure 30 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation rend les cellules dépendantes de la fibronectine pour s'évader du sphéroïde en condition clonale. Image par contraste de phase ($\times 4$) de l'évasion cellulaire après 3 jours de migration (D3) sur fibronectine (FN, 15 μ g/mL) ou polylysine (PLL, 15 μ g/mL) de la lignée polyclonale NCH644 (NCH644 pool $\alpha 5+$) et des clones Z ($\alpha 5+$) et E ($\alpha 5-$) traités par un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ (Fr248 à 20 μ M) 4h après le dépôt des sphéroïdes (n=3). Barre d'échelle de 400 μ m.

b) Expression de l'intégrine $\alpha 5$ forcée

L'analyse de l'évasion cellulaire à partir d'un sphéroïde n'a pas mis en évidence une distance de migration différente entre les lignées (**Figure 29.A**). Néanmoins, les cellules au sein du clone Z de la lignée NCH644 ($\alpha 5+$) semblent présenter une capacité de migration augmentée par rapport à la lignée polyclonale NCH644, sur fibronectine (**Figure 30**). Ces observations nous ont laissé penser que l'évaluation de la distance de migration ne peut être optimale lorsqu'elle est comparée entre différentes lignées. C'est pourquoi nous avons transfecté le gène de l'intégrine $\alpha 5$ dans la lignée NCH421k différenciée (après une différenciation à long terme), de manière stable. En contrôle, la lignée NCH421k différenciée a été transfectée par un plasmide non codant (SVF-contrôle).

L'efficacité de la transfection a été validée par Western blot (**Figure 31.A**). Nous avons évalué l'évasion cellulaire à partir d'un sphéroïde de la lignée NCH421k différenciée contrôle (SVF-contrôle) et transfectée (SVF- $\alpha 5$) sur un coating de fibronectine (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pendant 3 jours. De manière intéressante, nous constatons que les cellules différenciées exprimant l'intégrine (SVF- $\alpha 5$) migrent plus loin que les cellules ne l'exprimant pas. Afin d'évaluer l'implication de l'intégrine, nous avons traité les sphéroïdes 24 heures après leur dépôt, par un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ (Fr248, 20 μM). Les résultats montrent une inhibition significative de la migration des cellules différenciées exprimant l'intégrine, tandis que les cellules contrôles ($\alpha 5-$) migrent de manière similaire aux cellules sans traitement (**Figure 31.B**).

Afin de quantifier l'effet de l'inhibition de l'intégrine sur la migration, nous avons choisi d'estimer l'évasion cellulaire en calculant la différence entre l'aire de migration et du sphéroïde (**Figure 31.C**). La quantification de l'évasion cellulaire confirme le gain de migration de la lignée NCH421k différenciée transfectée (SVF- $\alpha 5$) comparée à la lignée NCH421k contrôle (SVF-contrôle) après 72 heures de migration. L'ajout d'un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ après 24h de migration inhibe de manière significative la migration des cellules de la lignée NCH421k différenciée transfectée (SVF- $\alpha 5$). Aucune réaction non spécifique n'est mise en évidence sur la migration de la lignée NCH421k différenciée contrôle.



Aire d'évasion: (aire de migration – aire du sphéroïde) D3

Figure 31 - L'expression forcée de l'intégrine α5 après différenciation induit une augmentation de l'évasion cellulaire à partir d'un sphéroïde. (A) Analyse protéique par Western blot de l'expression de l'intégrine α5 dans la lignée NCH421k transfectée par un plasmide non codant (SVF-contrôle) et par un plasmide contenant le gène de l'intégrine (SVF-α5), en condition différenciée (n>3). (B) Image par contraste de phase (x4) de l'évasion cellulaire après 72 heures de migration sur fibronectine (15μg/mL) des lignées NCH421k différenciées contrôle (SVF-contrôle) et transfectée (SVF-α5). Un antagoniste de l'intégrine α5 (Fr248, 20μM) a été ajouté après 24 heures de migration (n=3). Barre d'échelle de 400 μm. (C) Méthode de quantification de l'évasion cellulaire. L'histogramme représente la quantification de l'évasion cellulaire après 24, 48 et 72h de migration, avec ou sans traitement (n=2).

III. Mise au point d'un modèle cellulaire de la lignée NCH421k exprimant l'intégrine $\alpha 5$ en condition souche

Nos résultats précédents ont mis en évidence l'existence de deux types de CSGs dont certaines sont programmées à exprimer l'intégrine $\alpha 5$. Celles-ci forment des cellules différenciées qui, non seulement expriment l'intégrine, mais qui présentent également une capacité de prolifération et de migration augmentée, et une évation cellulaire dépendante de la fibronectine. Nous avons voulu confirmer l'importance de l'intégrine dans les phénotypes observés. Nous avons décidé de mimer la « programmation » de l'intégrine dans une lignée de CSGs incapables de l'exprimer. Ainsi, nous avons forcé l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans la lignée NCH421k par transfection de son gène en condition souche.

La lignée NCH421k a été transfectée, en condition souche, soit par un plasmide contenant le gène de l'intégrine $\alpha 5$ (pcDNA3.1) (lignée NCH421k- $\alpha 5$) soit par un plasmide vide en contrôle (lignée NCH421k-mock). L'ensemble des cellules exprimant potentiellement l'intégrine a été sélectionné par tri cellulaire. Nous avons évalué l'efficacité de la transfection dans les cellules souches NCH421k- $\alpha 5$ par Western blot et par RT-qPCR. Nous avons également vérifié l'expression de l'intégrine à la membrane par cytométrie en flux. Par ailleurs, l'intégrine étant exprimée naturellement après différenciation dans les lignées NCH644 et 5706, nous avons également vérifié son expression après une différenciation totale induite par l'acide rétinoïque (ATRA).

Les résultats montrent que l'intégrine $\alpha 5$ n'est pas exprimée au niveau protéique dans les cellules transfectées (NCH421k- $\alpha 5$) avant et après différenciation (**Figure 32.A**). Cependant, nous constatons une forte expression de l'intégrine au niveau transcriptionnel. En effet, la quantité de transcrits de l'intégrine $\alpha 5$ dans la lignée NCH421k- $\alpha 5$ est augmentée de plus de 233 fois par rapport à la lignée contrôle NCH421k-mock (**Figure 32.B**). De plus, l'analyse de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ à la surface met en évidence la présence d'un faible nombre de cellules exprimant plus fortement l'intégrine dans la lignée NCH421k- $\alpha 5$ souche. Ces résultats suggèrent que quelques cellules souches au sein de la lignée NCH421k- $\alpha 5$ ont bien intégré le gène de l'intégrine $\alpha 5$ (**Figure 32.C**).

Nous avons effectué un second tri au sein de la lignée NCH421k- $\alpha 5$ afin de sélectionner et cloner les cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5$ (en condition souche). Après amplification, l'expression de l'intégrine a été analysée en condition souche dans 17 clones. Les résultats montrent que 5 d'entre eux expriment l'intégrine $\alpha 5$ (B9, D4, E1, E3 et G4). A la suite de cette analyse, 4 clones ont été sectionnés, deux n'exprimant pas l'intégrine (Clones B7 et C11) et deux l'exprimant (clones D4 et E3) (**Figure 32.D**).

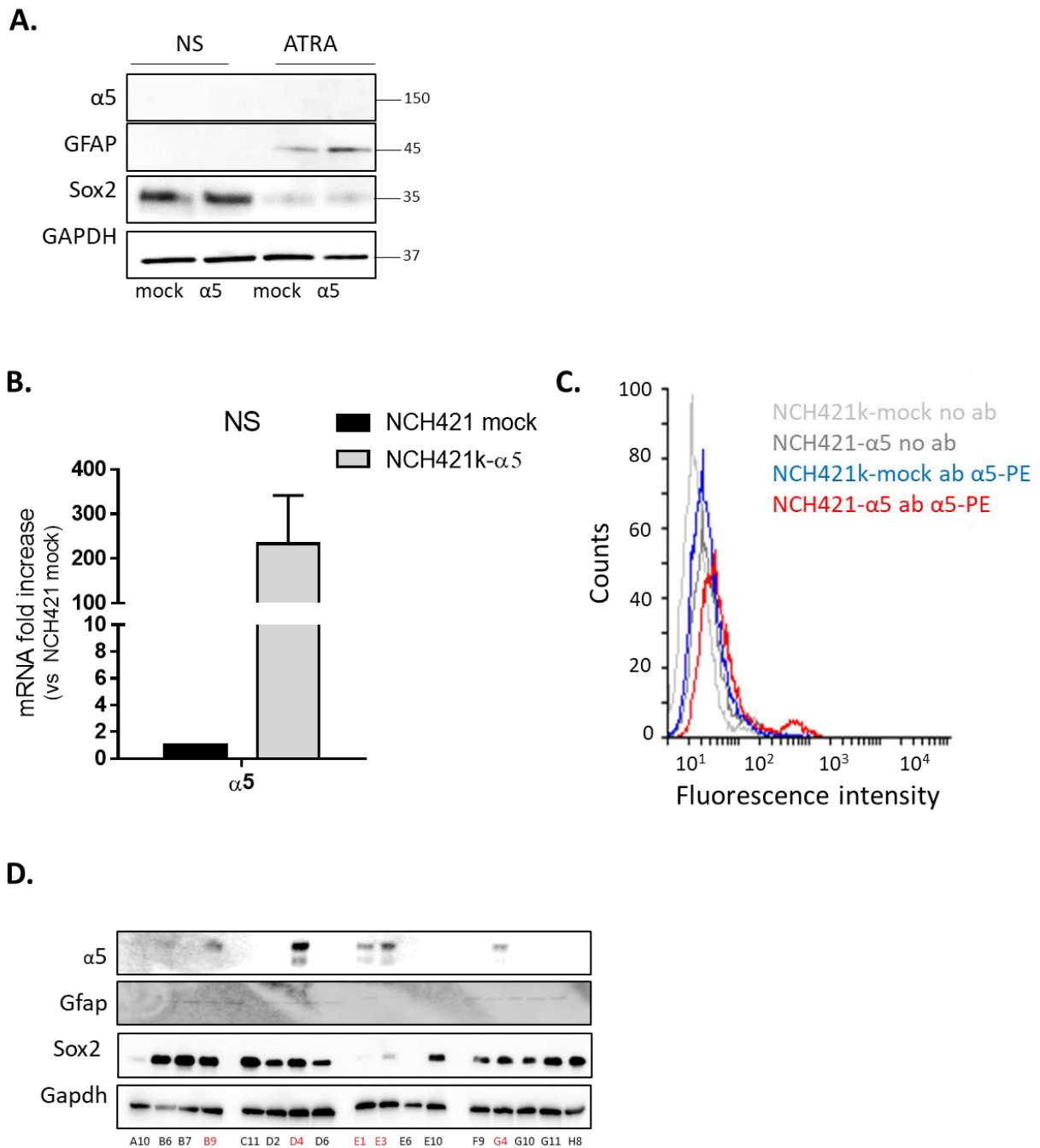


Figure 32 - L'analyse de l'efficacité de la transfection de l'intégrine $\alpha 5$ dans la lignée souche NCH421k montre qu'un faible nombre de cellules a intégré le gène de l'intégrine. (A) Analyse par Western blot de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$, de la GFAP et de Sox2 dans la lignée NCH421 transfectée par un plasmide vide (NCH421k-mock) et par un plasmide contenant le gène de l'intégrine (NCH421k- $\alpha 5$) avant (NS) et après différenciation (ATRA) ($n > 3$). **(B)** Quantification du nombre de transcrits du gène de l'intégrine $\alpha 5$ par RT-qPCR dans la lignée NCH421k- $\alpha 5$ comparé à la lignée NCH421k-mock en condition souche (NS) ($n > 3$). **(C)** Analyse par cytométrie en flux de l'expression en surface de l'intégrine $\alpha 5$ dans les lignées NCH421k-mock et $\alpha 5$ en condition souche ($n = 2$). **(D)** Immunoblot de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ et de la GFAP de 17 clones issus de la lignée NCH421k- $\alpha 5$ en condition souche ($n > 3$).

1. Caractérisation des clones NCH421k B7 ($\alpha 5^-$), C11($\alpha 5^-$), D4($\alpha 5^+$) et E3 ($\alpha 5^+$)

Nous avons vu dans les expériences précédentes que l'intégrine $\alpha 5$ est sur-régulée après différenciation. Ainsi, nous avons voulu nous assurer que l'insertion du gène de l'intégrine $\alpha 5$ ne modifie ni le phénotype souche des clones ni leur capacité à se différencier. C'est pourquoi nous avons induit la différenciation des différents clones par du sérum (10%). De manière similaire aux expériences menées sur les différentes lignées, nous travaillons dans des conditions de différenciation de long-terme (> 1 mois). Dans un premier temps, nous pouvons voir sur la **Figure 33.A** que la morphologie des clones n'est pas altérée par l'insertion du gène de l'intégrine $\alpha 5$. En condition souche, les quatre clones forment des neurosphères, tandis qu'en condition de différenciation, ils poussent de manière adhérente.

Nous avons vérifié le statut souche et la capacité de différenciation des clones par Western blot. Le résultat montre que les 4 clones, en condition souche, expriment le marqueur souche Sox2 et n'expriment pas la GFAP. Ce résultat confirme que la transfection du gène de l'intégrine $\alpha 5$ n'induit pas la différenciation des cellules souches. De plus, après différenciation, nous observons l'expression de la GFAP dans les clones C11, D4 et E3, confirmant leur capacité de différenciation. Enfin, nous constatons que l'intégrine $\alpha 5$ est un marqueur induit par la différenciation compte tenu que son expression augmente après différenciation des clones $\alpha 5^+$ (D4 et E3) (**Figure 33.B**).

Nous avons également étudié le taux d'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ dans les différents clones, avant et après différenciation, par rapport au taux de la lignée NCH421k-mock en condition souche. Nous constatons que le taux d'ARNm augmente après différenciation dans tous les clones. De manière intéressante, bien que le taux d'ARNm dans le clone B7 ($\alpha 5^-$) et la lignée polyclone transfectée soit augmenté en condition souche par rapport à la lignée NCH421k-mock souche, il n'est pas suffisant pour induire l'expression protéique de l'intégrine $\alpha 5$. En ce qui concerne les clones $\alpha 5^+$, le taux basal de l'ARNm est largement augmenté en condition souche (**Figure 33.C**).

Nous avons également voulu vérifier l'absence de différenciation induite par la transfection au niveau transcriptionnel, en condition souche. Les résultats ne montrent pas de différence significative du nombre de transcrits des marqueurs souches (CD133 et Sox2) entre la lignée NCH421k-mock et les différents clones. Ceci nous confirme que la transfection du gène de l'intégrine n'influence pas la régulation transcriptionnelle de marqueurs souches. Enfin, nous constatons que la transfection de l'intégrine n'induit pas l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ (**Figure 33.D**).

Nous avons mis en évidence dans la **Figure 24**, que les lignées $\alpha 5^+$ (NCH644 et 5706) présentaient une capacité de différenciation plus complète, avec la perte des ARNm de marqueurs après différenciation. Nous avons voulu savoir si nous retrouvions cette même signature dans les clones $\alpha 5^+$ (D4 et E3) issus de la lignée NCH421k transfectée. Nous avons représenté sur la **Figure 34** le taux d'ARNm des gènes souches (CD133 et Sox2) induit par la différenciation. De manière intéressante, nous observons la même signature dans les clones D4 et E3 ($\alpha 5^+$) avec la diminution des ARNm de CD133 et de Sox2, tandis que le clone C11 ($\alpha 5^-$) et la lignée

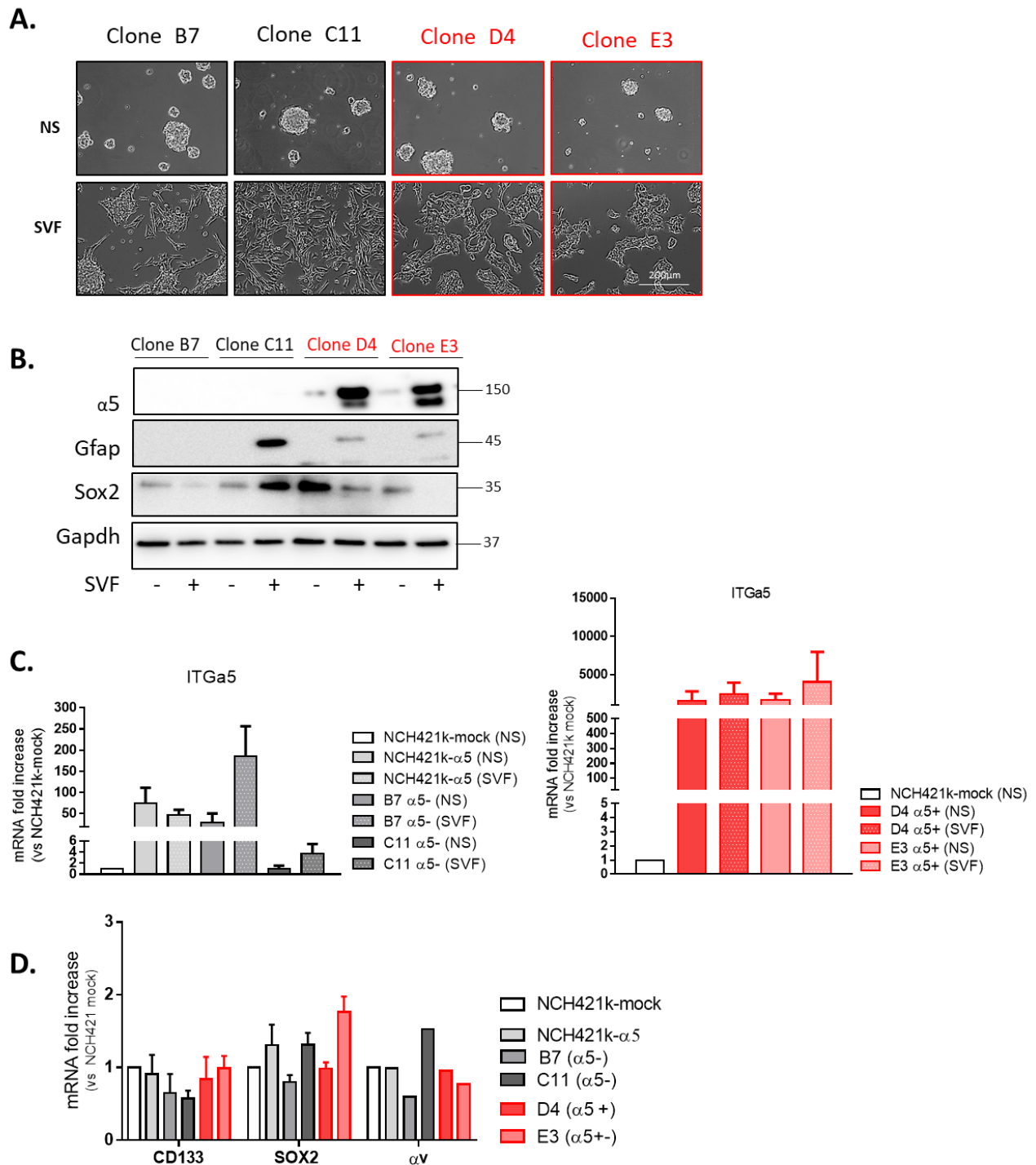


Figure 33 - La transfection du gène de l'intégrine $\alpha 5$ n'influence ni le phénotype souche ni la capacité de différenciation des clones. (A) Image par contraste de phase de la morphologie (x20) des clones issus de la lignée NCH421k- $\alpha 5$ en condition souche (NS) et en condition différenciée (FBS). Barre d'échelle de 200 μm . (B) Western blot de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$, de la GFAP et de Sox2 avant et après différenciation dans les clones $\alpha 5^-$ (Clones B7 et C11) et dans les clones $\alpha 5^+$ (Clones D4 et E3) ($n > 3$). (C) et (D) Analyse par RT-qPCR de l'ARNm des gènes de l'intégrine $\alpha 5$, CD133, Sox2 et de l'intégrine αv , dans la lignée polyclonale NCH421k- $\alpha 5$ et dans les différents clones comparés à la lignée NCH421-mock souche ($n > 2$).

polyclonale NCH421k- $\alpha 5$ ($\alpha 5^-$) présentent un taux d'ARNm des gènes CD133 et Sox2 stable (voire augmenté) après différenciation. Seul le clone B7 ($\alpha 5^-$) ne présente pas une signature transcriptionnelle similaire aux autres cellules $\alpha 5^-$. Cependant, le clone B7 semble être particulier : il n'exprime pas le GFAP et présente un taux d'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ en condition basale (NS) élevé (**Figure 33.C**). Ainsi, bien que n'exprimant pas l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation, le clone B7 présente des marqueurs similaires aux cellules $\alpha 5^+$.

Pour résumer, la transfection du gène de l'intégrine $\alpha 5$ a été efficace et ne modifie ni le statut souche des clones ni leur capacité de se différencier. La signature transcriptionnelle (perte des ARNm des gènes de marqueurs souches) mise en évidence dans les lignées $\alpha 5^+$ (NCH644 et 5706) a été retrouvée dans les deux clones $\alpha 5^+$ (D4 et E3).

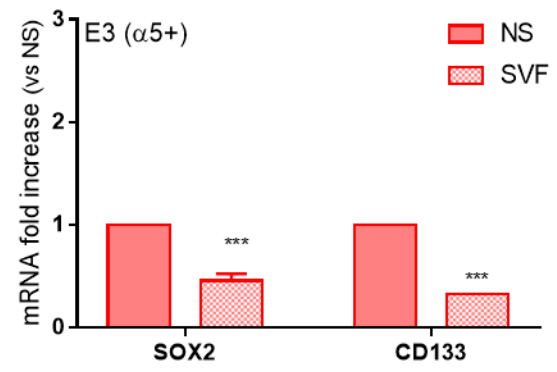
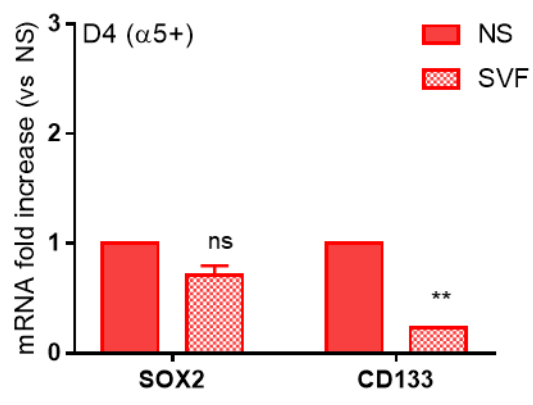
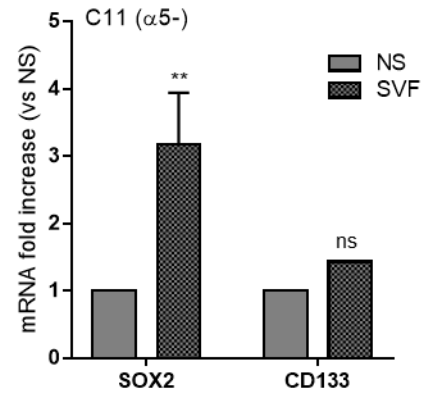
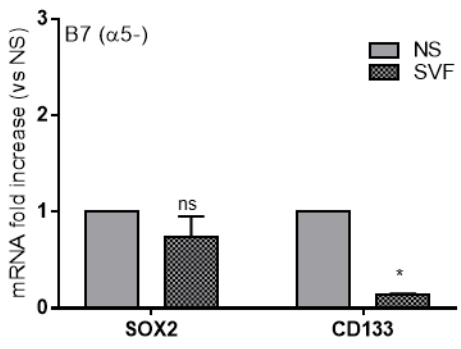
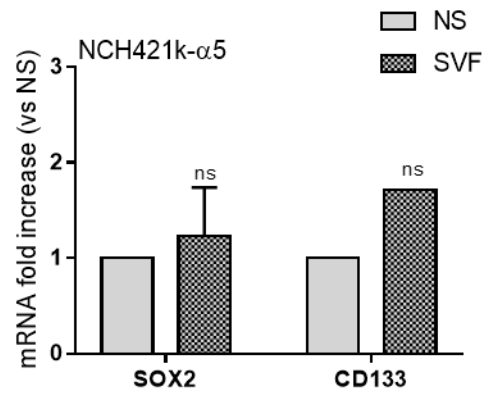


Figure 34 - L'expression de l'intégrine α 5 semble être associée à une différenciation complète. Rapport du nombre de transcrits des gènes Sox2 et CD133 dans la lignée NCH421k- α 5, dans les clones α 5- (B7 et C11) et dans les clones α 5+ (D4 et E3) en condition différenciée (SVF) comparée à la condition souche (NS) (n>2).

2. Evaluation de l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la prolifération

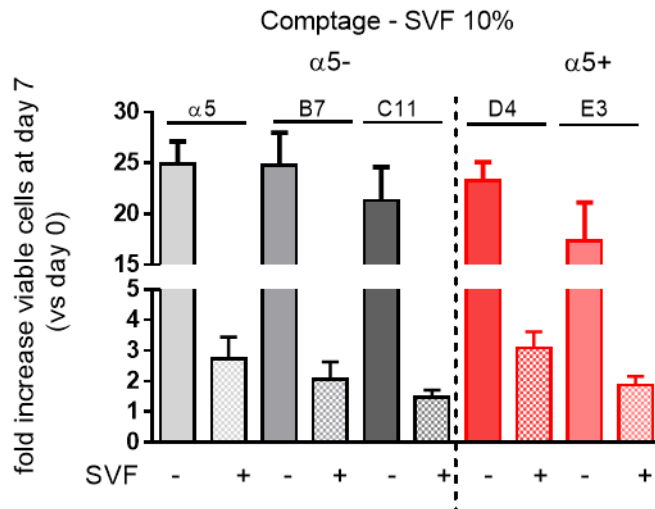
Nous avons mis en évidence une capacité de prolifération et de migration augmentée et une évation cellulaire dépendante de la fibronectine dans les lignées différenciées $\alpha 5+$ (5706 et NCH644) (**Figure 27, Figure 28****Figure 29**). Nous avons voulu confirmer ces résultats dans les clones issus de la lignée NCH421k- $\alpha 5$.

Nous avons analysé le taux de prolifération sur 7 jours la lignée polyclonale transfectée (NCH421k- $\alpha 5$), des clones $\alpha 5-$ (B7 et C11) et des clones $\alpha 5+$ (D4 et E3) par comptage au bleu trypan et par le dosage de la succinate déshydrogénase (test MMT). Les résultats du comptage montrent que l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ n'influence pas la prolifération, ni en condition souche ni en condition différenciée. De manière similaire aux résultats obtenus avec les différentes lignées, nous constatons que les clones ont une capacité de prolifération diminuée après différenciation (**Figure 35.A**).

Etonnamment, l'évaluation de la prolifération cellulaire par le test MTT présente des résultats différents du comptage. En effet, alors que les clones n'exprimant pas l'intégrine (B7 et C11) et la lignée polyclonale NCH421k- $\alpha 5$ ($\alpha 5-$) prolifèrent moins après différenciation, les clones exprimant l'intégrine $\alpha 5$ (D4 et E3) présentent une prolifération augmentée après différenciation (**Figure 35.B**). Ainsi, le test MTT ne confirme pas les résultats obtenus par comptage des cellules. Néanmoins, la succinate déshydrogénase étant une enzyme mitochondriale, son activité permet d'estimer le nombre de cellules vivantes actives (et donc d'extrapoler leur capacité de prolifération), mais surtout elle permet d'évaluer l'activité métabolique des cellules. Ainsi, nos résultats suggèrent qu'après différenciation, les clones $\alpha 5-$ présentent une activité mitochondriale diminuée par rapport à leur statut souche, au contraire des clones $\alpha 5+$ dont le métabolisme semble augmenter pendant leur différenciation.

Pour résumer, nos résultats n'ont pas montré que l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ augmente la capacité de prolifération des clones $\alpha 5+$ (D4 et E3) comparée aux clones $\alpha 5-$ (C11 et B7), en condition souche et également en condition différenciée. Néanmoins, nous avons constaté que l'intégrine semble modifier le métabolisme des clones $\alpha 5+$ pendant leur différenciation.

A.



B.

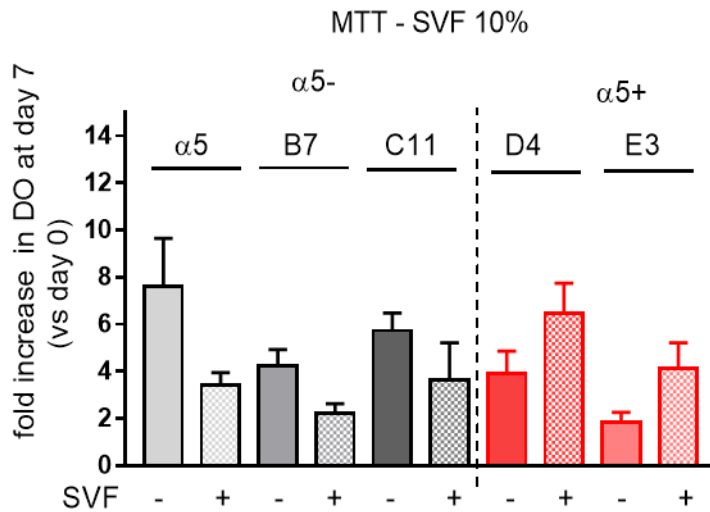
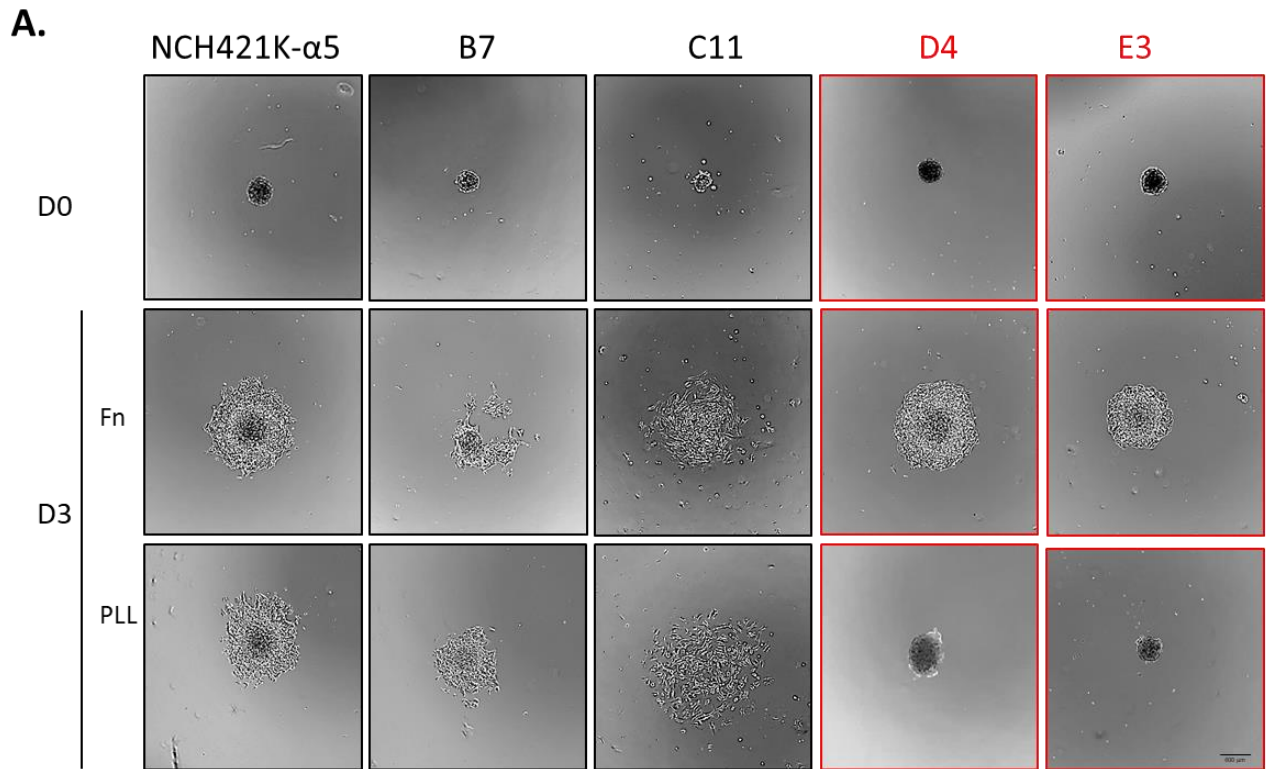


Figure 35 - L'intégrine $\alpha 5$ n'est pas impliquée dans la prolifération des clones $\alpha 5^+$ mais semble influencer le métabolisme cellulaire mitochondrial. Analyse du taux de prolifération sur 7 jours de la lignée polyclonale NCH421k- $\alpha 5$, des clones $\alpha 5^-$ (C11 et B7) et des clones $\alpha 5^+$ (D4 et E3) en condition souche (SVF-) et différenciée (SVF+), **(A)** par comptage au bleu trypan sur plastique (n>4) et **(B)** par dosage de la succinate déshydrogénase (MTT) sur une matrice de laminine (10 μ g/mL) (n>3).

3. Evaluation de l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans l'évasion cellulaire et dans l'expansion tumorale

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'évasion cellulaire. Nous avons mis en évidence une évasion dépendante de la fibronectine pour les lignées $\alpha 5+$ (5706 et NCH644) (**Figure 29**). Selon le même protocole, nous avons forcé les cellules différenciées à former un sphéroïde, que nous avons déposé sur un coating neutre de polylysine (15 μ g/mL) ou un coating de fibronectine (15 μ g/mL), afin d'estimer la migration des cellules sur 3 jours.

Nos résultats apportent des constats similaires à ceux observés dans les lignées polyclonales. En effet, nous observons une capacité de migration sur polylysine et sur fibronectine pour les clones $\alpha 5-$ (C11 et B7) et pour la lignée polyclonale transfectée. En revanche, les cellules des clones $\alpha 5+$ (D4 et E3) s'évadent uniquement sur fibronectine (**Figure 36.A**). Afin de confirmer l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la migration sur fibronectine, nous avons délété transitoirement le gène de l'intégrine par si-RNA (24h avant le dépôt du sphéroïde). Comme nous pouvons le voir sur la **Figure 36.B**, la migration sur fibronectine des cellules du clone D4 est inhibée. Afin de quantifier l'effet de l'inhibition de l'intégrine sur la migration, nous avons estimé l'évasion cellulaire en calculant le rapport de l'aire de migration au 3^{ème} jour sur l'aire du sphéroïde déposé, à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats quantitatifs montrent que l'inhibition de l'intégrine par si-RNA entraîne une diminution de l'aire de migration de 30%.



B.

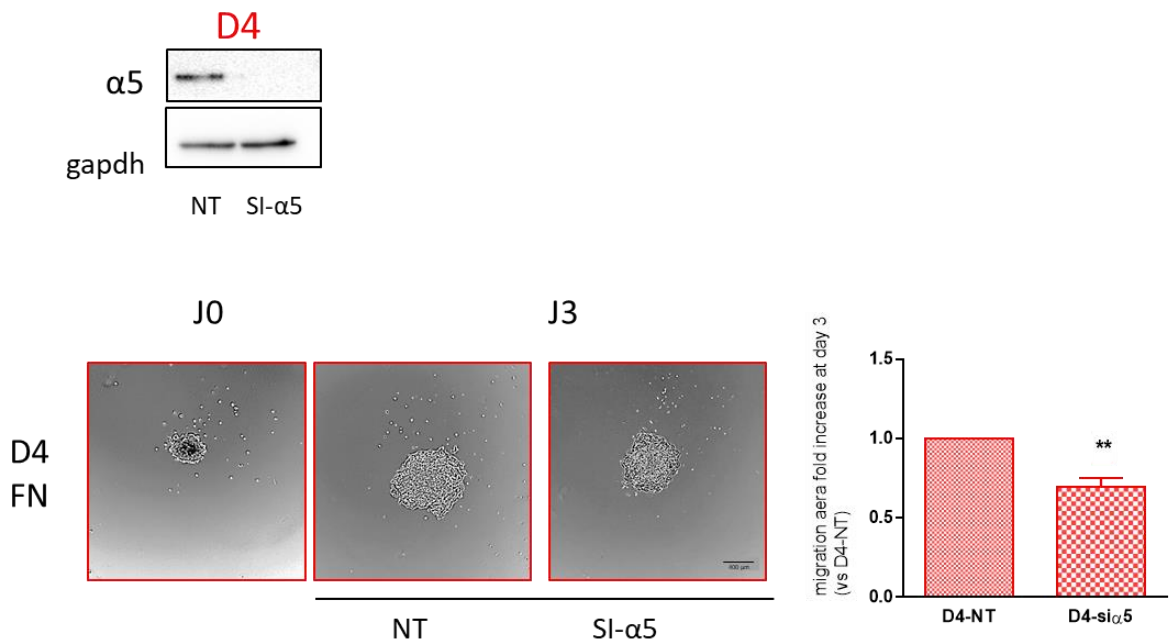


Figure 36 - L'intégrine $\alpha 5$ rend les cellules dépendantes de la fibronectine pour s'évader du sphéroïde. Image par contraste de phase (x4) de l'évasion cellulaire sur 3 jours (D3) **(A)** des cellules différenciées des lignées NCH421k- $\alpha 5$, des clones $\alpha 5^-$ (B7 et C11) et des clones $\alpha 5^+$ (D4 et E3) sur polylysine (PLL, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et sur fibronectine (FN, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($n > 4$), **(B)** du clone D4 ($\alpha 5^+$) dont le gène a été transitoirement délété par un si-RNA (24h avant la formation du sphéroïde) sur fibronectine après 3 jours d'évasion (D3). L'histogramme représente la quantification de l'évasion cellulaire après 3 jours de migration du clone D4 délété pour le gène de l'intégrine $\alpha 5$ normalisée par rapport au clone D4 non délété. L'immunoblot représente l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules D4 ayant été transfectée par un plasmide non codant (NT) et par un plasmide contenant le gène de l'intégrine $\alpha 5$, après 24h de transfection ($n = 5$). Barre d'échelle de 400 μm .

De manière étonnante, nous avons constaté sur polylysine (c'est-à-dire dans des conditions ne permettant pas la migration des clones $\alpha 5+$) une augmentation de la taille des sphéroïdes formés par les clones D4 et E3. Nous avons confirmé cette observation en laissant les sphéroïdes des clones D4 et E3 sur polylysine pendant 7 jours (**Figure 37.A**). La quantification de l'aire des sphéroïdes, au moment du dépôt et 7 jours après, montre que la taille du sphéroïde est multipliée par 5 pour le clone D4 et par 3 pour le clone E3 sur polylysine pendant 7 jours. Ainsi, nous constatons un gain de prolifération des clones $\alpha 5+$ en condition 3D comparée à une condition adhérente (comparaison **Figure 37.A** et **Figure 35.A**).

Nous avons voulu savoir si les clones $\alpha 5-$ présentent également un gain de prolifération en condition 3D. Cependant, les clones C11 et B7 étant capables de migrer sur polylysine, il était impossible d'évaluer la prolifération dans ces conditions. C'est pourquoi nous avons mesuré l'aire des sphéroïdes avant leur dépôt, dans les gouttes de méthylcellulose ayant permis de les former (voir Chapitre Matériel et Méthodes). Ce modèle de prolifération représente davantage l'expansion tumorale que le modèle de prolifération en 2D. Nous constatons qu'après 7 jours de croissance, la taille des sphéroïdes des clones D4 et E3 augmente de manière significative ($2,18 \pm 0,66$ fois et $1,53 \pm 0,39$ fois respectivement) au contraire des clones B7 et C11 dont la taille des sphéroïdes diminue ($0,88 \pm 0,33$ fois et $0,89 \pm 0,17$ fois respectivement) (**Figure 37.B**).

Pour résumer, nous avons mis en évidence le rôle de l'intégrine $\alpha 5$ dans une évansion cellulaire dépendante de la fibronectine et dans l'expansion d'une masse tumorale.

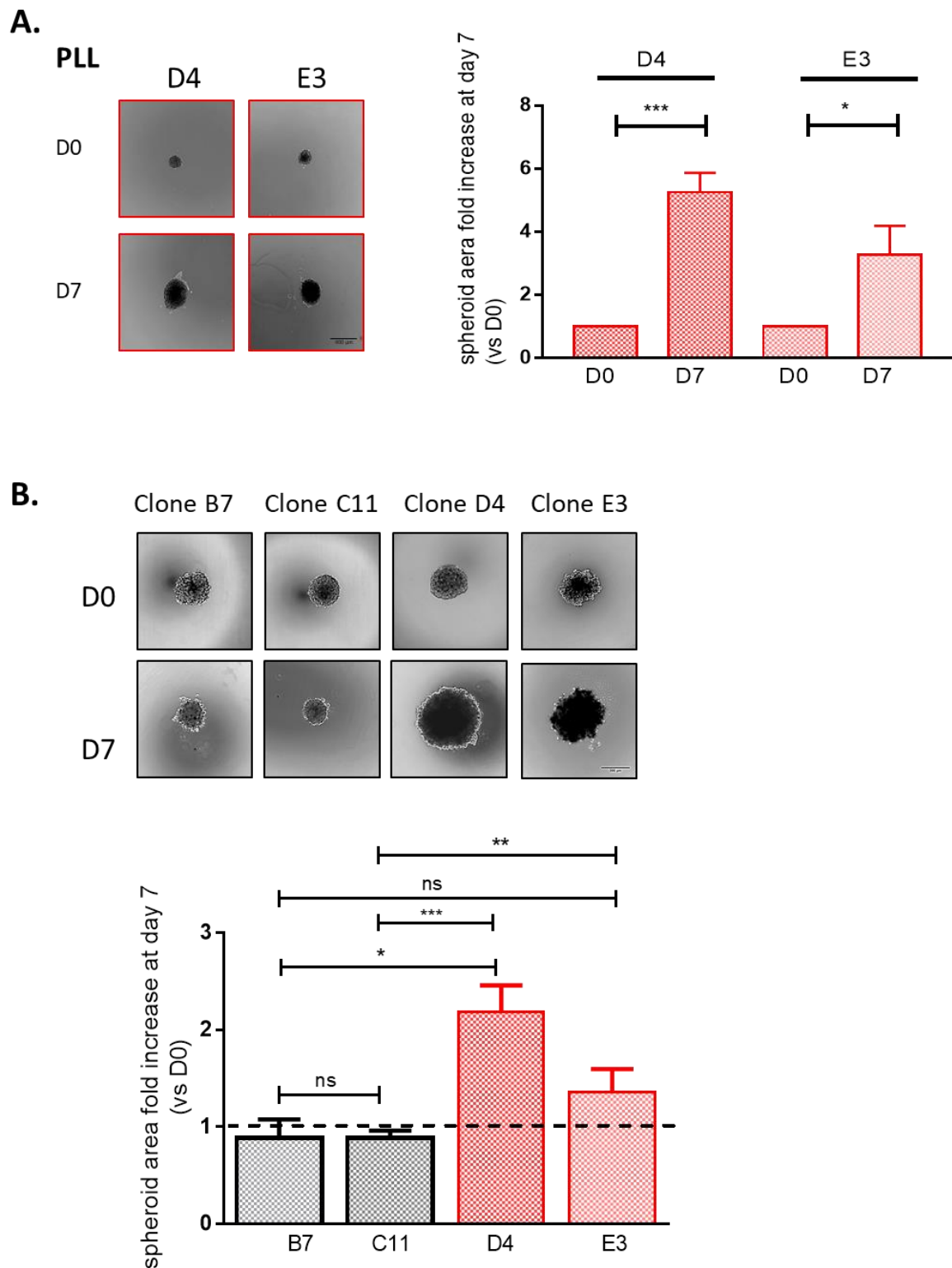


Figure 37 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est associée à un gain de prolifération en condition 3D. (A) Image par contraste de phase (x4) des sphéroïdes des clones $\alpha 5+$ (D4 et E3) 7 jours après leur dépôt (D7) sur un coating de polylysine (PLL, 15 μ g/mL) (n=4) Barre d'échelle de 400 μ m. **(B)** Image par contraste de phase (x10) des sphéroïdes des clones $\alpha 5-$ (B7 et C11) et des clones $\alpha 5+$ (D4 et E3) maintenus en suspension. Les histogrammes représentent la quantification de l'aire des sphéroïdes 7 jours après leur formation rapportée à leur aire initiale (n>3). Barre d'échelle de 200 μ m.

4. Évaluation de l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la survie cellulaire

Les travaux précédents du laboratoire ont mis en évidence le rôle de l'intégrine dans la résistance à l'apoptose. Nous avons analysé la capacité des différents clones à proliférer ou à survivre (en 2D) dans des conditions de culture dépourvue de sérum. Ce test a été réalisé avec un coating de polylysine (10 μ g/mL) ou de fibronectine (10 μ g/mL) afin d'évaluer l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans le phénotype observé (analyse par test MTT). Nos résultats montrent que dans un environnement neutre (sur polylysine), aucun clone ne survit dans ces conditions (**Figure 38.A**). En revanche, lorsque l'intégrine $\alpha 5$ est activée par la fibronectine, les clones D4 et E3 non seulement survivent mais prolifèrent (**Figure 38.B**).

Etant capables de survivre dans des conditions dépourvues de sérum, nous avons émis l'hypothèse que les clones exprimant l'intégrine pourraient également être plus résistants aux thérapies. Ainsi, nous avons évalué la prolifération/survie des différents clones (analyse par test MTT), traités par 50 μ M de TMZ sur un coating de fibronectine, en absence ou en présence de sérum. Les résultats préliminaires montrent que le TMZ (50 μ M) entraîne une diminution de la prolifération dans les 4 clones après 7 jours de traitement. Il semble que la sensibilité des clones C11 et B7 ne soit pas affectée par les conditions de culture. En revanche les clones D4 et E3 sont plus sensibles au TMZ lorsque le milieu contient du sérum (**Figure 38.C**).

Les travaux précédents du laboratoire ont montré que l'inhibition de l'intégrine combinée avec une chimiothérapie était efficace pour provoquer l'apoptose des cellules (580). Nous avons donc traité les clones D4 et E3 avec un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ (Fr248, 20 μ M), associé ou non au TMZ (50 μ M). Les résultats montrent que le traitement par l'antagoniste seul entraîne une diminution de la prolifération des clones $\alpha 5+$ de 40 à 50% (clones D4 et E3 respectivement). Ce résultat est en accord avec l'hypothèse d'un rôle de l'intégrine $\alpha 5$ dans la prolifération de ces cellules lorsqu'elles sont cultivées sans sérum et sur fibronectine (**Figure 38.B**). Nous constatons que le double traitement induit une diminution de la prolifération des clones D4 et E3 plus importante comparé aux deux monothérapies. D'autres expériences sont cependant nécessaires pour confirmer ces observations (**Figure 38.D**).

Pour résumer, l'activation de l'intégrine $\alpha 5$ par la fibronectine permet aux cellules de survivre et de proliférer dans des conditions de culture dépourvue de sérum. La sensibilité au TMZ des clones $\alpha 5+$ dépend des conditions de culture. Une association antagoniste d'intégrine/TMZ pourrait être plus efficace que les monothérapies.

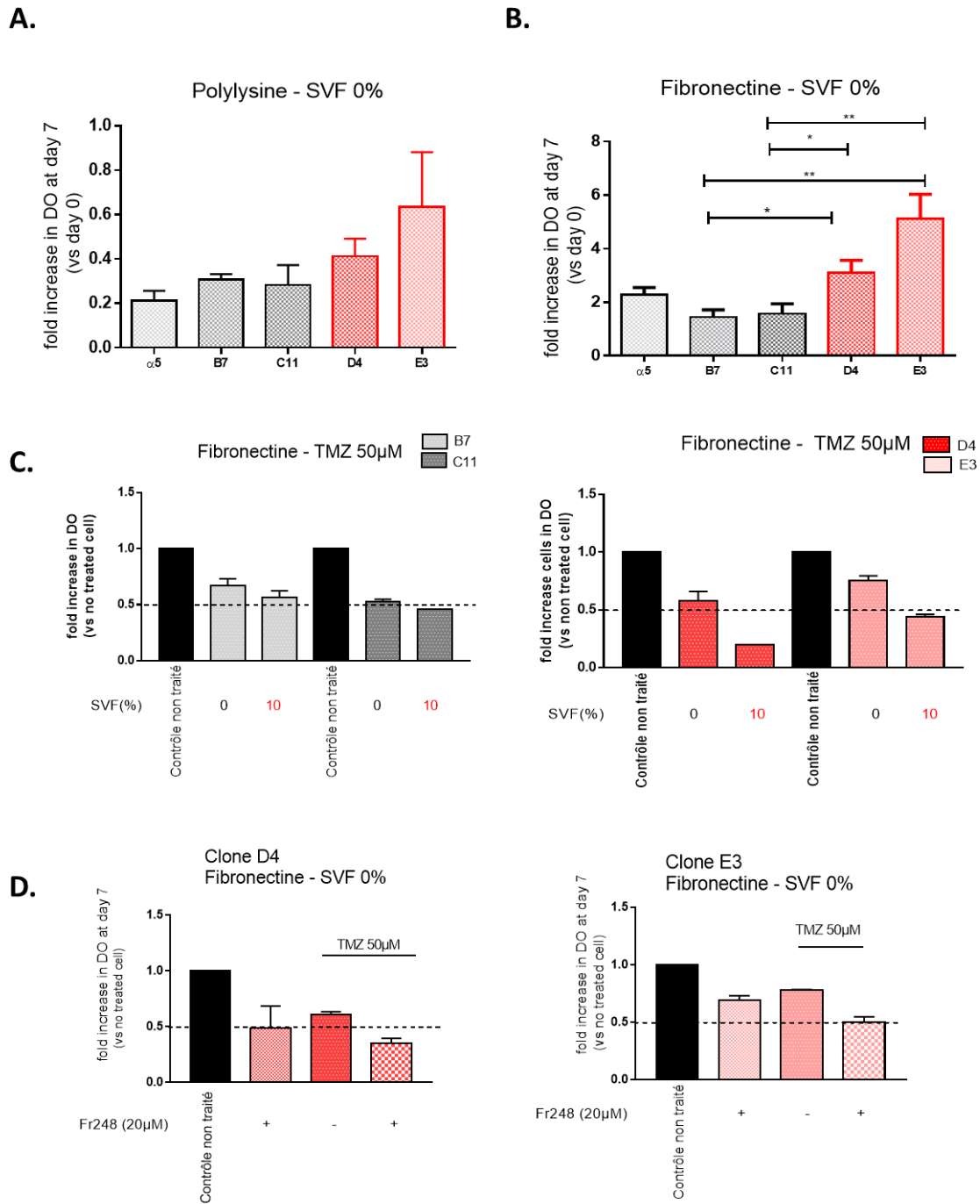


Figure 38 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est associée à un gain de survie en condition de culture dépourvue de sérum dans un environnement riche en fibronectine. Analyse du nombre de cellules vivantes par dosage de la succinate déshydrogénase (MTT) des clones $\alpha 5^-$ (B7 et C11) et des clones $\alpha 5^+$ (D4 et E3), en condition de survie sans sérum (SVF 0%) **(A)** sur un coating de polylysine (10µg/mL) (n=5) et **(B)** sur un coating de fibronectine (10µg/mL) (n=10). Les histogrammes **(A)** et **(B)** représentent l'augmentation de l'absorbance après 7 jours d'ensemencement rapporté à l'absorbance à l'ensemencement. **(C)** Traitement des clones B7, C11, D4 et E3 par du TMZ (50µM) à l'ensemencement des cellules en condition de survie normale (SVF 10%) et sans sérum (SVF 0%) (n=2). **(D)** Traitement des clones D4 et E3 ($\alpha 5^+$) par un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ (Fr248, 20µM) associé ou non au TMZ (50µM) (n=2). Les histogrammes **(C)** et **(D)** représentent l'augmentation de l'absorbance après 7 jours d'ensemencement par rapport à l'absorbance à l'ensemencement (d0) et normalisée par rapport aux cellules non traitées.

5. Évaluation de la plasticité des cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5$

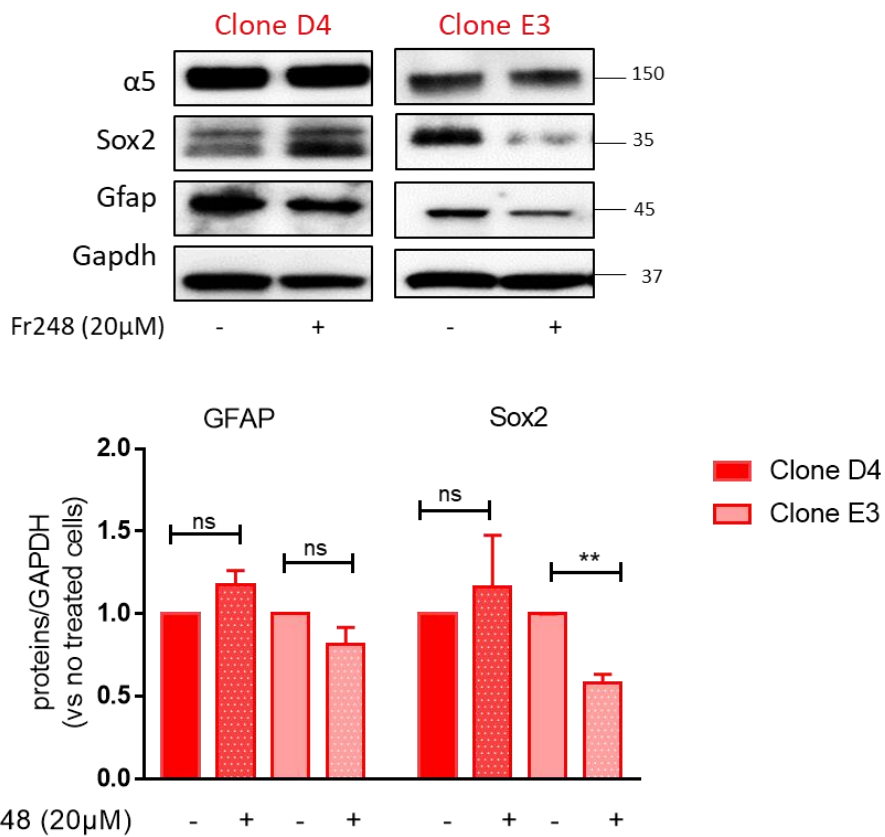
Quelques études ont mis en évidence une dédifférenciation des cellules de GBM induite par des thérapies. Ce processus contribue à l'agressivité tumorale (231,300,347). L'intégrine $\alpha 5$ n'étant exprimée qu'après différenciation, nous avons évalué si l'inhibition de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par un antagoniste spécifique entraînait une dédifférenciation des cellules. Nous avons analysé l'expression de la GFAP et de Sox2 dans les clones D4 et E3 ($\alpha 5+$) différenciés par 10% de sérum, traités par l'antagoniste spécifique de l'intégrine (Fr248, 20 μ M) pendant 7 jours. Nos résultats montrent que l'expression de la GFAP est similaire dans les clones D4 traités ou non par l'antagoniste. Des résultats similaires ont été obtenus avec le clone E3. En ce qui concerne le marqueur souche Sox2, son expression est stable dans le clone D4 traité et est diminuée dans le clone E3 traité, comparée aux conditions sans traitement. Ainsi, l'inhibition de l'intégrine $\alpha 5$ n'entraîne pas de dédifférenciation des clones l'exprimant (**Figure 39.A**).

Nos résultats précédents suggèrent que l'intégrine $\alpha 5$ est impliquée dans la prolifération des cellules lorsqu'elles sont cultivées sans sérum et sur fibronectine. Nous nous sommes demandé si l'absence de sérum pouvait induire une dédifférenciation, pouvant expliquer un gain de prolifération. La survie des cellules n'exprimant pas l'intégrine $\alpha 5$ étant faible en absence de sérum (**Figure 38.B**), nous avons évalué l'expression de la GFAP dans les différents clones cultivés pendant 7 jours dans du milieu contenant 2% de sérum, traités ou non par l'antagoniste de l'intégrine. Curieusement, les cellules $\alpha 5+$ des clones D4 et E3 perdent l'expression de la GFAP dans ces conditions de culture (comparaison **Figure 39.A et B**) suggérant un retour à l'état souche en absence ou en présence de l'antagoniste. Inversement, les cellules $\alpha 5-$ expriment toujours la GFAP et l'antagoniste de l'intégrine n'a aucun effet sur cette expression comme attendu (**Figure 39.B**).

Pour résumer, l'inhibition fonctionnelle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ n'entraîne pas une dédifférenciation des cellules, ce qui est important en terme de stratégie thérapeutique anti-intégrine. Nos résultats semblent également montrer que les cellules exprimant l'intégrine possèdent une plus grande capacité à passer d'un état différencié à un état souche comparées aux cellules ne l'exprimant pas.

A.

SVF 10%



SVF 2%

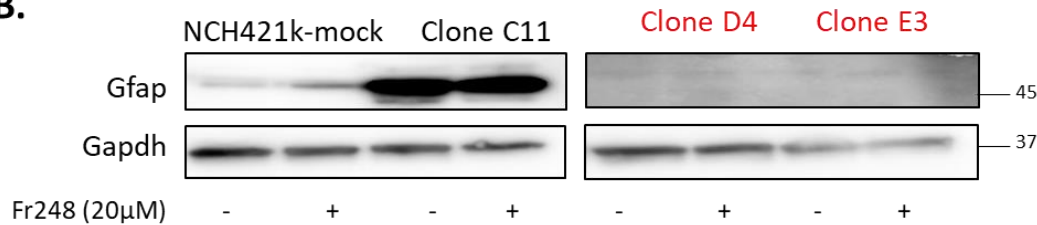
B.

Figure 39 - Les cellules exprimant l'intégrine α5 présentent une plus grande plasticité cellulaire. (A) Analyse par Western Blot de l'expression de l'intégrine α5, de la GFAP et de Sox2 dans les clones D4 et E3 (α5+) traités par un antagoniste de l'intégrine (Fr248, 20 μM) pendant 7 jours et cultivés dans un milieu supplémenté en sérum (SVF10%). L'histogramme représente la quantification de l'expression de la GFAP et de Sox2 rapportée sur l'expression de la GAPDH (n=3). **(B)** Analyse par Western Blot de l'expression de la GFAP dans la lignée NCH421k-mock (α5-) et dans les clones C11 (α5-), D4 (α5+) et E3 (α5+) traités ou non par un antagoniste de l'intégrine (Fr248, 20 μM) pendant 7 jours et cultivés dans un milieu contenant 2% de sérum (SVF 2%) (n=2).

Le **Tableau 6** recense les résultats de nos études *in vitro* qui suggèrent que l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation de cellules souches est impliquée dans l'agressivité tumorale en matière de :

Cellules $\alpha 5+$		Cellules $\alpha 5-$
Prolifération en condition adhérente (comptage au bleu trypan)		
Lignées 5706 et NCH644	comparées aux	lignées 3731 et NCH421k
Migration (chimiotactisme de la fibronectine dans la chambre de boyden)		
Lignée NCH644	comparée à la	lignée NCH421k
Evasion cellulaire dépendante de la fibronectine		
Lignées 5706 et NCH644	comparées aux	lignées 3731 et NCH421k
Clone Z (NCH644)	comparé au	clone E (NCH644)
Clones D4 et E3 (NCH421k)	comparés aux	clones C11 et B7 (NCH421k)
Dédifférenciation totale (auto-renouvellement)		
Lignée NCH644	comparée à la	lignée NCH421k
Expansion d'une masse tumorale (modèle 3D)		
Clones D4 et E3 (NCH421k)	comparés aux	clones C11 et B7 (NCH421k)
Survie en condition défavorable sur fibronectine		
Clones D4 et E3 (NCH421k)	comparés aux	clones C11 et B7 (NCH421k)
Sensibilité au TMZ dépendante aux conditionx de culture (SVF 10% et 0%)		
Clones D4 et E3 (NCH421k)	comparés aux	clones C11 et B7 (NCH421k)
Dédifférenciation dans un milieu de culture supplémenté par 2% de sérum		
Clones D4 et E3 (NCH421k)	comparés aux	clones C11 et B7 (NCH421k)

Tableau 6 - Récapitulatif des résultats phénotypiques selon l'expression de l'intégrine $\alpha 5$.

IV. Évaluation de l'impact des CSGs sur la prise de tumeurs *in vivo* selon leur expression de l'intégrine $\alpha 5$

Nous avons souhaité confirmer ces résultats *in vitro* dans un modèle d'étude *in vivo*.

Nous avons réalisé des xéno greffes orthotopiques des lignées NCH421k et NCH644 polyclonales dans des souris Nude en injectant de façon stéréotaxique (dans le striatum) deux concentrations de cellules souches (20 et 50 x 10⁴ cellules/2 μ L). Après coloration des coupes par hématoxyline/éosine, nous avons mis en évidence une tumorigénicité plus importante dans la lignée NCH644 par rapport à la lignée NCH421k (**Figure 40**).

Ces études nous ont permis de déterminer le nombre de cellules à injecter et la durée d'implantation (20 000 cellules/2 μ L pendant 4 semaines). En effet, à la suite de cette expérience préliminaire, nous avons réalisé une seconde série d'expérience où nous avons injecté les lignées polyclonales NCH644 et NCH421k, les clones $\alpha 5+$ (D4 de la lignée NCH421k et Z de la lignée NCH644) et les clones $\alpha 5-$ (C11 de la lignée NCH421k et E de la lignée NCH644), dans le striatum de la souris Nude, dont les résultats sont en cours d'exploitation.

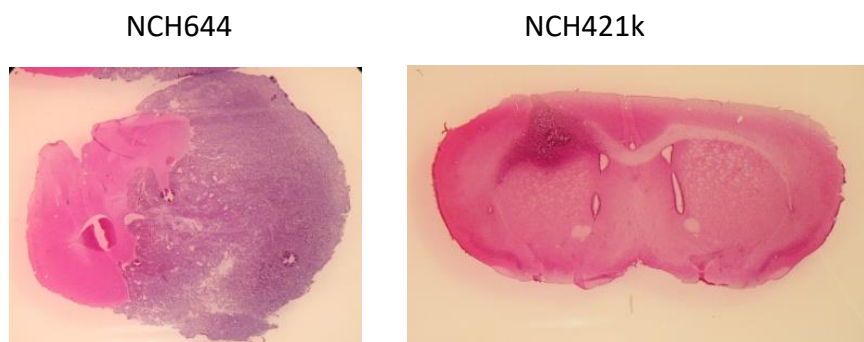


Figure 40 - L'injection de CSGs programmées à exprimer l'intégrine $\alpha 5$ forme des tumeurs volumineuses *in vivo*. Coupe de tumeurs formées 4 semaines après l'injection, dans le striatum de souris Nude, des lignées souches NCH644 ($\alpha 5+$) et NCH421k ($\alpha 5-$) (20 000 cellules/2 μ L). Coloration par un marquage Hématoxyline/éosine.

V. Discussion et perspectives

1. Expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ dans les cellules souches de GBM

L'implication des intégrines dans différentes caractéristiques de la cellule tumorale (prolifération, résistance à l'apoptose, migration pour envahir le tissu sain...) est largement démontrée dans des expérimentations précliniques. Plusieurs études ont déjà montré le rôle de certaines intégrines dans les cellules souches de GBM ($\alpha 6$, $\alpha 3$, $\alpha 7$ ou $\beta 8$...) (272,480,483,585) où celles-ci sont exprimées dans les cellules souches, sont impliquées dans l'auto-renouvellement et sont généralement régulées négativement lors de leur différenciation. Les sous-unités $\alpha 6$ et $\beta 8$ sont exprimées par les CSGs présentes dans la niche périvasculaire, tandis que les cellules exprimant les sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 7$ sont localisées dans des foyers tumoraux infiltrants.

Contrairement aux autres intégrines, l'intégrine $\alpha 5$ n'est pas exprimée dans les cellules souches mais plutôt après différenciation. En effet, nous avons mis en évidence dans une cohorte de 4 lignées de cellules souches de GBMs et dans une série de 23 clones issus de la lignée NCH644, que l'intégrine $\alpha 5$ n'est pas exprimée en condition souche. Son expression est induite après différenciation de manière hétérogène lorsque l'on compare des lignées polyclonales ou des clones issus d'une même lignée. Ces données ont été confirmées par une collaboration (collaboration Dr Lemarie, Toulouse) où sur 4 lignées de CSGs évaluées, 3 expriment l'intégrine uniquement après différenciation. L'exemple de la sous-population de la lignée 3731 (3731*) est surprenant puisque deux expériences de différenciation faites dans des conditions identiques à seulement une semaine d'intervalle donnent des résultats différents avec une expression ou non de l'intégrine. Ces résultats mettent en évidence une hétérogénéité inter- et intra-tumorale de l'expression protéique de l'intégrine $\alpha 5$.

Même si l'expression de l'intégrine est dépendante d'un état de différenciation, elle ne peut être considérée comme un marqueur universel de différenciation des GBMs. Son expression n'est pas reliée directement à une différenciation astrocytaire car il n'y a pas de relation directe entre l'intégrine $\alpha 5$ et la GFAP. De plus, nos résultats montrent également que son expression peut être maintenue lors d'une dédifférenciation (exemple de la lignée NCH644). Enfin, l'expression de l'intégrine n'induit pas la différenciation (exemple de la lignée NCH421k transfectée).

Toutes ces données montrent bien la complexité de la plasticité entre les cellules souches et les cellules différenciées pour l'expression d'une protéine donnée. L'étude de Guerrero et al., 2017 (480) a également fait ressortir la plasticité cellulaire des CSGs où une différenciation de court terme (2 passages) entraîne une diminution de l'expression de l'ARNm de l'intégrine $\beta 8$, tandis qu'une différenciation à plus long terme (passage 4 et 5) induit son augmentation.

2. Régulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$

Le problème de la régulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ se pose maintenant. Un premier élément de réponse concerne la relation entre le taux d'ARNm et l'expression protéique. Même si l'augmentation des ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ n'est pas dépendante de son expression après différenciation des lignées, le taux

basal semble différent (comparaison des lignées NCH421k et NCH644 et de la lignée NCH644 souche et dédifférenciée). Nos données semblent suggérer que les cellules souches de GBM ayant un taux d'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ élevé sont programmées à exprimer l'intégrine après différenciation. Cependant, à l'issue de la transfection du gène de l'intégrine $\alpha 5$ dans la lignée NCH421k, nous avons constaté que le taux d'ARNm du gène de l'intégrine $\alpha 5$ est augmenté en condition basale dans la lignée NCH421k transfectée et dans le clone B7, mais ne semble pas suffisant pour induire l'expression protéique de l'intégrine après différenciation. Cette observation semble contredire notre hypothèse. Néanmoins en ce qui concerne la lignée polyclonale, nous pouvons penser qu'elle contient un faible nombre de cellules présentant une très grande augmentation du taux de l'ARNm de l'intégrine, de manière similaire aux clones D4 et E3 issus de cette lignée. Cependant et en raison de la difficulté à transfecter la lignée souche NCH421k, l'ensemble des cellules n'a pas intégré le gène de l'intégrine, entraînant ainsi un taux moyen d'ARNm de l'intégrine augmenté et l'absence d'expression protéique après différenciation. En lien avec cette réflexion, bien que le taux d'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ soit augmenté dans le clone B7 en condition basale, celui-ci reste faible comparé aux clones $\alpha 5+$ D4 et E3 et est probablement insuffisant pour induire l'expression de l'intégrine après différenciation en condition clonale. Ces données soulignent la difficulté à analyser et comparer les caractéristiques moléculaires au sein de clones et de lignées polyclonales.

Des travaux en cours nous permettront de caractériser les réseaux de signalisation différenciellement exprimés entre les cellules souches capables ou non d'exprimer l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation. En effet, le transcriptome des lignées NCH421k et NCH644 sur puces Affymetrix, avant et après différenciation, a été effectué et est en cours d'analyse. Il serait nécessaire de confirmer le rôle des intervenants moléculaires, identifiés par l'étude transcriptomique, par si-RNA spécifiques dans les cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5$ et par transfection de plasmides codant pour les gènes adéquats dans les cellules ne l'exprimant pas. De plus, il serait également intéressant de caractériser, dans les deux modèles de la lignée 3731*, les facteurs de transcription et les voies de signalisation impliqués dans l'expression différentielle de l'intégrine $\alpha 5$; ceci afin de déterminer s'il est possible de différencier les CSGs programmées à exprimer l'intégrine.

3. Rôle de la programmation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'agressivité tumorale

Nous avons évalué l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans l'agressivité des CSGs avant et après différenciation à partir de différents modèles (**Tableau 6**).

a) Implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la prolifération

Les résultats concernant la prolifération semblent être dépendants des modèles d'étude.

Nous avons observé un gain de prolifération dans les cellules $\alpha 5+$ en condition polyclonale (entre différentes lignées) mais pas en condition clonale (lignée NCH644). En effet, nous avons observé une capacité de prolifération des clones NCH644 diminuée par rapport à la lignée polyclonale, suggérant une coopérativité inter-clonale. L'étude de Inda et al., 2010 (586) a également mis en évidence une coopération entre différents clones différenciés dans le GBM. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les différents clones de la lignée NCH644 contribuent à l'agressivité de la lignée polyclonale. Il serait intéressant de confirmer cette idée.

Pour cela, nous pourrions évaluer la prolifération du clone NCH644-Z ($\alpha 5+$) ensemencé dans du milieu de culture du clone NCH644-E ($\alpha 5-$), et inversement. Une autre possibilité serait d'ensemencer les deux clones simultanément, à des proportions différentes, et d'analyser à l'aide de nanoparticules fluorescentes leur capacité de prolifération respective. Une coopération entre cellules souches et cellules différenciées a également été démontrée. Il a en effet été mis en évidence récemment que l'injection simultanée de cellules différenciées et souches de GBM entraîne une tumeur plus volumineuse que l'injection de cellules souches seules (587). Ainsi, il aurait été intéressant d'évaluer l'interaction entre les deux populations cellulaires, afin de mimer au mieux la réalité clinique. Effectivement, la masse tumorale des GBM étant composée de 0,5 à 5% de CSGs, nous pourrions imaginer d'évaluer les différents phénotypes (prolifération, survie cellulaire, évansion cellulaire) avec un mélange des deux populations cellulaires dans différentes proportions.

En ce qui concerne l'expression forcée de l'intégrine (lignée NCH421k), elle ne semble pas modifier la capacité de prolifération des clones l'exprimant en condition 2D. Néanmoins, à partir de sphères tumorales, les clones $\alpha 5+$ présentent une prolifération plus importante que les clones $\alpha 5-$. Ces résultats suggèrent l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la croissance au sein d'une masse tumorale.

Les différents résultats concernant l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la prolifération mettent en évidence la complexité de l'étude d'une cible dans un seul modèle cellulaire et l'intérêt d'étudier une protéine donnée en corrélation avec l'hétérogénéité tumorale. L'étude des deux modèles cellulaires issus de la lignée 3731* permettrait de comprendre davantage l'implication de l'intégrine dans la prolifération. En effet, nous avons évalué son rôle à partir de différentes lignées (dont les résultats peuvent être influencés par les caractéristiques intrinsèques aux lignées) et à partir de clones, issus de la lignée NCH421k principalement (dont l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ a été forcée). Les deux modèles issus de la lignée 3731* permettraient d'étudier les phénotypes observés en condition polyclonale, issus d'une même lignée de CSG et dont l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est naturelle.

b) Implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la migration/évansion

Au contraire de la prolifération, tous nos modèles démontrent le rôle de l'intégrine $\alpha 5$ dans l'évansion des cellules $\alpha 5+$ à partir d'un sphéroïde dans un microenvironnement de fibronectine. Nos résultats sont en accord avec nos travaux précédents où nous avons mis en évidence qu'en absence de fibronectine, les sphéroïdes formés par des cellules de GBMs exprimant l'intégrine (U87MG) restent cohésives. En revanche, leur dissémination est possible dans un microenvironnement riche en fibronectine (579).

L'évaluation de la migration de nos différentes lignées et clones en présence d'une gamme de concentration de fibronectine permettrait de confirmer l'implication de l'interaction de l'intégrine $\alpha 5$ et de son substrat dans l'agressivité tumorale. En effet, nos expériences d'évansion cellulaire se sont basées sur une concentration de fibronectine de 15 μ g/mL. Dans ces conditions, nous n'avons pas montré que les cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5$ migrent plus loin que les cellules $\alpha 5-$. Il est possible que dans ces conditions les cellules restent cohésives. Cependant, dans un microenvironnement plus riche en fibronectine, la distance de migration (à partir du sphéroïde) des cellules $\alpha 5+$ pourrait être augmentée. Dans cette même idée, il serait intéressant de mélanger les clones $\alpha 5+/-$ (préalablement marqués) lors de la formation du sphéroïde et

d'évaluer la distance de migration des cellules selon la concentration de fibronectine et selon l'expression de l'intégrine $\alpha 5$.

c) Implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la survie et la résistance à l'apoptose

Nous avons montré l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la prolifération des cellules lorsqu'elles sont cultivées sans sérum et sur fibronectine. De manière étonnante, nous avons également constaté que la sensibilité au TMZ des clones $\alpha 5+$ est dépendante du milieu de culture. Cultivés sans sérum, les clones $\alpha 5+$ semblent moins sensibles au TMZ. Cette sensibilité plus faible pourrait être expliquée par un retour à un phénotype souche. En effet, nos données suggèrent que les cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5$ présentent une plus forte plasticité cellulaire. Cette supposition est en accord avec nos résultats concernant la dédifférenciation de la lignée NCH644. En effet, nous avons mis en évidence un retour à un phénotype souche « total » de la lignée NCH644 ($\alpha 5+$) dédifférenciée, caractérisé par une capacité d'auto-renouvellement similaire à la lignée NCH644 souche. Au contraire, la lignée NCH421k ($\alpha 5-$) dédifférenciée semble présenter un auto-renouvellement plus limité comparée à la même lignée souche. Il serait important d'évaluer la résistance des cellules $\alpha 5+$ et $\alpha 5-$ au TMZ en condition souche. Les cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5$ ayant une plasticité plus importante, nous pouvons supposer qu'elles peuvent être responsables de la formation de récidives.

Ainsi, nos différents résultats semblent indiquer que l'intégrine $\alpha 5$ modifie le comportement de cellules différenciées à partir de CSGs et qu'elle est impliquée dans l'agressivité tumorale. L'association de l'intégrine $\alpha 5$ avec l'agressivité tumorale est en accord avec la classification de Verhaak (2010), où l'expression du gène de l'intégrine est associée au sous-type le plus agressif. En effet l'analyse du TCGA a montré que le taux d'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ est augmenté dans le sous-type mésenchymal (**Figure 41**). Ces données confirment également nos travaux précédents où nous avons mis en évidence une corrélation entre un taux d'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ avec une faible survie de patients (452).

d) Implication du microenvironnement dans l'agressivité des cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5$

Nos travaux suggèrent que la fibronectine a un rôle important dans l'agressivité des cellules $\alpha 5+$. L'analyse de la banque de données IVY montrent que la fibronectine est principalement localisée dans des zones nécrotiques et hypoxiques. De manière intéressante, l'étude de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ (ARNm) en fonction de la localisation de la biopsie de tumeurs de patients (182) montre également que son expression est élevée dans les zones péri-vasculaires et nécrotiques (collaboration Pr Mosser, Rennes) des niches potentielles de certaines CSGs (**Figure 42.A**). Ces résultats sont en accord avec ceux de la banque

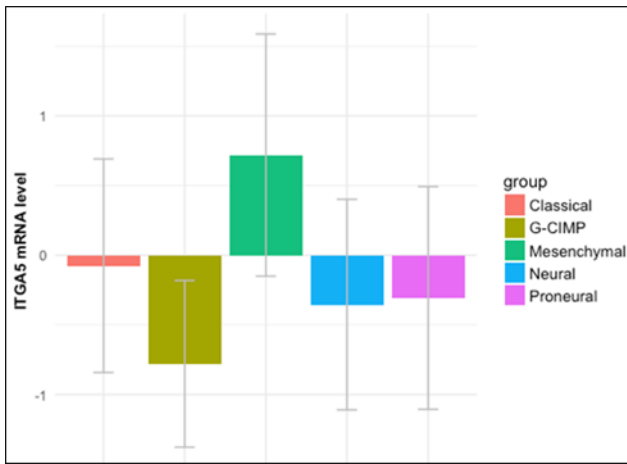


Figure 41 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est augmentée dans les GBMs de sous-types mésenchymaux. Analyse du taux de l'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ selon la banque de données du TCGA (collaboration Pr Elati, Lille).

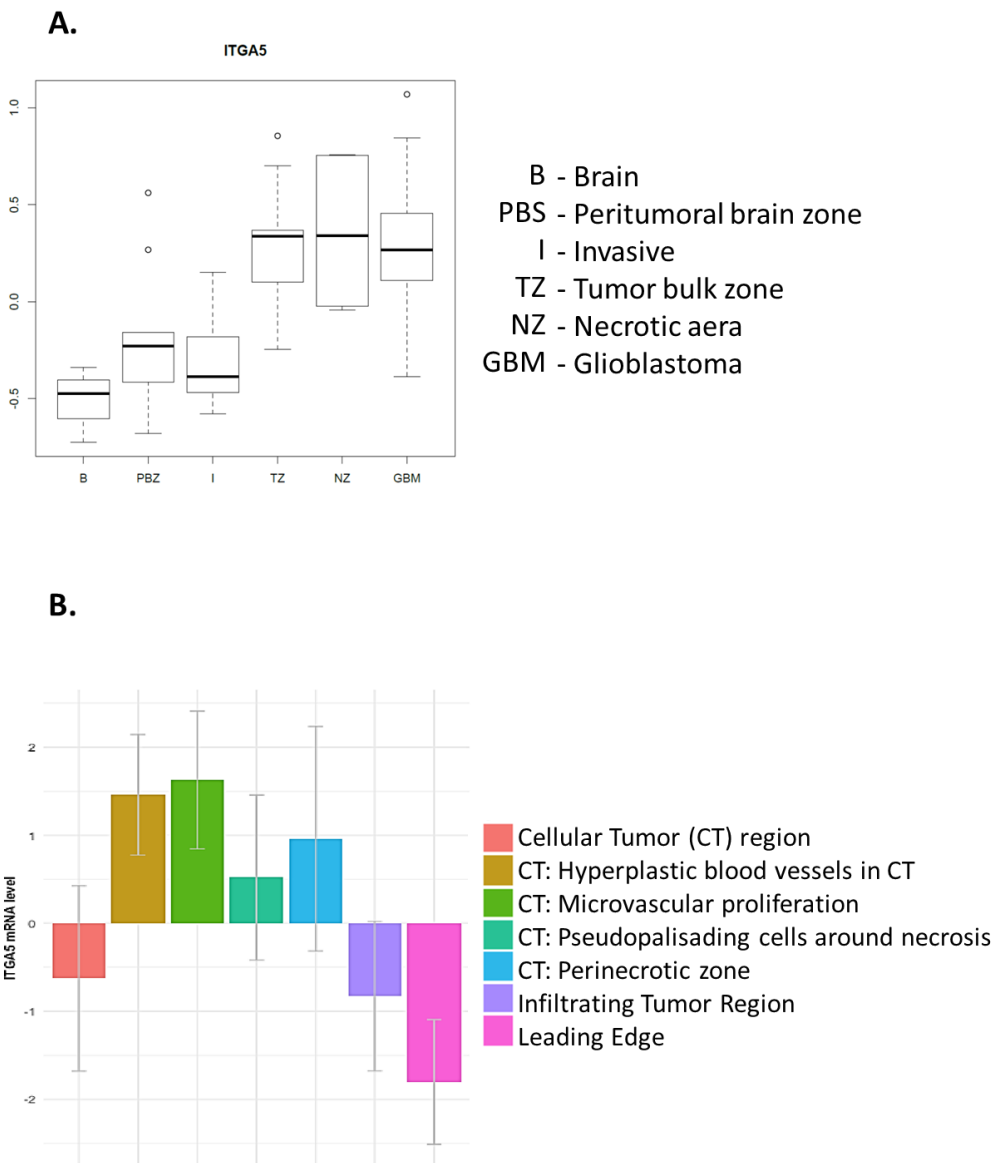


Figure 42 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est hétérogène au sein du GBM et est augmentée dans la masse tumorale et dans les foyers nécrosés. Analyse du taux de l'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ (A) d'après les données de l'étude Aubry et al., 2015 (182) (collaboration Pr Mosser, Rennes) et (B) d'après la banque de données IVY (collaboration Pr Elati, Lille).

de données IVY (collaboration Pr Elati, Lille) (**Figure 42.B**). Ces résultats mettent en évidence l'importance de l'interaction entre les cellules $\alpha 5$ et la fibronectine. Ces données soulèvent la question de savoir si les cellules souches de GBM programmées à exprimer l'intégrine $\alpha 5$ résident dans des niches composées de fibronectine, ou si un microenvironnement riche en fibronectine influence les CSGs à former une masse exprimant l'intégrine. De plus, il est intéressant de noter que les données de la littérature indiquent que le taux d'ARNm de la fibronectine est également surexprimé dans le GBM de sous-type mésenchymal (588) et que les foyers nécrotiques et hypoxiques sont composés de cellules mésenchymales (589–592).

Ainsi, l'hétérogénéité ne semble pas être une conséquence d'altérations génétiques survenant de manière aléatoire, mais est dépendante de l'interaction entre les cellules tumorales et le microenvironnement. Les intégrines ayant un rôle essentiel dans ces interactions via la matrice extracellulaire, nous pouvons nous demander quel rôle a l'intégrine $\alpha 5$ dans l'adaptation des cellules tumorales à un microenvironnement nécrosé et potentiellement hypoxique.

Nos résultats suggèrent que les cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5$ peuvent s'adapter à des conditions hypoxiques. En effet, nous avons mis en évidence un gain de prolifération des clones de la lignée NCH421k exprimant l'intégrine $\alpha 5$ par rapport aux clones ne l'exprimant pas, uniquement lorsqu'ils se présentent au sein d'une masse tumorale. Des observations similaires ont été constatées dans le cancer du sein, où un gain de migration des cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5$ dans un modèle 3D a été mis en évidence mais pas dans un modèle 2D (388). Une étude récente a montré que le cœur de sphéroïde est hypoxique, et que ce modèle d'étude (3D) permet d'identifier les cellules capables de proliférer dans des régions périnécrotiques ou hypoxiques (593). Il serait intéressant de confirmer l'hypoxie dans les sphéroïdes à l'aide d'un immunomarquage au moyen des marqueurs HIF1 ou HIF2 et d'évaluer la prolifération ou l'apoptose des cellules $\alpha 5+$ / $\alpha 5-$ au sein d'un sphéroïde. Nous pourrions également former des sphéroïdes composés d'un mélange de cellules $\alpha 5+$ / $\alpha 5-$ et analyser leur localisation respective au sein de la masse tumorale. Enfin, nous disposerons prochainement d'un incubateur 3 gaz, permettant de créer une atmosphère hypoxique. Nous étudierons l'expression de l'intégrine et les conséquences phénotypiques des cellules soumises à un environnement hypoxique.

Pour résumer, l'ensemble des données de la littérature révèle que les cellules de sous-type mésenchymal et qui expriment l'intégrine sont localisées dans des foyers hypoxiques et nécrotiques, riches en fibronectine. Nos travaux renforcent cette idée et démontrent que dans ces conditions les cellules différenciées $\alpha 5+$ peuvent croître, former une masse tumorale et migrer.

e) L'intégrine $\alpha 5$ comme cible thérapeutique

Le Cilengitide, un antagoniste de l'intégrine $\alpha v\beta 3$, a été le premier antagoniste d'intégrine à entrer en essais cliniques en cancérologie. Malheureusement, les résultats décevants des deux derniers essais cliniques de phase 2 et 3 dans le glioblastome ont interpellé la communauté scientifique du monde des intégrines. L'étude clinique du Cilengitide chez les patients atteints de GBM a depuis été arrêtée. Pourtant, il a été montré rétrospectivement qu'une expression élevée des intégrines $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ dans les cellules tumorales est prédictive (en termes de survie globale et de survie sans progression) de l'efficacité du Cilengitide.

De manière intéressante, ce bénéfice clinique a été observé uniquement dans l'étude CORE, où les patients sélectionnés ne présentaient pas de méthylation du promoteur du gène de la MGMT (594). Cette étude démontre que l'échec du Cilengitide n'est pas dû à la cible, l'intégrine $\alpha\beta3$. En revanche, elle remet en cause le biomarqueur de sélection des patients (statut de la MGMT). Ainsi, les intégrines n'ont pas encore dévoilé toutes leurs potentialités en tant que cibles thérapeutiques.

En effet, une étude récente a mis en évidence l'efficacité du Cilengitide dans une sous-population cellulaire exprimant l'intégrine $\alpha\beta3$ et le transporteur du glucose 3 (Glut3). De manière étonnante, cette surexpression simultanée ne suffit pas à prédire son efficacité. Seules les cellules addictives au glucose sont sensibles à l'inhibiteur de l'intégrine $\alpha\beta3$. Testée *in vivo* à l'aide de xénogreffes de patients, cette stratification a confirmé l'efficacité du Cilengitide dans cette sous-population. Ainsi, il paraît évident que des connaissances de plus en plus précises sont nécessaires non seulement pour connaître au mieux la cible thérapeutique potentielle, mais aussi pour connaître les biomarqueurs de sélection permettant une stratification des patients dans les essais cliniques. De manière similaire, nos travaux précédents ont fait ressortir une protéine p53 sauvage comme un biomarqueur prédictif de l'efficacité d'une stratégie anti-intégrine $\alpha5$.

Nos travaux s'intègrent parfaitement dans une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'expression de l'intégrine et dans la recherche de biomarqueurs pronostiques. Ainsi, nous apportons une analyse plus approfondie de la biologie de l'intégrine $\alpha5\beta1$ dans des modèles plus pertinents que sont les cellules souches de GBM. En effet, l'étude de Cosset et al., 2017 (549) a montré que la coexpression de l'intégrine $\alpha\beta3$ et du Glut3 est présente dans toutes les lignées établies mais uniquement dans 1/3 des CSGs. Cette constatation confirme l'intérêt de l'étude des CSGs afin de refléter l'hétérogénéité tumorale.

Ainsi, nos résultats ont confirmé notre hypothèse suggérant l'implication des CSGs dans l'expression hétérogène de l'intégrine $\alpha5\beta1$ dans la masse tumorale, mais également son implication dans l'agressivité tumorale (dans des foyers tumoraux précis). La compréhension de la relation entre la programmation de l'intégrine $\alpha5$ dans les CSGs et son expression après leur différenciation orientera la proposition de biomarqueurs susceptibles de guider la stratification de patients. Ceux-ci permettront également de proposer des cibles thérapeutiques pertinentes pour empêcher la formation d'un GBM plus agressif, car exprimant l'intégrine $\alpha5$.

La **Figure 43** schématise l'ensemble des résultats obtenus.

Ces résultats font l'objet d'une publication en cours de rédaction.

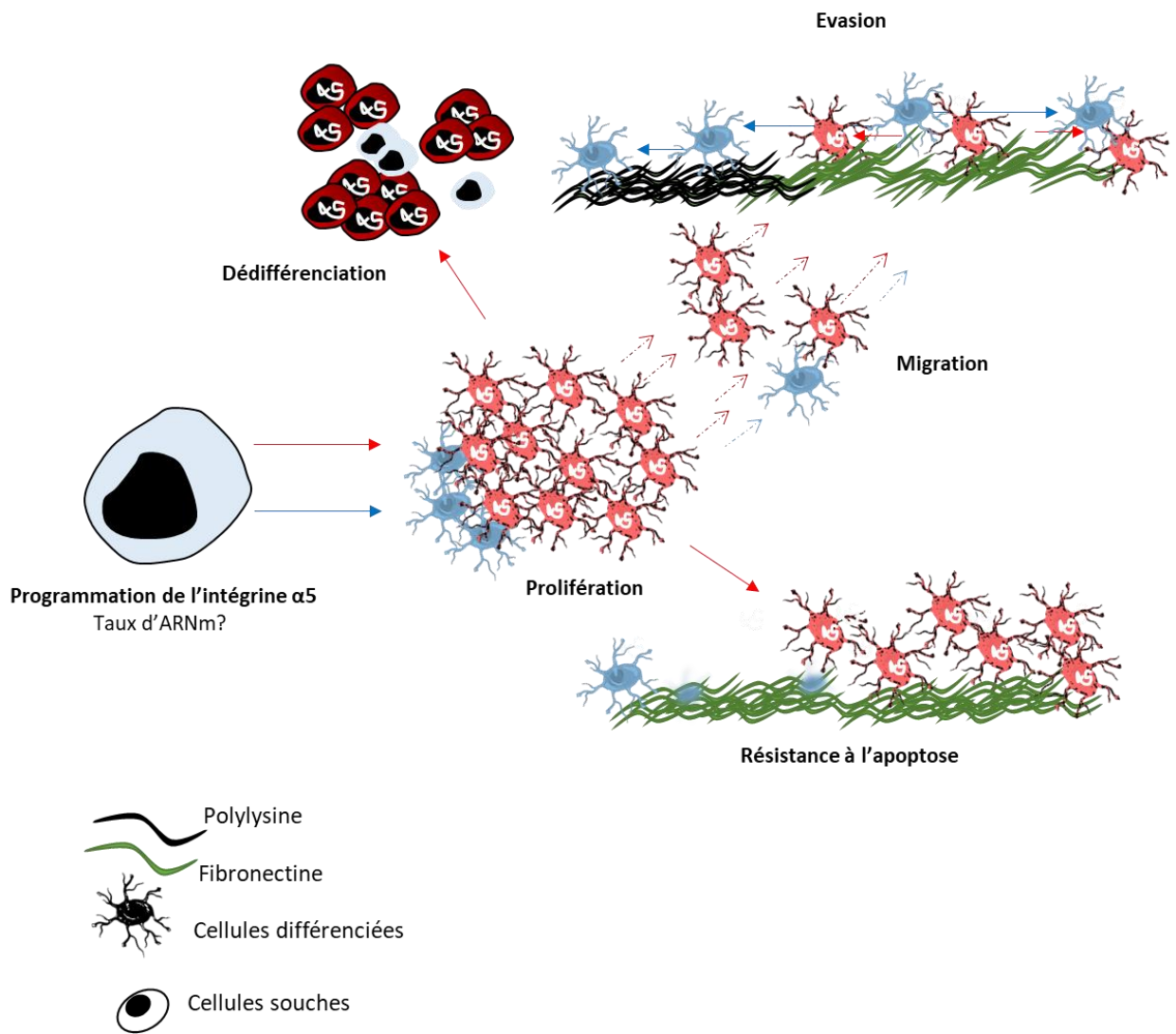


Figure 43 - Schéma bilan. La programmation de l'intégrine $\alpha 5$ dans certaines cellules souches induit la formation de cellules différenciées ayant une capacité de prolifération et de migration augmentée, une évaison cellulaire dépendante à la fibronectine et une résistance apoptose dans un environnement riche en fibronectine. La dédifférenciation de cellules exprimant intégrine $\alpha 5$ entraîne la formation de cellules souches exprimant l'intégrine $\alpha 5$.

Résultats Partie 2 :

Impact de l'intégrine $\alpha 5$ dans les carcinomes du col utérin. Exemple des cellules HeLa.

I. Introduction

Au début de ce projet de thèse, je disposais de la lignée NCH421k mock et transfectée par le gène de l'intégrine $\alpha 5$ en condition souche (réalisée au sein du laboratoire). Mon objectif était d'analyser les caractéristiques moléculaires et phénotypiques de la lignée NCH421k et de la lignée transfectée. Cependant, plusieurs résultats étonnants ont suggéré que la lignée transfectée n'était peut-être pas issue de la lignée NCH421k. Nous avons fait authentifier ces lignées (Multiplexion, Allemagne) et les résultats ont montré qu'il s'agissait d'une contamination, dont l'origine reste inconnue, par des cellules HeLa.

Nous avons décidé d'analyser les résultats que nous avons obtenus et de les compléter dans ce nouveau contexte de cellules HeLa issues de cancer du col de l'utérus métastatique. Quelques études ont montré que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est surexprimée dans les cancers du col de l'utérus. Une forte expression est associée à la formation de métastases de ganglions lymphatiques, de récurrences et à une résistance aux thérapies (493,595).

Le cancer du col de l'utérus est l'une des tumeurs les plus fréquentes chez la femme (596). La survie à 5 ans des patientes atteintes par un cancer utérin localisé est de 91,5%. Elle tombe à 16,5% en cas de métastases (597). Les cellules du cancer du col de l'utérus peuvent se propager par voie lymphatique, envahissant les ganglions lymphatiques pelviens ou para aortiques et par voie sanguine, entraînant la formation de métastases pulmonaires, hépatiques, osseuses ou cérébrales (598). Les métastases cérébrales sont rares, représentant 0,4 à 2,3% des métastases issues de cancer du col de l'utérus. La survie médiane des patientes atteintes de métastases est de 8 à 13 mois, et de 2,3 mois lorsqu'elles sont localisées au niveau cérébral (597,598). Bien qu'il n'y ait pas de protocole standard, le traitement de métastases cérébrales repose sur une radiothérapie totale du cerveau associée ou non à la chimiothérapie. Le Cisplatine et le Topotécane sont les principales molécules utilisées (597).

Afin de déterminer l'implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'agressivité des tumeurs du col de l'utérus, nous avons:

- 1) Déterminé les caractéristiques moléculaires des cellules HeLa selon leur condition de culture
- 2) Evalué leur prolifération et leur survie
- 3) Evalué leur capacité à envahir et à migrer
- 4) Etudié l'impact d'un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ dans la prise de tumeur métastatique cérébrale.

II. Caractérisation moléculaire des cellules HeLa

1. Analyse morphologique des cellules HeLa selon la condition de culture

En 2012, Chen et al., 2012 ont analysé différentes méthodes permettant d'enrichir les cellules souches tumorales à partir d'une lignée tumorale établie de carcinomes de la langue et de carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale. L'étude a montré que les conditions de culture dépourvues de sérum et enrichies en facteurs de croissance permettent d'isoler un nombre important de cellules souches (599). Quelques études ont montré l'enrichissement de cellules souches tumorales au sein de la lignée HeLa dans un milieu dépourvu de sérum (600,601).

Nous avons travaillé avec les cellules HeLa en deux conditions de culture : dans un milieu de culture normal (présence de sérum 10%) et dans un milieu permettant l'enrichissement de cellules souches tumorales (absence de sérum et présence de facteur de croissance). Nous avons constaté que les cellules HeLa cultivées en condition standard prolifèrent de manière adhérente sous forme épithéliale. Au contraire, les cellules cultivées dans un milieu de culture dépourvu de sérum prolifèrent de manière semi adhérente. En effet, comme nous pouvons le voir sur la **Figure 44.A**, les cellules forment un tapis cellulaire adhérent de cellules rondes (photo du bas) et des agrégats en suspension (photo du haut). Cette morphologie pourrait refléter un phénotype peu différencié. L'immunomarquage de l'actine montre une organisation du cytosquelette différente selon les conditions de culture. Les cellules HeLa cultivées dans un milieu de culture supplémenté par du sérum sont bien étalées et présentent des prolongements cellulaires de type filopodes, démontrant l'adhérence des cellules. Au contraire, les cellules cultivées dans des conditions dépourvues de sérum présentent un cytosquelette d'actine cortical et des cellules non étalées sans filopodes (**Figure 44.B**).

Ces données suggèrent que nous avons enrichi une population de cellules souches tumorales dans la lignée HeLa.

2. Caractéristiques moléculaires des cellules HeLa selon la condition de culture

Afin de confirmer le statut souche des cellules HeLa cultivées dans un milieu permettant leur enrichissement, nous avons évalué le taux d'ARNm de différents marqueurs souches. Les données de la littérature montrent que l'intégrine $\alpha 6$ et que les protéines oct4, sox2, CD44, CD133 ou ABCG2 sont les principaux marqueurs utilisés pour valider le statut souche de cellules du cancer du col de l'utérus (599–603). Nous avons évalué le taux d'ARNm des marqueurs souches Sox2, CD44 et de la sous-unité $\alpha 6$. De plus, selon l'étude de Huang et Rofstad., 2017 (603), les cellules souches tumorales de tumeur utérine sont impliquées dans la formation de métastases. C'est pourquoi, nous avons également analysé l'ARNm de Notch, une protéine impliquée dans le processus métastatique (599,604) (**Figure 44.C**).

Nos résultats montrent une augmentation du nombre de transcrits des gènes des marqueurs souches ($\alpha 6$, CD44 et Sox2) dans les cellules HeLa semi-adhérentes comparé aux cellules adhérentes. Nous avons également mis en évidence une augmentation du taux d'ARNm du gène Notch.

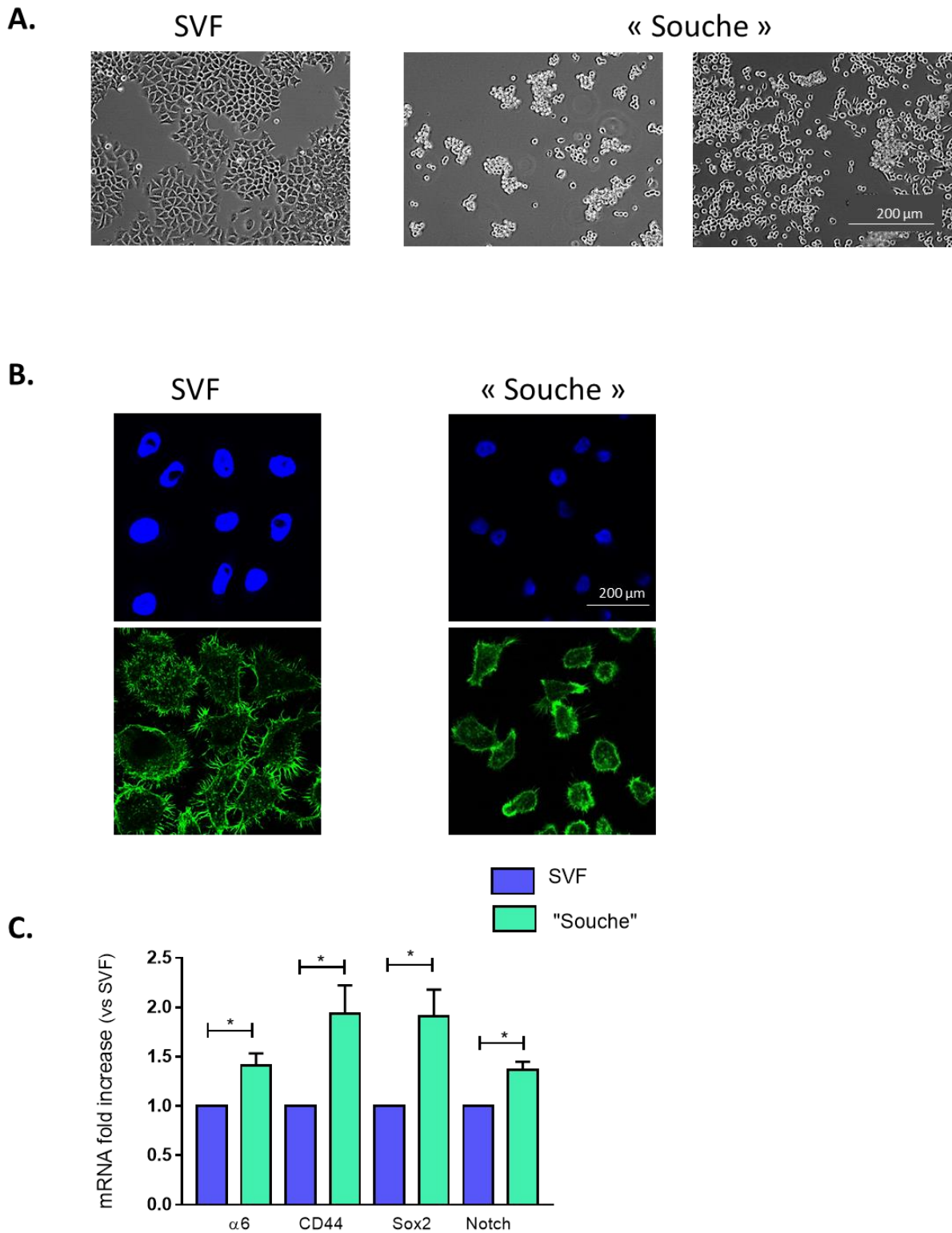


Figure 44 - Les cellules souches tumorales sont enrichies après la culture des cellules HeLa dans du milieu dépourvu de sérum. (A) Image par contraste de phase des cellules HeLa cultivées dans un milieu avec (SVF) et sans sérum (« souche »). **(B)** Immunomarquage de l'actine des cellules HeLa cultivées dans un milieu avec (SVF) et sans sérum (« souche ») déposées sur polylysine (15µg/mL) pendant 48 heures. Barre d'échelle de 200 µm. **(C)** Rapport du nombre de transcrits des gènes de marqueurs souches ($\alpha 6$, CD44, sox2) et du gène Noch impliqué dans les métastases, dans les cellules HeLa cultivées dans des conditions sans sérum (« souche ») comparé à des conditions de culture avec sérum (SVF) (n>3).

3. Expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules HeLa selon la condition de culture

Selon les conditions de culture, nous avons constaté une augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ lorsque les cellules HeLa sont cultivées dans le milieu dépourvu de sérum. Ces résultats ont été observés en analysant l'expression protéique par Western Blot et par microscopie confocale (**Figure 45.A**). Nous avons également mis en évidence une augmentation du taux de l'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$, sans augmentation de l'intégrine $\beta 1$, dans les cellules HeLa cultivées dans le milieu sans sérum (**Figure 45.B**).

Ces données suggèrent que l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ augmente dans une population enrichie en cellules souches au contraire de ce que nous avons observé dans les GBMs. Elles sont en accord avec l'étude de López et al., 2012 (600) qui a montré que l'ARNm du gène de l'intégrine $\alpha 5$ est également augmenté dans les conditions souches comparé aux cellules HeLa cultivées dans un milieu standard.

Pour résumer, nous avons obtenu une population enrichie en cellules souches tumorales issues de la lignée HeLa. Nous avons également constaté que l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est augmentée dans les cellules souches tumorales par rapport aux cellules plus différenciées.

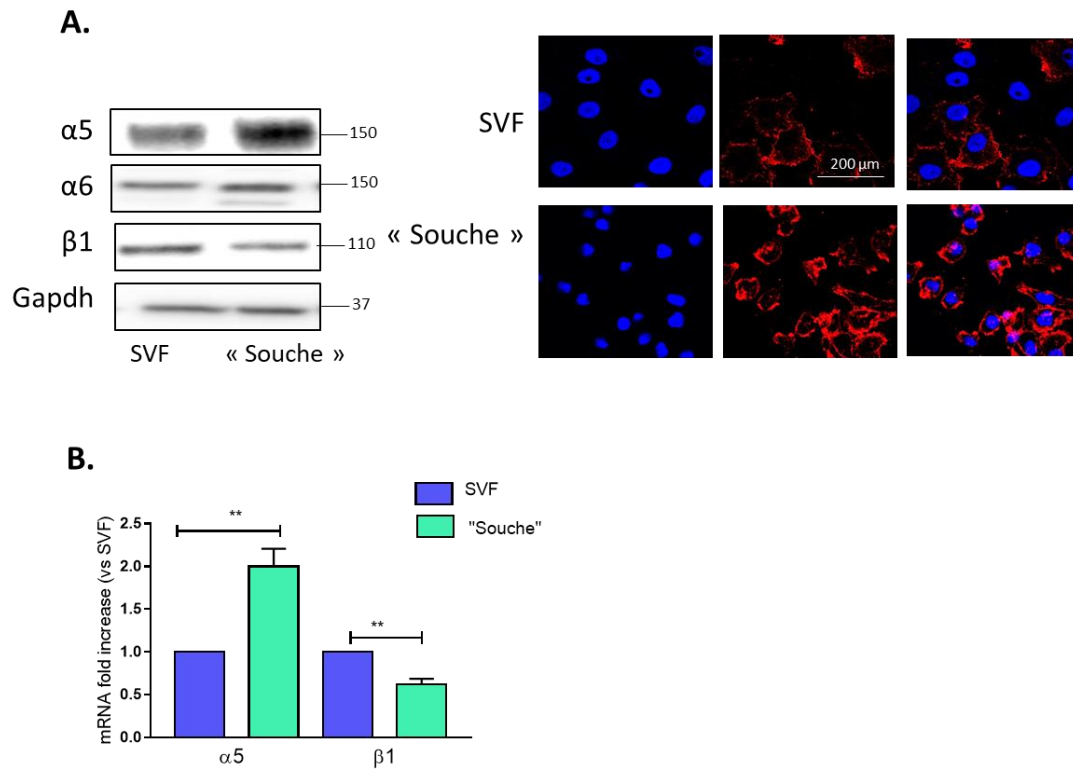


Figure 45 - L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est augmentée dans les cellules HeLa cultivées dans un milieu dépourvu de sérum. (A) Analyse de l'expression protéique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par Western Blot et par imagerie confocale, dans les cellules HeLa cultivées dans un milieu de culture sans (« souche ») et avec sérum (SVF). Barre d'échelle de 200 μm . **(B)** Analyse du taux d'ARNm du gène des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ selon les mêmes conditions de culture ($n > 3$).

III. Caractéristiques phénotypiques des cellules HeLa en condition souche et en condition différenciée

1. Prolifération

Nous avons analysé la prolifération des cellules HeLa afin de déterminer leur capacité à former une masse tumorale. Nous avons évalué le taux de prolifération à 7 jours par comptage au bleu trypan des cellules HeLa dans les deux conditions de culture, sur un coating de fibronectine (10µg/mL) et sur plastique. Nos résultats montrent que les cellules HeLa « souches » et différenciées ont une capacité de prolifération similaire avec ou sans coating de fibronectine (**Figure 46.A**)

L'implication de l'intégrine $\alpha 5$ a été évaluée en traitant les cellules par un antagoniste spécifique (Fr248 à 20µM) lors de leur ensemencement. Nos résultats montrent que l'antagoniste n'a pas d'effet sur la prolifération lorsque les cellules sont ensemencées sur plastique. En revanche sur un coating de fibronectine (10µg/mL), la prolifération des cellules HeLa « souches » et différenciées est diminuée de 30% (**Figure 46.B**). Ces données démontrent l'implication de l'activation de l'intégrine $\alpha 5$ dans la prolifération des cellules HeLa quel que soit leur statut de différenciation.

Nos différentes conditions de culture peuvent influencer les résultats obtenus. En effet, la culture des cellules HeLa « souches » est effectuée sans sérum, ce qui permet d'évaluer l'efficacité de l'antagoniste de l'intégrine. En revanche, la présence de sérum dans le milieu de culture des cellules différenciées peut empêcher les effets de l'antagoniste de l'intégrine. En fait, la fibronectine présente dans le sérum peut entrer en compétition avec l'inhibiteur pour la liaison à l'intégrine et empêcher son action pharmacologique. C'est pourquoi nous avons évalué l'influence de l'intégrine $\alpha 5$ dans la capacité de prolifération des cellules HeLa en délétant transitoirement son gène par si-RNA. Après une transfection de 24h, nous avons évalué la capacité de prolifération après 72h et 7 jours de culture. Les résultats obtenus montrent que l'extinction transitoire de l'intégrine entraîne une diminution significative de la prolifération à 72h et 7 jours des cellules HeLa « souches » et différenciées. Ceci confirme l'implication de l'intégrine dans la prolifération de cellules HeLa « souches » et différenciées (**Figure 46.C**).

2. Survie

Nous avons évalué la capacité des cellules HeLa différenciées à survivre en condition sans sérum, en présence ou non de fibronectine (10µg/mL) (test MTT). Nos résultats montrent que les cellules HeLa différenciées cultivées sans sérum ont une capacité de prolifération largement diminuée. De manière intéressante nous constatons que la fibronectine restaure leur prolifération au niveau de celle obtenue en présence de sérum (**Figure 46.D**).

Pour résumer, nous avons mis en évidence l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la prolifération des cellules HeLa en condition « souche » et différenciée. Ces résultats suggèrent que l'activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par la fibronectine est suffisante pour une prolifération optimale.

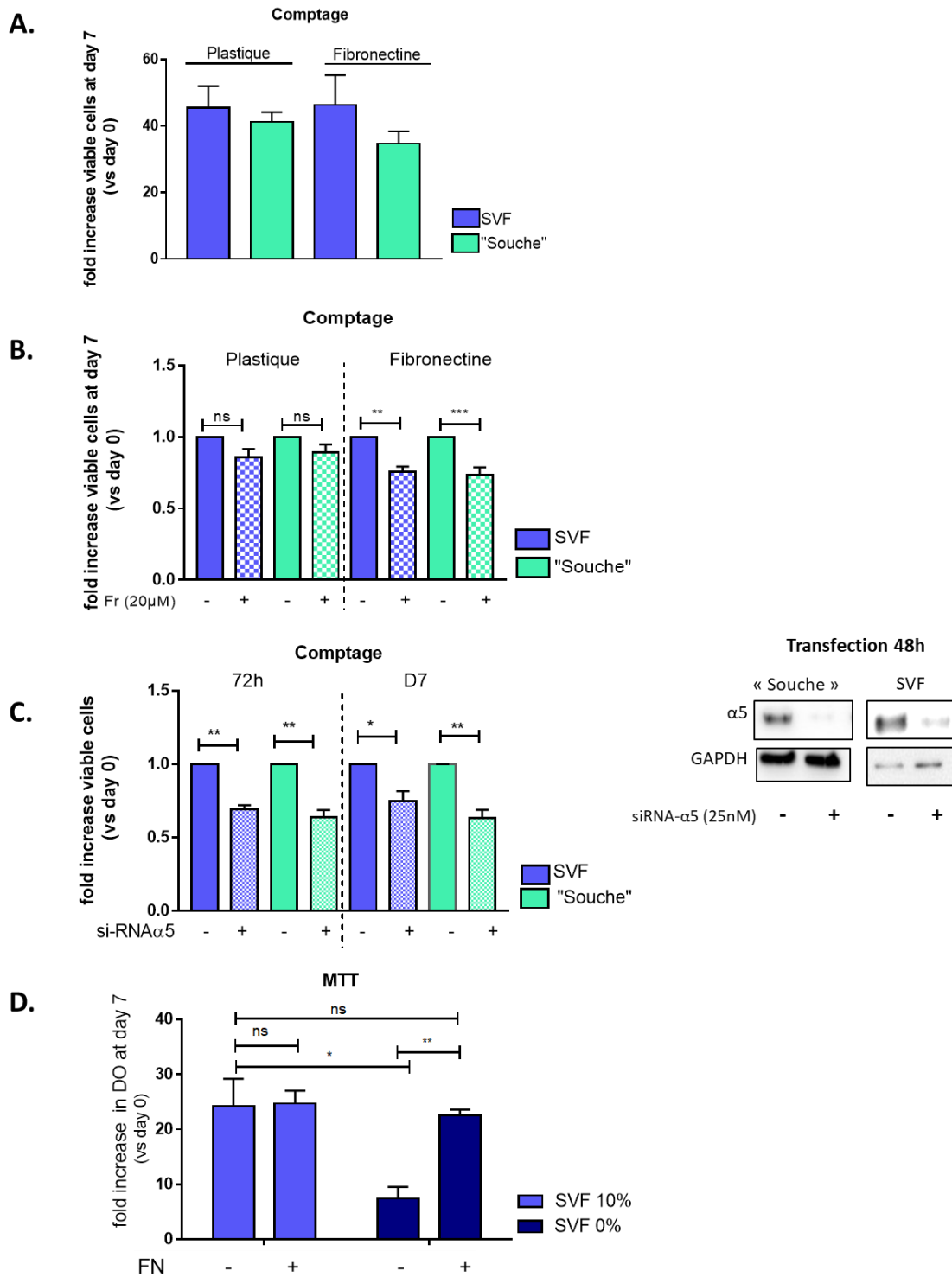


Figure 46 - L'intégrine α 5 est impliquée dans la prolifération des cellules HeLa en condition souche et la fibronectine influence la survie des cellules HeLa en condition différenciée. Analyse du taux de prolifération sur 7 jours ou/et 72 heures des cellules HeLa en condition « souche » et différenciée (SVF), par comptage au bleu trypan, sur un coating de fibronectine (10µg/mL) ou sur plastique **(A)** sans traitement **(B)** après traitement par un antagoniste de l'intégrine α 5 (Fr248, 20µM) **(C)** après délétion transitoire du gène de l'intégrine α 5 par si-RNA (transfection de 24h) sur plastique. A droite, confirmation par western blot de l'extinction transitoire du gène de l'intégrine après 48h de transfection dans la lignée HeLa « souche » et différenciée. **(D)** Analyse de la prolifération des cellules HeLa différenciées cultivées dans un milieu standard (SVF 10%) et dans un milieu dépourvu de sérum (SVF 0%). Les cellules ont été ensemencées sur un coating de fibronectine (10µg/mL) (FN+) ou sur plastique (FN-). L'expérience a été évaluée par le dosage de la succinate déshydrogénase (MTT) (n>3).

3. Evasion à partir d'un sphéroïde

Afin de déterminer la capacité des cellules HeLa à envahir un nouvel environnement, nous avons évalué leur capacité d'évasion en condition souche et en condition différenciée. Nous avons formé des sphéroïdes pendant 48h que nous avons déposés sur un coating de fibronectine (10µg/mL).

Nous avons constaté que les sphéroïdes formés par les cellules « souches » ne parviennent pas à former une masse compacte et se désagrègent au moment de leur dépôt. Au contraire, les cellules différenciées sont cohésives au sein du sphéroïde. De manière étonnante, nous observons une évasion différente dès les 24 premières heures de migration selon le statut souche et différencié des cellules HeLa. En effet, en ce qui concerne les cellules différenciées, elles s'échappent de la sphère tumorale et migrent sur le coating de fibronectine. En revanche, nous avons constaté que les agrégats formés par les cellules « souches » HeLa se désintègrent. Les cellules souches isolées, après la désagrégation des « sphères », semblent proliférer sur le coating de fibronectine (**Figure 47.A**).

Nous avons réalisé un test de dilution limite dans du collagène dans le premier but d'évaluer l'auto-renouvellement des cellules HeLa « souches ». De manière étonnante, nous avons observé la formation de colonies composées de cellules dissociées, 7 jours après ensemencement. Les cellules isolées présentent une forme allongée, suggérant une capacité de migration et de dissémination importante (**Figure 47.B**).

4. Migration

Nous avons évalué le chimiotactisme médié par la fibronectine dans la migration des cellules HeLa, à l'aide d'un test en chambre de Boyden. Pour cela nous avons réalisé un coating de fibronectine (10µg/mL) sur la membrane de l'insert. Nous avons continué notre analyse en travaillant uniquement avec les cellules « souches » tumorales. Nos résultats montrent que peu de cellules migrent en condition basale (sans coating de fibronectine). En revanche, les cellules « souches » tumorales migrent par chimiotactisme en direction de la fibronectine (**Figure 47.C**).

Afin de confirmer l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la migration, nous avons traité les cellules par 2 antagonistes non peptidiques spécifiques de l'intégrine $\alpha 5$ (K34c et Fr248, 20µM) et un anticorps bloquant (IIA1, 10µg/mL). Les résultats montrent que l'inhibition de l'intégrine ne modifie pas la capacité de migration en condition basale. En revanche, elle influence de manière significative le chimiotactisme médié par la fibronectine (**Figure 47.D**).

Pour résumer, nous avons mis en évidence l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la migration des cellules « souches » HeLa en direction d'un environnement riche en fibronectine. Nous avons également constaté que les cellules « souches » tumorales ont une plus grande capacité à se disséminer dans un environnement riche en fibronectine que les cellules différenciées.

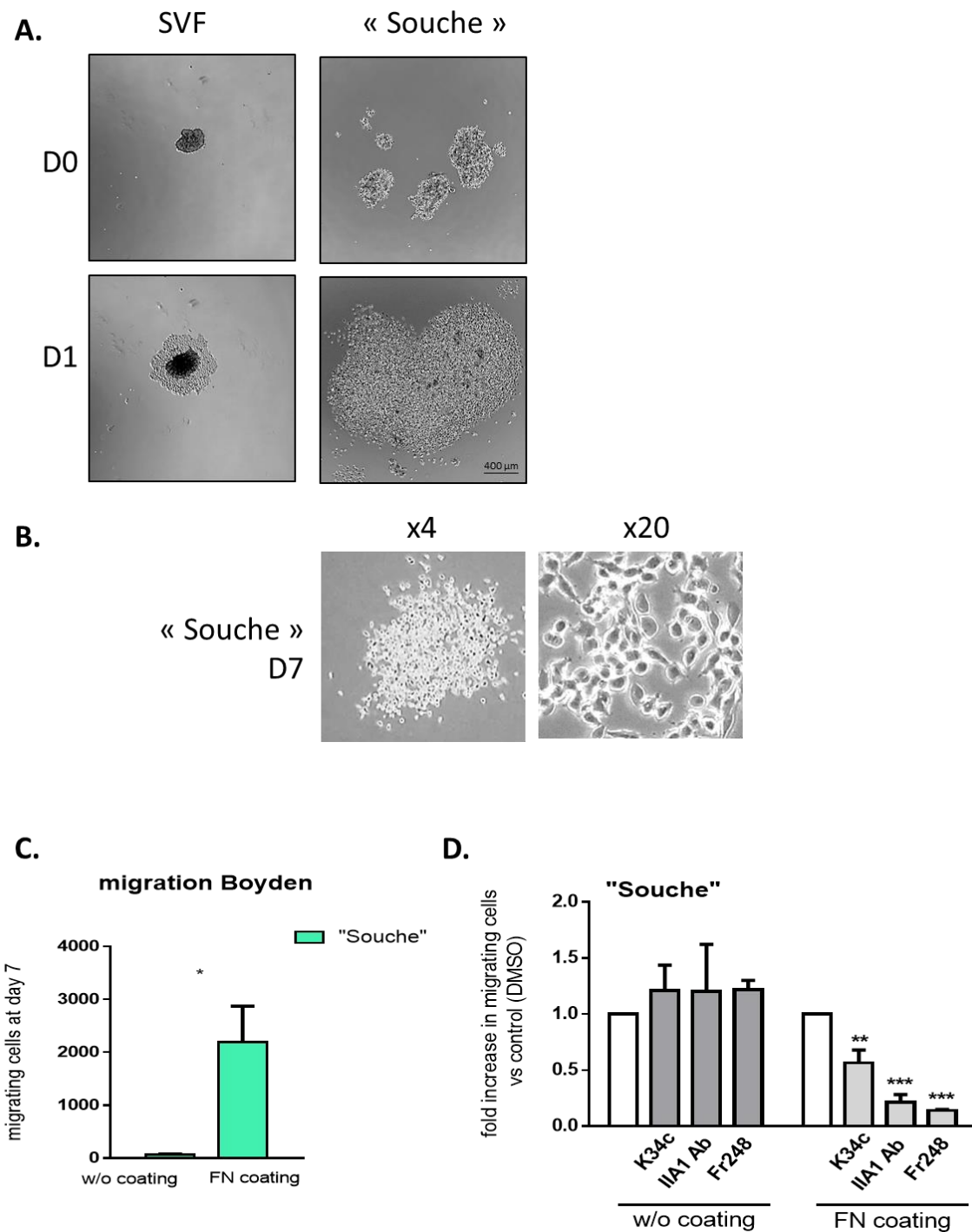


Figure 47 - Les cellules souches de HeLa présentent une forte capacité à migrer et à envahir un environnement riche en fibronectine. (A) Image par contraste de phase (x4) de l'évasion cellulaire sur 24 heures (D1) des cellules « souches » et différenciées sur fibronectine (FN, 15µg/mL). Barre d'échelle 400 µm. **(B)** Image par contraste de phase de colonies de cellules « souches » HeLa, sur collagène, après 7 jours d'ensemencement. **(C)** Quantification du nombre de cellules ayant migré à travers l'insert (comptage automatique des noyaux colorés au DAPI à l'aide du logiciel d'analyse d'images ImageJ) des cellules « souches » tumorales avec ou sans coating de fibronectine (10 µg/mL). **(D)** Rapport du nombre de cellules traitées par 3 antagonistes de l'intégrine α5 (Fr248 et K34c à 20µM et IIA1 10µg/mL) ayant migré comparées aux cellules non traitées, avec ou sans coating de fibronectine.

5) Implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la formation de métastases cérébrales

Les cellules souches tumorales seraient impliquées dans la formation de métastases (605,606), notamment issues de cancer du col de l'utérus (607,608). L'incidence des métastases cérébrales augmente dans la population, grâce à l'amélioration de la prise en charge des patients atteints de tumeurs primaires. Le rôle de l'intégrine $\alpha 5$ dans les métastases est largement démontré dans le cancer du sein (500,609,610) d'ostéosarcome (611), gastrique (612), rénal (498), du poumon (613), mélanome (492), ovarien (614). Nous avons donc évalué la capacité des cellules « souches » de cellules HeLa à former des tumeurs au niveau cérébral, mimant ainsi des métastases cérébrales, et l'implication de l'intégrine $\alpha 5$.

Une quantité de 10 000 cellules (dans 2 μ L) a été injectée dans le striatum de souris Nude (collaboration Dr Guénot, Strasbourg). Afin de déterminer l'implication de l'intégrine $\alpha 5$, nous avons traité les cellules « souches » HeLa par un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ (Fr248 20 μ M) avant leur injection. Quatre semaines après implantation, nous avons constaté une masse tumorale macroscopique, extra-crânienne et parfois hémorragique, sur les souris ayant reçu les cellules HeLa « souches ». Par ailleurs, parmi ces 4 souris, 2 d'entre elles ont dû être sacrifiées 2 jours avant la fin de l'expérience, ce qui démontre le caractère agressif de la tumeur formée. Aucun signe clinique n'a été mis en évidence chez les souris ayant reçu les cellules HeLa « souches » préalablement traitées par un antagoniste de l'intégrine (**Figure 48.A**).

En ce qui concerne l'étude microscopique, nous avons réalisé une coloration Hématoxyline/Eosine des coupes de tumeur et nous avons analysé par immunohistochimie l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ (Ab Ilal). Nos résultats montrent que les cellules « souches » HeLa forment une tumeur volumineuse, malgré une faible quantité de cellules implantée, en faveur d'un statut souche des cellules. Les tumeurs formées expriment fortement l'intégrine $\alpha 5$. Aucune détection de son expression n'est observée lorsque les cellules ont été traitées par un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$. Afin de vérifier la prise de la tumeur, nous avons effectué un immunomarquage avec un anticorps reconnaissant de manière spécifique les cellules humaines (Ab Stem121). Nous observons la présence d'une petite tumeur, ce qui confirme l'efficacité de l'injection des cellules (**Figure 48.B**).

Ainsi, compte tenu qu'aucun marquage de l'intégrine $\alpha 5$ n'a été détecté lorsque les cellules HeLa « souches » ont été traitées par un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ avant injection, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'inhibition de l'intégrine $\alpha 5$ empêche l'implantation tumorale. Afin de valider cette supposition, nous avons évalué l'impact de l'antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ sur l'adhérence des cellules HeLa « souches ». Nous avons effectué un test d'adhérence sur fibronectine avec des cellules préalablement traitées par un antagoniste de l'intégrine (Fr248 μ M) pendant une heure. Nos résultats confirment que l'inhibition de l'intégrine $\alpha 5$ empêche les cellules HeLa « souches » d'adhérer sur un substrat de fibronectine (**Figure 48.C**).

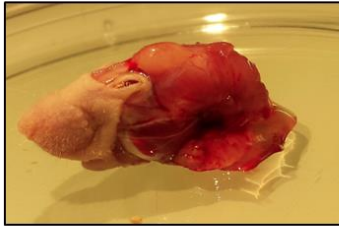
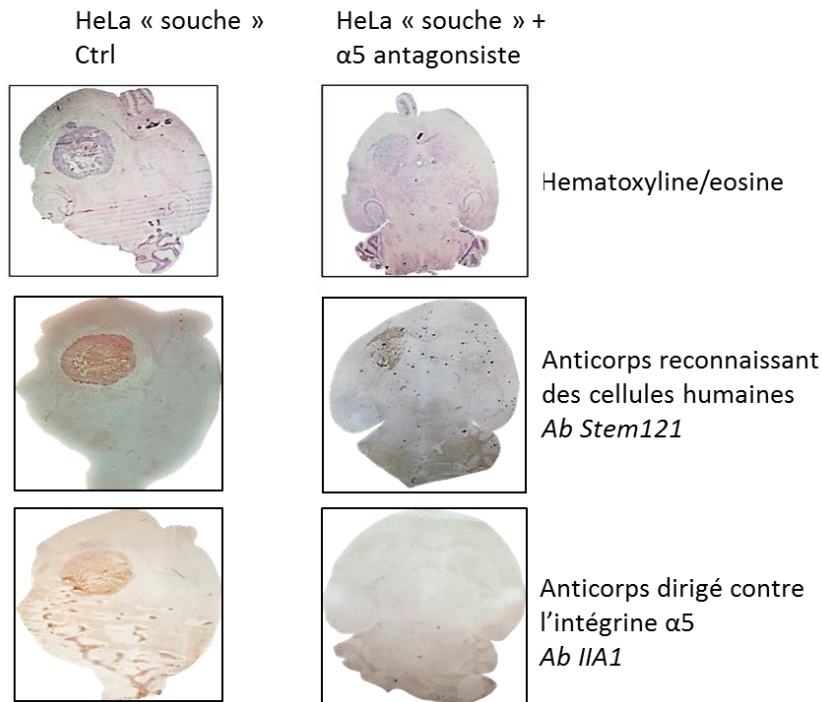
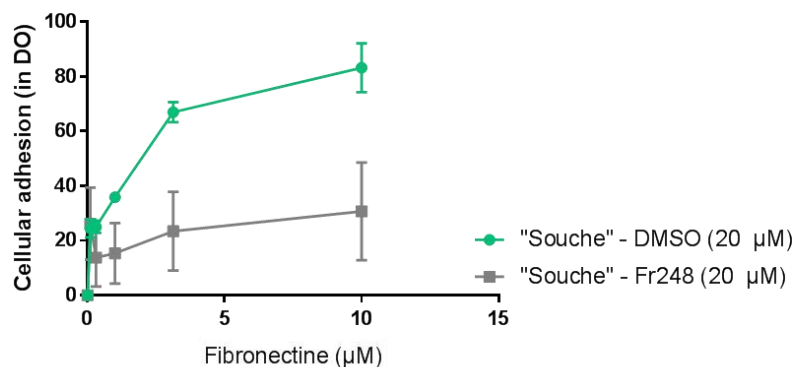
A.**B.****C.**

Figure 48 - L'intégrine $\alpha 5$ est impliquée dans l'adhérence et la formation d'une tumeur cérébrale volumineuse. (A) Photos de souris Nude, 4 semaines après avoir reçu en intracérébrale 10 000 cellules « souches » HeLa. (B) Coupe de cerveau, 4 semaines après injection en intracérébrale de cellules « souches » HeLa contrôles (Ctrl) ou préalablement traitées par un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ avant implantation (à 50 μM la veille de l'expérimentation et 50 μM lors de l'injection). L'évaluation de la prise en masse tumorale a été réalisée par coloration Hématoxyline/éosine et par immunomarquage de protéine humaine (*Ab Stem121*). L'implication de l'intégrine $\alpha 5$ a été analysée par son immunomarquage (*Ab IIA1*). (C) Quantification par absorbance des cellules ayant adhéré à un substrat matriciel selon la concentration de fibronectine, préalablement traitées par un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ (Fr248 20 μM).

Pour résumer, nous avons mis en évidence l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la formation d'une tumeur cérébrale. Son inhibition empêche les cellules HeLa « souches » d'adhérer et de former une masse tumorale volumineuse.

6) Discussion

1. Isolement de cellules « souches » à partir de cellules HeLa

Nous avons isolé des cellules souches issues de la lignée HeLa à l'aide d'un milieu dépourvu de sérum et enrichi en facteurs de croissance. L'étude de Chen et al., 2012 (599) a montré que l'utilisation de milieux sans sérum entraîne l'enrichissement de cellules souches tumorales en 10 à 15 jours. Dans ces conditions, les cellules souches tumorales forment des agrégats. En revanche, une deuxième méthode propose de travailler dans un système de culture rendant impossible l'adhésion. Ce type d'enrichissement est plus efficace et rapide (5 à 7 jours) et permet d'obtenir des cellules souches tumorales sous forme de sphères (599–601). Dans nos conditions de culture, les cellules souches issues de la lignée HeLa se présentent également sous forme d'agrégats semi-adhérents. Ainsi, bien que nous n'observions pas de sphères, une caractéristique de cellules souches tumorales, ces données suggèrent que les cellules HeLa, maintenues dans un milieu dépourvu de sérum, présentent un phénotype peu différencié.

L'augmentation des ARNm de marqueurs souches dans ces cellules est en faveur de cette hypothèse. Il serait nécessaire de confirmer ces données au niveau protéique. Il serait également intéressant d'évaluer l'expression de marqueurs de différenciation (tel que la cytokératine) afin d'estimer son expression dans les HeLa différenciées et son absence d'expression dans les HeLa « souches ».

2. Implication de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ dans l'agressivité des cellules HeLa

La surexpression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules de cancer utérin est démontrée dans deux études (493,595). En accord avec ces données, nos travaux mettent en évidence une expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ dans les cellules HeLa différenciées et « souches ». L'étude de López et al., 2012 (600) a montré une augmentation de l'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules souches issues de cellules HeLa comparé aux cellules non souches. Nous avons confirmé l'augmentation de l'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ et nous avons mis en évidence une augmentation de son expression protéique dans les cellules HeLa « souches » comparé aux cellules HeLa différenciées.

L'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la migration et l'adhésion de cellules métastatiques a été mise en évidence dans plusieurs modèles tumoraux dont le cancer du sein (500,609,610,615), du rein (498), du poumon (613), des ovaires (428), les ostéosarcomes (611) et les mélanomes (492). A notre connaissance, notre étude est la première à démontrer le rôle de l'intégrine dans la migration et l'adhésion de cellules métastatiques issues de carcinomes utérins.

Nous avons également montré une augmentation du taux d'ARNm de Notch dans les cellules « souches » HeLa comparées aux cellules différenciées. L'étude de Zhang et al., 2018 (616) a montré, dans les cellules de

carcinomes épidermoïdes oraux, que Notch régule l'EMT, un processus particulièrement impliqué dans la dissémination cellulaire, conduisant à la formation de métastases, et dans la plasticité entre des cellules différenciées et des cellules souches tumorales. Il est intéressant de noter que les données de la littérature démontrent que l'intégrine $\alpha 5$ régule la migration cellulaire via l'EMT (464,613,617,618). Ainsi, il serait intéressant de confirmer l'implication de l'intégrine dans l'EMT des cellules HeLa « souches » et différenciées en étudiant d'autres marqueurs (Snail, vimentine et Zeb1).

Enfin, nous avons également montré que l'activation de l'intégrine $\alpha 5$ par la fibronectine est impliquée dans la prolifération des cellules HeLa « souches » et différenciées. L'inhibition de l'intégrine permettrait d'inhiber la prolifération des cellules « souches », impliquées dans la formation de récidives et de métastases, et des cellules HeLa différenciées. Ces dernières composant la masse tumorale de la tumeur primaire ou secondaire, l'inhibition de l'intégrine pourrait être intéressante dans le traitement de carcinome utérin.

Ainsi, notre étude a démontré pour la première fois l'implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la formation de métastases au niveau cérébral de cellules de carcinome utérin. Afin de confirmer ces résultats *in vitro*, nous avons injecté les cellules HeLa « souches » dans le striatum de souris Nude. Dans le but d'évaluer l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans l'agressivité tumorale, nous avons traité des cellules HeLa « souches » par un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$. Ne connaissant pas le passage de l'antagoniste de l'intégrine à travers la BHE, nous avons traité les cellules la veille et au moment de l'implantation. Nos travaux démontrent que l'intégrine $\alpha 5$ est une cible thérapeutique pertinente empêchant potentiellement les cellules métastatiques de carcinomes d'adhérer dans un nouveau foyer, dans notre cas cérébral.

Pour conclure, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ semble être une cible thérapeutique potentielle pour les carcinomes utérins. Aucune donnée récente à ce sujet n'est disponible. L'implication de l'intégrine dans la formation de métastases cérébrales est également suggérée par nos travaux. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une thérapie combinant un inhibiteur de l'intégrine associée à une thérapie standard permettrait d'éradiquer la tumeur primaire, composée de cellules différenciées exprimant l'intégrine, et ses métastases, issues de la dissémination de cellules souches tumorales exprimant également l'intégrine.

L'analyse d'une seule lignée ne nous permet pas de généraliser ces résultats pour le moment. Néanmoins, et compte tenu des nombreuses études mettant en évidence l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans l'agressivité et la progression tumorale, aboutissant à la formation de métastases, il serait intéressant de poursuivre cette étude dans d'autres modèles tumoraux et d'autres foyers métastatiques. Ces résultats sont en faveur du potentiel oncogénique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$.

Ces résultats font l'objet d'une publication en cours de rédaction.

Résultats Partie 3:

Au cours de ma thèse, j'ai également participé à des travaux de l'équipe qui ont abouti à deux publications et à une revue dans des journaux à comité de lecture.

I. Article 1

Renner, G., Noulet, F., **Mercier, M.-C.**, Choulier, L., Etienne-Selloum, N., Gies, J-P., Lehmann., M., Lelong-Rebel., I, Martin, S., and Dontenwill, M. (2016). **Expression/activation of $\alpha5\beta1$ integrin is linked to the β -catenin signaling pathway to drive migration in glioma cells.** *Oncotarget*, 7, 62194-62207.

L'invasion est une caractéristique importante du glioblastome et est responsable en partie de l'échec thérapeutique. Les cellules tumorales invasives sont responsables de la formation d'une récurrence localisée à la marge de la résection chirurgicale. La dérégulation de la voie de la β -caténine participe à la progression tumorale et à l'invasion des gliomes. Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré que l'intégrine $\alpha5\beta1$ est impliquée dans la résistance à l'apoptose et dans la migration de cellules de GBM (453,578). Cette étude explore le lien entre l'expression ou l'activation de l'intégrine $\alpha5\beta1$ et l'activité transcriptionnelle de la β -caténine dans des lignées tumorales de glioblastomes.

A partir de plusieurs lignées tumorales de GBM, l'étude a mis en évidence une corrélation entre le taux d'expression de l'intégrine $\alpha5$ et la stabilisation de la forme active de la β -caténine dans des conditions de culture n'impliquant pas l'activation de l'intégrine (sans sérum). L'activation de l'intégrine $\alpha5$ par la fibronectine induit l'activation de la β -caténine, sa translocation dans le noyau dans lequel elle régule la transcription de ses gènes cibles (c-myc, cyclin D1, axine). L'analyse des mécanismes moléculaires impliqués dans cette relation démontre que la protéine AKT participe à l'activation de la β -caténine. L'étude s'est ensuite intéressée aux conséquences phénotypiques induites par la voie $\alpha5\beta1$ /AKT/ β -caténine. L'utilisation d'antagoniste de l'intégrine $\alpha5\beta1$ et d'inhibiteurs de la protéine AKT et de la β -caténine a mis en évidence une migration dépendante de la voie $\alpha5\beta1$ /AKT/ β -caténine initiée par l'activation de l'intégrine par la fibronectine. Les résultats ont montré la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse (Snail, Vimentine et Zeb1) par la voie $\alpha5\beta1$ /AKT/ β -caténine. Cette étude a également montré que l'activation de l'intégrine $\alpha5\beta1$ pouvait induire deux voies de signalisation différentes : soit la voie AKT/ β -caténine impliquée dans la migration, soit la voie AKT/PEA15 pour la résistance à l'apoptose.

Ainsi, ces données caractérisent les mécanismes moléculaires responsables de la migration des cellules exprimant l'intégrine $\alpha5\beta1$, impliquant la β -caténine. L'inhibition de l'intégrine $\alpha5\beta1$ apparaît comme une stratégie intéressante pour inhiber l'invasion du parenchyme sain. De manière similaire à mes travaux de thèse, cette étude met en évidence l'importance de la fibronectine dans la migration des cellules de glioblastome exprimant l'intégrine $\alpha5$. À l'issue de cette étude, se pose la question de caractériser l'implication de la β -caténine dans nos différents modèles en lien avec l'hétérogénéité tumorale. Ces données

nous permettraient d'apporter une meilleure compréhension des voies moléculaires responsables de la migration des cellules des différentes lignées et clones exprimant l'intégrine.

Expression/activation of $\alpha 5\beta 1$ integrin is linked to the β -catenin signaling pathway to drive migration in glioma cells

Guillaume Renner¹, Fanny Noulet¹, Marie-Cécile Mercier¹, Laurence Choulier¹, Nelly Etienne-Selloum¹, Jean-Pierre Gies¹, Maxime Lehmann¹, Isabelle Lelong-Rebel¹, Sophie Martin¹, Monique Dontenwill¹

¹UMR7213 CNRS, Team Tumoral Signaling and Therapeutic Targets, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France

Correspondence to: Monique Dontenwill, email: monique.dontenwill@unistra.fr

Keywords: $\alpha 5\beta 1$ integrin, beta-catenin, migration, EMT, glioma

Received: April 13, 2016

Accepted: August 10, 2016

Published: August 23, 2016

ABSTRACT

The Wnt/beta catenin pathway has been highlighted as an important player of brain tumors aggressiveness and resistance to therapies. Increasing knowledges of the regulation of beta-catenin transactivation point out its hub position in different pathophysiological outcomes in glioma such as survival and migration. Crosstalks between integrins and beta-catenin pathways have been suggested in several tumor tissues. As we demonstrated earlier that $\alpha 5\beta 1$ integrin may be considered as a therapeutic target in high grade glioma through its contribution to glioma cell migration and resistance to chemotherapy, we addressed here the potential relationship between $\alpha 5\beta 1$ integrin and beta-catenin activation in glioma cells. We demonstrated that overexpression and activation by fibronectin of $\alpha 5\beta 1$ integrin allowed the transactivation of beta-catenin gene targets included in an EMT-like program that induced an increase in cell migration. Hampering of beta catenin activation and cell migration could be similarly achieved by a specific integrin antagonist. In addition we showed that $\alpha 5\beta 1$ integrin/AKT axis is mainly involved in these processes. However, blockade of beta-catenin by XAV939 (tankyrase inhibitor leading to beta-catenin degradation) did not synergize with p53 activation aiming to cell apoptosis as was the case with integrin antagonists. We therefore propose a dual implication of $\alpha 5\beta 1$ integrin/AKT axis in glioma cell resistance to therapies and migration each supported by different signaling pathways. Our data thus suggest that $\alpha 5\beta 1$ integrin may be added to the growing list of beta-catenin modulators and provide new evidences to assign this integrin as a valuable target to fight high grade glioma.

INTRODUCTION

Since several years association of the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathways with tumorigenesis and tumor aggressiveness has garnered significant attention in different solid tumors thus leading to the development of potential inhibitors [1–3]. Its aberrant activation has been reported in glioma, and Wnt pathway component expressions have been correlated with histological grades of malignancy [4–7]. Dysregulation of Wnt/beta-catenin pathway was shown to contribute to glioma development and progression [8] as well as invasion [9]. Studies have indicated that binding of wnts

(wnt1, wnt3a; [10]) to receptors of the Frizzled/LRP families, leads to beta-catenin evasion from GSK3 β -induced degradation, accumulation in the cytoplasm, translocation in the nucleus and transcription of various Wnt target genes involved in proliferation (c-myc, cyclin D1, ..) or negative regulators of the pathway (axin, DKK1..). Beside its participation in canonical Wnt pathway, beta-catenin is also an integral part of the cadherin-catenin complexes at the cell membranes which drive the cell-cell contacts. Likewise, the disruption of the interactions between cadherin, alpha-catenin and beta-catenin has been shown to lead to translocation in the nucleus and transactivation of beta-catenin together with

increased migration [8]. Activation of cell membrane-associated kinases (growth factor receptors such as EGFR, which is known to affect pathogenesis and prognosis of glioma) is thought to disrupt these complexes and to promote beta-catenin transactivation and cell migration [11] independently of the Wnt pathway [12] although crosstalks may exist between them [13]. Beta-catenin thus appears as an important hub/determinant in glioma aggressiveness controlling both proliferation/survival and migration/invasion of tumoral cells. Very recently, upregulated Wnt/beta-catenin signaling was reported to induce radioresistance [14] and chemoresistance [15] in glioma.

Due to the complexity of the networks involving beta-catenin and its major contribution to the pathology, the search for unknown drivers remains an important topic in the field of glioma. We and others have previously characterized the $\alpha 5\beta 1$ integrin, also known as the fibronectin receptor, as playing a key role in the pathobiology of glioma [16, 17]. Integrins are membrane-localised protein heterodimers recognizing specific extracellular matrix components and integrating the microenvironmental cues into signaling pathways. They are involved in many tumoral processes [18] and particularly in survival, migration and resistance to therapies. We previously demonstrated that specific $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists block fibronectin-induced cell migration [19] and sensitize glioma cells to chemotherapy in a p53 status-dependent way [16, 20, 21]. Crosstalks between integrin and Wnt/beta-catenin pathways have been suggested first in non tumoral cells and more recently in solid tumors. In general, activation of integrins induces downstream protein kinases activation (ILK, FAK..) paralleling with destabilization of cadherin/beta-catenin complexes dependently or independently from the Wnt pathway [22–24]. Transcriptional activity of beta-catenin in the nucleus results in an epithelial to mesenchymal (EMT) program and increases cell migration [25].

To date, very few data concerning an interconnection between $\alpha 5\beta 1$ integrin and beta-catenin activity are available [26] and, to our knowledge, none for tumors (including glioma). The aim of this study was to explore the potential link between the expression/activation of $\alpha 5\beta 1$ integrin and beta-catenin transcriptional activity in glioma cell lines and to investigate the phenotypical consequences.

RESULTS

Integrin $\alpha 5\beta 1$ expression and activation induce β -catenin activation

We first determined whether β -catenin activation could be linked to $\alpha 5\beta 1$ expression in U87MG and U373MG glioma cell lines. Measure of the beta-catenin

basal level of activation was achieved with cells deprived of serum for 90 min as described in Material and Methods. Activation of beta-catenin was recorded with a specific antibody which recognizes a non-phosphorylated Ser37/Thr41 N-terminal beta-catenin epitope known to be generated upon Wnt signaling or GSK3 β pharmacological inhibition [27]. As shown in the Figure 1A, in the absence of exogenous stimuli, expression of $\alpha 5$ integrin is clearly related to the expression of this activated form of beta-catenin in both cell lines. We also investigated the effect of a specific $\alpha 5\beta 1$ integrin inhibitor K34c that proved able to inhibit U87MG cell survival and migration [19]. Under these basal conditions, K34c inhibited the activated form of beta-catenin in $\alpha 5$ -high cells to the level of $\alpha 5$ -low cells with little impact on $\alpha 5$ -low cells (Figure 1B). Data thus suggested that in basal conditions, expression of $\alpha 5$ integrin was linked to beta-catenin activation in U87MG and U373MG cells which could be inhibited by a specific $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonist. The relationship between $\alpha 5$ integrin level and beta-catenin activation was evaluated in other glioma cell lines as shown in the Figure 1C. Data from western blot analysis (Figure 1C, left) indicated a significant correlation between these two parameters when 6 glioma cell lines were considered (Figure 1C, right).

We then analyzed if $\alpha 5\beta 1$ integrin activation through binding to fibronectin may enhance beta-catenin activation. For this purpose, U87MG- $\alpha 5$ high cells were plated on fibronectin pre-coated wells. The effects of other ECM components (collagen, vitronectin, laminin) were compared to those obtained on non-coated or with poly-L-lysine (a non ECM component) coated wells. As compared to uncoated wells, poly-L-lysine and laminin did not improve the active beta-catenin fraction in U87MG- $\alpha 5$ high cells (Figure 2A) thus ruling out a role of laminin receptors ($\alpha 1\beta 4$, $\alpha 6\beta 4$). However, likewise to the increase induced by fibronectin, collagen and vitronectin were both able to similarly enhance the beta-catenin activity suggesting a role of collagen-binding $\beta 1$ integrins and vitronectin-binding αv integrins on these substrates. Our data are in agreement with other studies on non-glioma cells showing that collagen- or vitronectin-related integrins may be able to stimulate the beta-catenin pathway [22, 28]. In order to confirm a specific role of $\alpha 5\beta 1$ integrin in the fibronectin-dependent activation of beta-catenin, we next compared the activation process in U87MG cells with $\alpha 5$ high or low expression. Fibronectin-dependent beta-catenin activation was strongly enhanced in $\alpha 5$ -high cells. In $\alpha 5$ -low cells the low basal activity of beta-catenin was enhanced by fibronectin until reaching the basal level in $\alpha 5$ -high cells (Figure 2B). Similar results were obtained in U373MG cells (Figure 2C). Data thus confirmed that on a fibronectin matrix, beta-catenin activation occurs upon fibronectin-linked $\alpha 5$ integrin activation but do not exclude participation of other fibronectin receptors (such as $\alpha v\beta 3$ integrin which is also expressed on U87MG and U373MG cells).

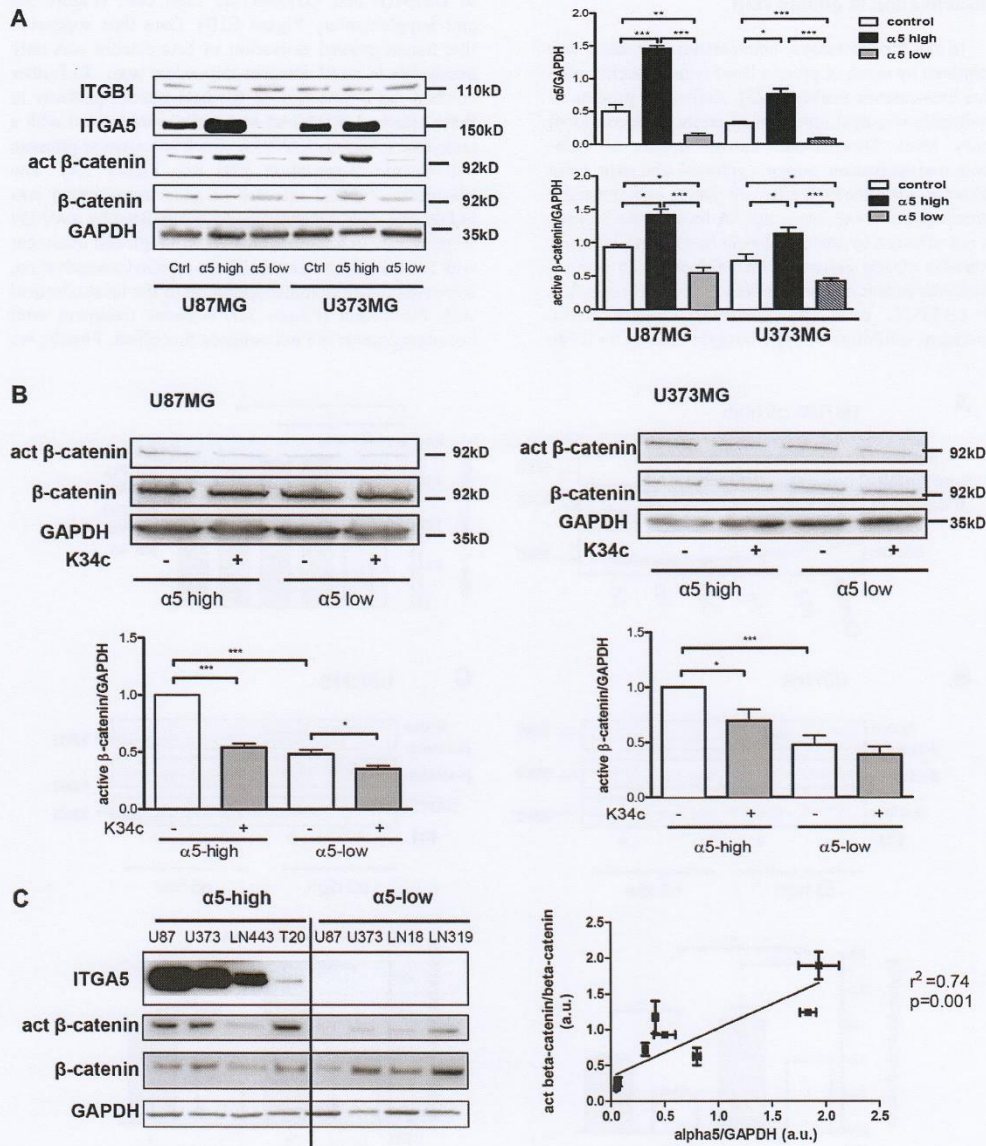


Figure 1: Expression of $\alpha 5 \beta 1$ integrin is related to beta-catenin activation. (A) Western blot analysis of $\alpha 5$ integrin subunit (ITGA5), $\beta 1$ integrin subunit (ITGB1), active beta-catenin (act β -catenin) and total beta-catenin (β -catenin) expressions in U87MG and U373MG control cells (transfected with the empty vector), overexpressing ($\alpha 5$ -high) or repressed for ($\alpha 5$ -low) $\alpha 5$ integrin. (B) Western blot analysis of active beta-catenin and total beta-catenin level after 90-min treatment with K34c integrin antagonist (20 μ M). (C) Left. Relationships between $\alpha 5 \beta 1$ integrin levels and β -catenin activation in different glioma cell lines. One western blot representative of 3 independent experiments is shown. Right. Linear regression analysis of the relationship occurring between $\alpha 5$ expression level and active beta-catenin using data from the western blot in b) and values obtained from control cells in western blot of a). Histograms represent the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments normalized with GAPDH with * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Integrin $\alpha 5 \beta 1$ activation increases β -catenin transactivation in glioma cells

In the former assays, beta-catenin activation was determined by mean of protein level with a specific anti-active beta-catenin antibody [27]. Activation process of beta-catenin was next investigated on the transcriptional activity level. Downstream known targets of beta-catenin transactivation, c-myc, cyclin D1 and axin, were analyzed by real time PCR after cell plating on fibronectin. Interestingly, although basal mRNA level of the 3 genes was not affected by the expression level of $\alpha 5$ integrin, fibronectin clearly enhanced their transcription in a $\alpha 5$ integrin-dependent manner for both U87MG (Figure 3A) and U373MG cells (Supplementary Figure S1A). Conversely, inhibition of $\alpha 5 \beta 1$ integrin activity by K34c

only affected negatively the mRNA level of the 3 genes in U87MG- and U373MG- $\alpha 5$ high cells (Figure 3B and Supplementary Figure S1B). Data thus suggested that transcriptional activation of beta-catenin was only obtainable in an $\alpha 5$ integrin-dependent way. To further confirm the implication of the beta-catenin pathway in these effects, U87MG- $\alpha 5$ high cells were treated with a tankyrase inhibitor, XAV939, which is known to promote beta-catenin degradation [29] (See Figure 5A). The fibronectin-induced increase of gene transcription was highly and dose-dependently downregulated by XAV939 (Figure 3C). In addition, U87MG- $\alpha 5$ high cell treatment with LiCl, a known inducer of beta-catenin transactivation, increased the gene transcription up to the level obtained with fibronectin (Figure 3D) whereas treatment with both compounds did not enhance this effect. Finally, we

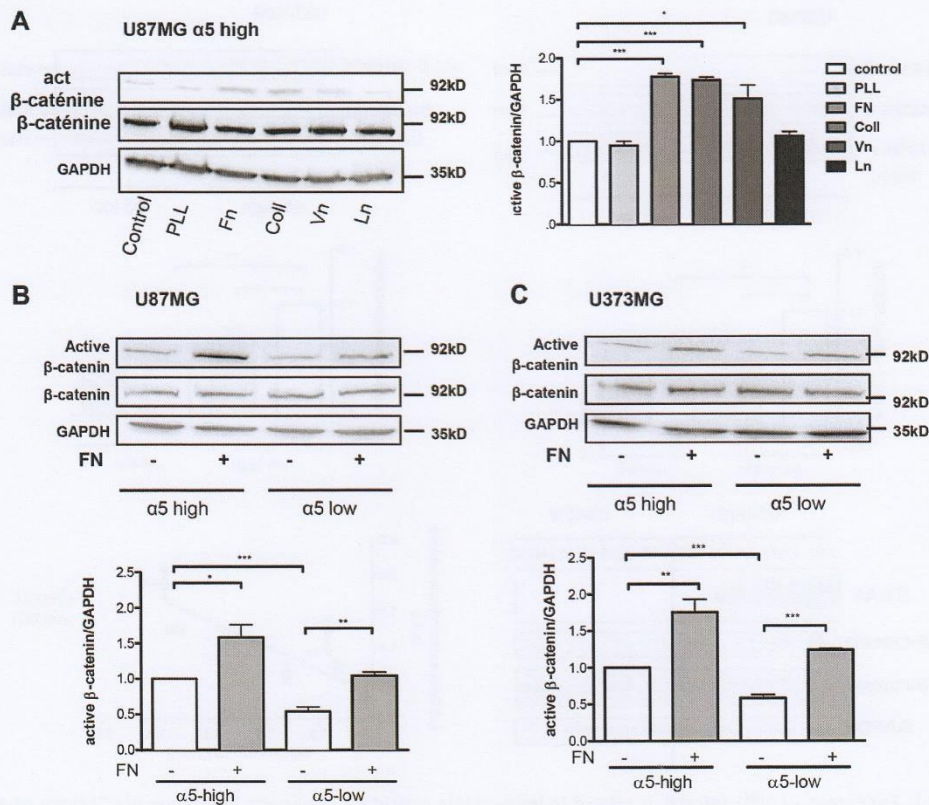


Figure 2: Fibronectin matrix triggers active β -catenin. (A) Western blot analysis of β -catenin activation in U87MG- $\alpha 5$ high cells plated for 90-min on uncoated (control) or 10 $\mu\text{g/ml}$ poly-L-lysine (PLL), fibronectin (Fn), collagen (Coll), vitronectin (Vn) or laminin (Ln) coated wells. GAPDH was used as a loading control. (B) Western blot analysis of fibronectin-induced effects on activation of β -catenin in U87MG $\alpha 5$ -high and $\alpha 5$ -low cells. Cells were plated on fibronectin (10 $\mu\text{g/ml}$)-coated wells for 90-min. (C) Similar experiments as in b) for U373MG $\alpha 5$ -high and $\alpha 5$ -low cells. One western blot representative of 3 independent experiments is shown. Histograms represent the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments normalized with GAPDH with * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

confirmed that $\alpha 5$ integrin activation by fibronectin led to the activation of the beta-catenin/TCF/LEF signaling pathway as shown in the Figure 3E. Taken together, data indicated that only fibronectin-dependent activation of $\alpha 5 \beta 1$ integrin led to transcriptional activity of beta-catenin in glioma cell lines.

Integrin $\alpha 5$ -dependent beta-catenin activation is not implicated in glioma cell survival and resistance to p53 activators

We already demonstrated the implication of $\alpha 5$ integrin in glioma chemoresistance and tumor cell

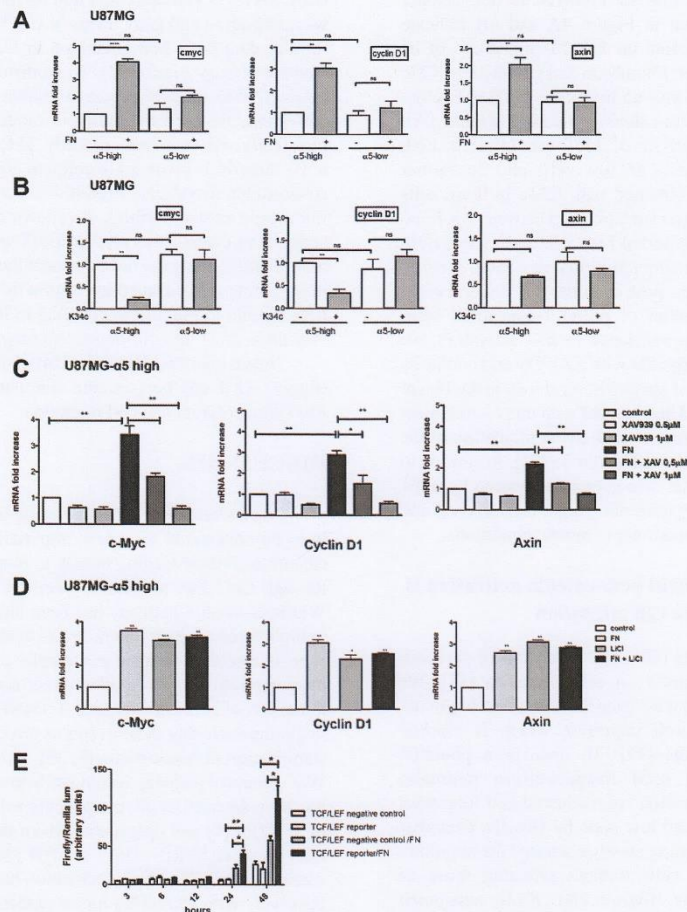


Figure 3: Integrin $\alpha 5 \beta 1$ activation increases β -catenin transactivation in U87MG cells. Transcriptional activity of β -catenin was recorded by mRNA variation analysis (RT-qPCR) of downstream known targets of beta-catenin (myc, cyclin D1 and axin). (A) U87MG $\alpha 5$ -high and $\alpha 5$ -low cells were incubated during 6 hours on uncoated or fibronectin-coated wells. (B) U87MG $\alpha 5$ -high and $\alpha 5$ -low cells were incubated during 6 hours on uncoated wells with or without the integrin antagonist K34c (20 μ M). (C) U87MG $\alpha 5$ -high cells were incubated during 6 hours on uncoated wells as the control condition and compared with cells on fibronectin-coated wells (10 μ g/ml) in the absence or presence of XAV939 (0.5 and 1 μ M), a tankyrase inhibitor which provokes the degradation of β -catenin. (D) U87MG $\alpha 5$ -high cells were incubated during 6 hours on uncoated wells as the control condition, on fibronectin-coated wells (10 μ g/ml), in the presence of lithium chloride (LiCl, 30 μ M; a known activator of β -catenin transactivation) or both. (E) TCF/LEF reporter activity of U87MG- $\alpha 5$ high cells plated on fibronectin. Cells were transfected with a negative control or an inducible transcription factor responsive firefly luciferase reporter and a constitutively expressing Renilla construct and plated on uncoated or fibronectin-coated wells for the times indicated. Histograms represent relative luminescence units (firefly/renilla arbitrary units). Data represent the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments with * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,005; ns, non-significant.

migration. Our recent data implicated the integrin-dependent PI3K/AKT pathway activation in resistance to p53 activators. Inactivation of AKT via integrin antagonist K34c was required to sensitize U87MG- $\alpha 5$ high cells to p53 activator Nutlin-3a [21]. As inactivation of PI3K/AKT signaling is known to modulate beta-catenin-mediated gene transcription [30–32], we wondered if integrin-driven AKT pathway may be involved in beta-catenin activation. Data shown in Figure 4A and 4B indicate that AKT phosphorylation on Ser473 (indicative of its activation) is induced on fibronectin and inhibited by K34c in U87MG- and U373MG- $\alpha 5$ high cells looking like the results obtained for beta-catenin activation (Figure 1A). Additionally, basal activity of AKT was lower in both U87MG- and U373MG- $\alpha 5$ low cells and no further inhibitory effect was obtained with K34c in these cells (Figure 4B). Data suggest a relationship between AKT and active beta-catenin supported by $\alpha 5$ integrin expression levels. If such, beta-catenin inhibition may act in synergy with Nutlin-3a in the purpose of killing the tumoral cells. To evaluate the potential of $\alpha 5$ /AKT-dependent beta-catenin implication in resistance to p53 activators, we treated U87MG- $\alpha 5$ high cells with XAV939 and Nutlin-3a and recorded markers of apoptosis. As shown in the Figure 5A, no apoptosis could be obtained with this co-treatment in contrast to those obtained with the combination of the integrin antagonist K34c and Nutlin-3a [21]. According to these data, it seems that beta-catenin activation by $\alpha 5\beta 1$ integrin/AKT pathway does not trigger cell survival and resistance to therapy in our experimental conditions.

Integrin $\alpha 5$ -dependent beta-catenin activation is implicated in glioma cell migration

In addition to its role in proliferation or survival, beta-catenin also impacts on cell migration [33]. We already have shown that $\alpha 5$ integrin expression in glioma cells triggers single cell migration which is blocked by specific antagonists [19]. To uncover a potential relationship between $\alpha 5\beta 1$ integrin-driven migration and beta-catenin activation we evaluated cell migration of U87MG- $\alpha 5$ high and low cells by Boyden Chamber assays. Fibronectin coating clearly enhanced the migration of U87MG- $\alpha 5$ high cells without affecting those of U87MG- $\alpha 5$ low cells (Figure 5B). K34c antagonist significantly decreased the fibronectin/ $\alpha 5$ -dependent cell migration (Figure 5B), without affecting the U87MG- $\alpha 5$ low cell migration. Cell treatment with XAV939 also clearly inhibited the $\alpha 5$ -driven fibronectin-dependent cell migration (Figure 5B) supporting an important role of beta-catenin activation in cell migration. Importantly, MK2206, an AKT inhibitor, behave similarly as K34c and XAV939 and also inhibited U87MG- $\alpha 5$ high cell fibronectin-dependent migration (Figure 5B). In line with this, the beta-catenin-identified targets implicated in EMT-induced cell migration snail, vimentin and zeb1

mRNAs were increased in U87MG- $\alpha 5$ high cells plated on fibronectin and decreased by K34c, XAV939 or MK2206 treatments (Figure 5C). We confirmed that vimentin was similarly affected at the protein level (Supplementary Figure S2). In U87MG- $\alpha 5$ low cells, neither migration nor snail, vimentin or zeb1 mRNA levels were affected by fibronectin, K34c or MK2206 (Figure 5B and 5C). Only XAV939 inhibited, in a non $\alpha 5$ integrin-dependent way, migration and gene levels in U87MG- $\alpha 5$ low cells. Similar data have been obtained in U373MG cell line (Supplementary Figure S3). To confirm the relationship between $\alpha 5\beta 1$ integrin-driven migration and beta-catenin activation, we used the spheroid model of U87MG- $\alpha 5$ high cells we described recently [34]. In this model, $\alpha 5\beta 1$ integrin is involved in cell-cell cohesion inside the spheroid but drives cell migration out of the spheroid on fibronectin-coated surfaces. As shown in the Figure 5D, active beta-catenin was clearly localized only at the cell membrane in the spheroid but relocated to the nucleus in migrating cells. Data thus suggest that translocation of beta-catenin to the nucleus leading to its transactivation may drive $\alpha 5\beta 1$ integrin-dependent migration.

Taken together, data show that $\alpha 5$ integrin activation triggers AKT and beta-catenin stimulation, inducing an EMT-like program and cell migration.

DISCUSSION

We present here data suggesting that $\alpha 5\beta 1$ integrin is to be considered as a new important driver of beta-catenin activation leading mostly to tumor cell migration through EMT-like processes. Aberrant activation of the Wnt/beta-catenin pathway has been largely documented in brain tumors where it contributes to the maintenance of stem-like cells, resistance to therapies and to an invasive phenotype [6]. Unlike in other tumor types, no activating mutations of beta-catenin gene (CTNNB1) were detected in glioma excluding these events as drivers of cytoplasmic stabilization of beta-catenin [5, 35]. Dysregulation of the Wnt canonical pathway leading to beta-catenin activation has been detected in glioma patients with overexpression of WNT3a [5] and epigenetic-driven downregulation of inhibitors like SFRP1, Dkk1 or Wif1 [36, 37]. Wnt/beta-catenin canonical pathway activation has been associated positively with increasing tumor grades and poor glioma patient survival [4, 38]. Wnt-independent mechanisms of beta-catenin activation also exist in glioma including the EGF/EGFR pathway [12]. Knowledge about beta-catenin regulation in glioma are recently increasing with R132H IDH1 mutation [39], FoxM1 [40], TRIM33 [41], HOXA13[42] as examples of positive or negative regulators. Based on our data, $\alpha 5\beta 1$ integrin has to be added to this growing list of beta-catenin regulators in glioma cells.

Expression level (mRNA and protein) of beta-catenin is considered as a negative prognostic marker

in glioma with an enhanced expression in glioblastoma [8, 38]. Interestingly we and others have shown that $\alpha 5$ integrin mRNA level is associated with high glioma grade and a bad patient prognosis [16]. In our current experiments, we have shown that variations in the $\alpha 5\beta 1$

integrin expression did not alter the basal level of beta-catenin protein but modulated an active conformation of beta-catenin (Figure 1). The antibodies we used in western blot experiments were described to specifically recognize a non-phosphorylated Ser37/Thr41 N-terminal beta-

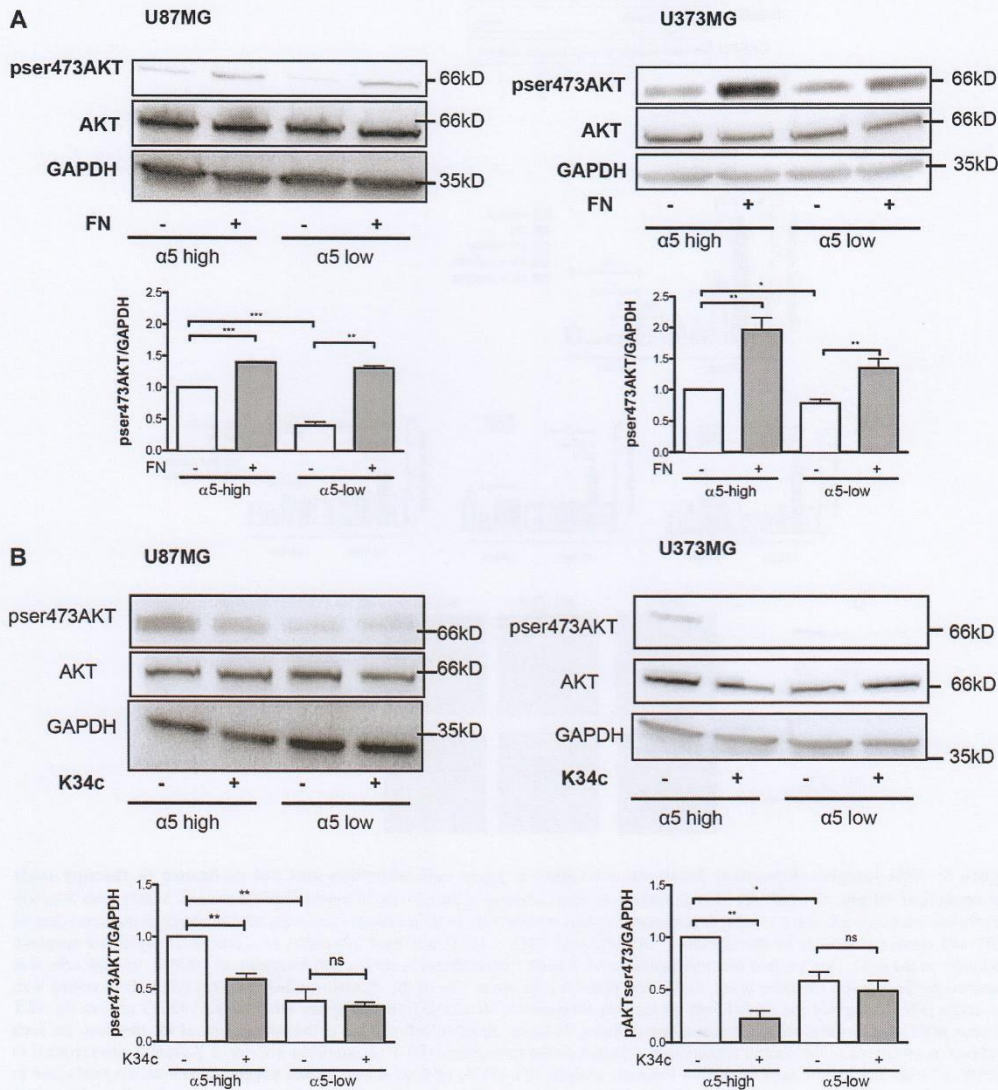


Figure 4: Expression of $\alpha 5\beta 1$ integrin modulates the activity of AKT in U87MG and U373MG cell lines. Western blot analysis of AKT activation in $\alpha 5$ high and $\alpha 5$ low glioma cells plated for 90 min on fibronectin-coated wells (10 μ g/ml) (A) or treated with K34c (20 μ M) (B). GAPDH was used as loading control. Histograms show the fold increase in active AKT as compared to those obtained on uncoated wells of at least three independent experiments. Data represent the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments with * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; ns, non-significant.

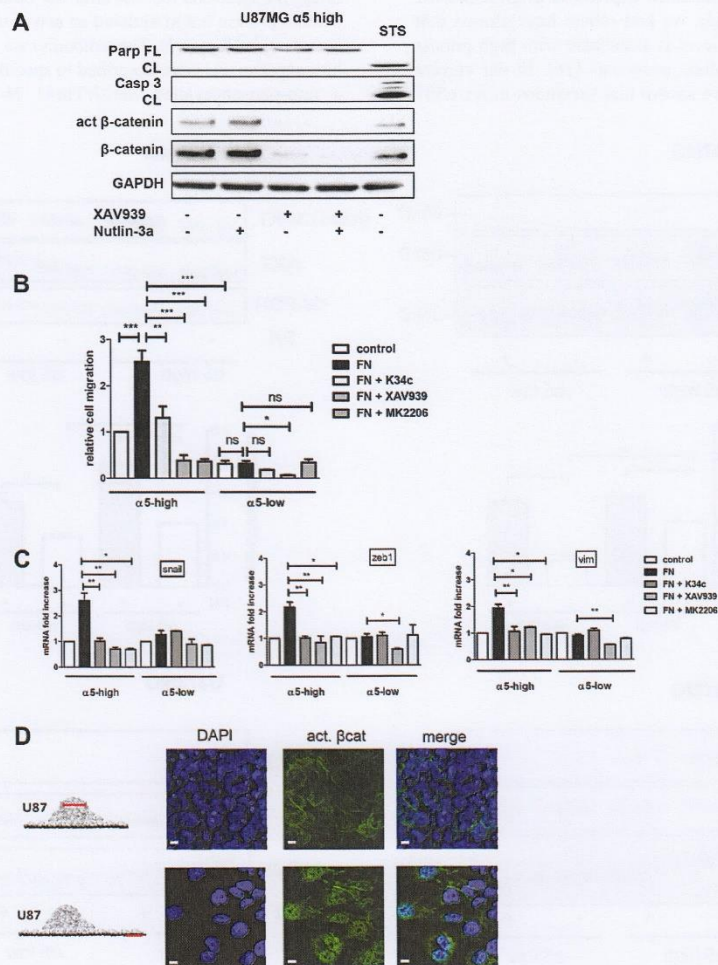


Figure 5: $\alpha 5\beta 1$ integrin-dependent β -catenin activation triggers cell migration and not resistance to therapy scale bar represent $10 \mu\text{m}$. (A) U87MG $\alpha 5$ -high cells were treated during 12 hours with Nutlin-3a (a p53 activator- $5 \mu\text{M}$), with XAV939 (a tankyrase inhibitor inducing β -catenin degradation - $1 \mu\text{M}$) or with both. Protein extracts were analyzed for apoptosis markers (cleaved PARP and cleaved caspase3) by immunoblots. Staurosporine (STS - $1 \mu\text{M}$) was used in parallel as a control of functional apoptotic machinery in the cells. One western blot representative of at least 3 experiments is shown. (B) Migration of U87MG $\alpha 5$ -high cells was examined by the Boyden Chamber assay. Cells were plated on the upper side of the chambers either uncoated (control) or coated with fibronectin (FN - $10 \mu\text{g/ml}$) and treated with the integrin antagonist K34c ($20 \mu\text{M}$), the tankyrase inhibitor XAV939 ($1 \mu\text{M}$) or the AKT inhibitor MK2206 ($20 \mu\text{M}$); migration was allowed during 24 hours. Relative cell number at the bottom side of the chamber, for each condition as compared to the control condition, is reported on the histograms. (C) Transcriptional activity of β -catenin was recorded in U87MG $\alpha 5$ -high and $\alpha 5$ -low cells by mRNA variation analysis (RT-qPCR) of downstream known targets of beta-catenin implicated in epithelial to mesenchymal transition (EMT), snail, zeb1, vimentin (vim). Cells were plated during 6 hours on uncoated wells as the control condition and compared with cells on fibronectin-coated wells ($10 \mu\text{g/ml}$) in the absence or presence of K34c ($20 \mu\text{M}$), XAV939 ($1 \mu\text{M}$) or MK2206 ($20 \mu\text{M}$). (D) Two-day-old U87MG- $\alpha 5$ high spheroids were plated on FN-coated ($10 \mu\text{g/ml}$) glass coverslips. 18 hours later, cells were fixed and active beta-catenin was immunodetected. Confocal images were taken at 2 different zones as depicted in the diagrams to examine (top images) cells in the tumor sphere at a focal plane $5 \mu\text{m}$ above the coverslips and (bottom images) cells that migrated away from the sphere. Data represent the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments with * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

catenin epitope generated upon Wnt signaling or GSK3 inhibition [27]. Our results thus suggest that $\alpha 5$ integrin may be involved in the stabilization of a fraction of beta-catenin in a non-degradable form. However, our data have also shown that $\alpha 5$ integrin overexpression alone did not allow the transcriptional activation of beta-catenin. Only integrin activation through fibronectin clearly provoked a beta-catenin transactivation. The specific implication of $\alpha 5\beta 1$ integrin in the fibronectin-dependent beta-catenin activation was further confirmed by using $\alpha 5$ -depleted cells and a specific $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonist, K34c. According to our data, we propose for the first time that $\alpha 5\beta 1$ integrin plays a dual role in glioma beta-catenin pathway, one presumably linked to its expression level resulting to a stabilization of beta-catenin and the other only achieved after integrin activation leading to beta-catenin transactivation. Further explorations are nevertheless needed to clearly define the fine tuning of this machinery and the potential contributions of Wnt-dependent and independent pathways. We can however already hypothesize that concomitant high expression of beta-catenin and $\alpha 5$ integrin in high grade glioma will strengthen their aggressiveness.

Among the hallmarks of glioblastoma, resistance to apoptosis and invasion into the normal brain are both implicated in their propensity to resist standard therapies. As reviewed in Schaffner et al. [43] and Blandin et al. [18], $\alpha 5\beta 1$ integrin has implications in both processes for various solid tumors. We have shown elsewhere that

$\alpha 5$ integrin-dependent pro-survival signaling depended on the AKT pathway [21]. Our present results show that this integrin-dependent AKT pathway is also involved in glioma cell migration (Figure 5). Phosphorylation of Ser552 on beta-catenin by AKT activation promotes its transcriptional activity [30] and accelerates migration and invasion [33]. We demonstrated here that $\alpha 5\beta 1$ integrin stimulation triggers both AKT and beta-catenin activation leading to cell migration, which are all inhibited by an integrin antagonist. Our data thus define a new $\alpha 5\beta 1$ integrin/AKT/beta-catenin pathway implicated in glioma cell migration. A point of intersection between integrin pro-survival or pro-migratory pathways is therefore achieved through AKT (Figure 6) which is largely involved in glioma malignancy [44]. Interestingly, in our experimental conditions, molecular determinants for these pathways diverge as reducing beta-catenin expression by XAV939 did not synergize with the p53 activator, Nutlin-3a, to induce apoptosis (Figure 5A). Data are in line with those of Kahlert et al. [9], showing that activation of canonical Wnt/beta-catenin in glioma cells (including U87MG cells) enhances *in vitro* motility but not proliferation. Interestingly, these authors also showed that nuclear (active) beta-catenin was predominantly found in the infiltrative zone of glioblastoma supporting its role in cell migration *in vivo*.

In solid tumors, acquisition of a migratory phenotype is often the result of an epithelial to mesenchymal transition (EMT). EMT-like processes

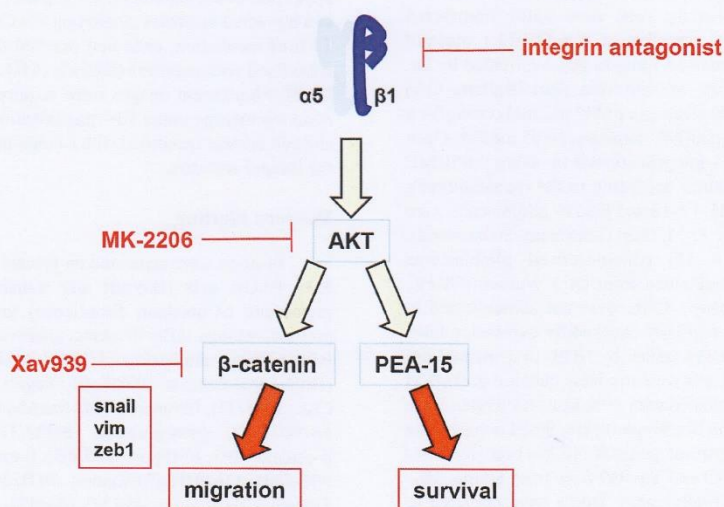


Figure 6: Schematic representation of the $\alpha 5\beta 1$ integrin/AKT pathway in glioma cells. The $\alpha 5\beta 1$ integrin overexpression or activation induces the activation of AKT. We have shown recently that AKT modulates the PEA-15 anti-apoptotic protein to impair the p53-induced pro-apoptotic pathway [21]. According to the present work, we now have shown that activation of $\alpha 5\beta 1$ integrin by fibronectin also led to AKT activation followed by transactivation of beta-catenin, induction of an EMT-like program and an increase in cell migration.

in glioma (of non-epithelial origin) have recently been described [45] and a “mesenchymal transition metagene” proposed, which included fibronectin, the ligand of $\alpha 5\beta 1$ integrin [46]. A mesenchymal subtype of glioblastoma was associated with aggressiveness and disease progression as reported in integrated genomic analysis [47, 48]. Our study clearly shows that an EMT-like transition is obtained by fibronectin-dependent activation of $\alpha 5\beta 1$ integrin in glioma cells as known EMT activators (snail, zeb1) or markers (vim) are increased under the control of beta-catenin and decreased by the integrin antagonist K34c. Interestingly, $\alpha 5$ integrin was part of a six mesenchymal gene signature in carcinoma EMT [49]. Similarly, recent works highlighted the regulation of beta-catenin signaling by $\alpha 2/\alpha 3\beta 1$ integrin clustering in epithelial ovarian carcinoma resulting in increased invasion and metastasis [22, 50]. Promotion of EMT was also assigned to $\alpha 9\beta 1$ integrin in colon and lung carcinoma [25]. Our data thus add new evidences that $\beta 1$ subunit-containing integrins play a crucial role in EMT induction and migration of tumoral cells out of the primary tumor site even in glioma.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and compounds

U87MG and U373MG cells were obtained from ATCC and ECACC respectively several years ago. Cells were manipulated genetically to overexpress (U87MG- and U373MG- $\alpha 5$ high cells) or repress (U87MG- and U373MG- $\alpha 5$ low cells) the $\alpha 5$ integrin subunit as described earlier [16, 21]. Briefly, cells were stably transfected to overexpress (by transfecting a pcDNA3.1 plasmid containing the human $\alpha 5$ integrin gene; provided by Dr. Ruoshlati, University of California, Santa Barbara, CA) or to repress [by transfecting a pSM2 plasmid coding for a short hairpin RNA (shRNA) targeting the $\alpha 5$ mRNA; Open Biosystems] the $\alpha 5$ integrin subunit by using jetPRIME (Polyplus transfection) according to the manufacturer’s instructions. LN443, LN18 and LN319 glioma cells were kindly provided by Pr M. Hegi (Lausanne, Switzerland). Early passage (< 10) patient-derived glioblastoma cell line T20 was obtained from Dr J. Nuesch (DKFZ, Heidelberg, Germany). Cells were not authenticated in the laboratory but regularly checked for expression level of $\alpha 5$ integrin and p53 status (by NGS) to compare with the original cells. Cells were routinely cultured in DMEM or EMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, and 200IU/mL penicillin/streptomycin. Small non peptidic specific $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonist K34C has been described elsewhere [19]. LiCl and Xav939 were from Sigma. MK-2206 was from CliniSciences. Drugs were prepared as stock solutions in DMSO at 10 mM and kept at -20°C until use. DAPI was purchased from Santa Cruz Biotechnology. Human fibronectin stabilized solution was kindly provided by Pr Carreiras, (EA1391, Cergy Pontoise). Vitronectin was a gift from Pr J. Luis (Marseille, France). Collagen,

laminin and poly-L-Lysine were from Sigma. Cell culture medium and reagents were from Lonza.

Cell handling

To measure basal levels of signaling pathways (i.e. in conditions where integrins are not exogenously activated by serum components), trypsinized cells were washed 3 times in serum free medium by centrifugation and then plated (200,000 cells/well, 6-well plastic plates) in the presence of drugs or controls (DMSO 0.2%). When required, cells were plated on substrate-coated dishes (fibronectin, vitronectin, collagen, laminin or poly-L-lysine - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated for 90 minutes (western blot analysis) or 6 hours (RTq-PCR analysis) in a humidified incubator containing 5% CO_2 at 37°C.

Migration assay

Cell migration was analyzed by a Boyden Chamber assay using an 8 μm pore size Transwell permeable support (24-well Transwell plates, Millipore). The bottom part of the Transwell membrane was either uncoated or coated with fibronectin. Fibronectin coating (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in phosphate buffer saline) was achieved at 37°C in a CO_2 incubator for 3 hours. The coated and uncoated chambers were then placed in the 24-well plates filled with respective culture medium supplemented with the drugs as required. Cells (1×10^4 cells/chamber) in culture medium containing or not the required drugs were seeded into the upper part of the chamber and the plates were transferred in a humidified incubator containing 5% CO_2 at 37°C. After 24 h of incubation, cells that reached the bottom layer were fixed with paraformaldehyde (4%) and stained with DAPI. Fluorescent images were acquired under a Zeiss Axio microscope under 10 \times magnification (6 views field) and cell number quantified with a home-made macro using the ImageJ software.

Western blotting

Proteins were separated on precast gradient 4–20% SDS PAGE gels (Biorad) and transferred to PVDF membrane (Amersham Bioscience) under established protocol settings. After blocking, membranes were probed with primary antibodies (1/1000) against $\alpha 5$ integrin (HI04-Santa-Cruz; sc-10729), $\beta 1$ integrin (TS2/16 - Santa-Cruz; sc53711), fibronectin (BD transduction laboratories; #610077), (non-phospho Ser33/37/Thr41) active β -catenin (8E7, Millipore; #05665), β -catenin (Millipore. #06-734), GAPDH (Millipore; #AB2302), AKT (Cell Signaling Technology; #9272), pSer473-AKT (D9E; Cell Signaling Technology; #4060), vimentin (Santa-Cruz; sc-6260), cleaved caspase 3 (Cell Signaling Technology; #9604) and PARP (BD transduction laboratories; #556494) antibodies. Immunological complexes were revealed with HRP-conjugated secondary antibodies (Promega) at 1/10

000 dilution using chemoluminescence (ECL, Biorad) and visualized with Las4000 image analyser (GE Healthcare). Quantification of non-saturated images was performed with ImageJ software. GAPDH was used as the loading control for all samples.

Real-time PCR analysis

RNA extracted with RNeasy minikit (Qiagen), according to the manufacturer protocol, was transcribed into cDNA using the high capacity cDNA kit (Applied Biosystem). Real time quantitative PCR was performed using the Fast SYBR Green Master Mix and the StepOne Plus Real time PCR system (Applied Biosystem) (for primer sequences, see Supplementary Table S1). Target cDNA expression was quantified using the comparative $\Delta\Delta C_t$ method with GAPDH or cyclophilin as internal controls with similar results.

TCF/LEF luciferase reporter assay

Cells plated were transiently transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with a mixture of an inducible transcription factor responsive firefly luciferase reporter vector or a non inducible vector and a constitutively expressing Renilla construct to normalize for transfection efficiency (Cignal reporter assay kit, Qiagen). Three independent transfections were performed. Following transfection, cells in serum free medium were plated on uncoated or fibronectin-coated wells during 3, 6, 12, 24 or 48 hours. Lysates were harvested, and luciferase activities were recorded with a Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. Luciferase activity was monitored with a Multidetector Microplate Reader (TriStar² LB 942 – Berthold Technologies).

Spheroids formation and immunolabeling

Spheroids were formed and analysed as described in Blandin et al. [34]. Briefly, single cell suspension was generated from trypsinized monolayers and diluted at the desired cell density. Cell suspension was mixed in EMEM/10%FBS containing 20% of methylcellulose. Cell spheroids were formed by the hanging drop method (25 μ L, 2000 cells per sphere). Two-day-old spheroids were seeded on fibronectin-coated glass coverslips for 18 hours. Cells were then fixed in 3.7% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.1% Triton-X100. After a 1 hour blocking step using TBS-BSA 3% solution, cells were incubated with anti-active beta-catenin primary antibody O/N at 4°C (2 μ g/mL in TBS-BSA 3%) and secondary antibody (Alexafluor 488 goat anti-mouse IgG - #A11001, Life Technologies) and DAPI for 1 hour. Spheroids were mounted on microscope slides using Permafluor Aqueous Mounting Medium (Fisher). Images were acquired

using a confocal microscope (LEICA TCS SPE II, 60 \times magnification oil-immersion).

Statistical analysis

Data are represented as the mean \pm SEM, and n is the number of independent experiments. Statistical analyses were conducted using the Student *t* test with the GraphPad Prism program. *P* < 0.05 was considered significant.

CONCLUSIONS

Taken together, our results show for the first time that the $\alpha 5\beta 1$ integrin modulates the beta-catenin pathway in glioma to sustain an EMT-like based migratory program. In addition with our previous results, the interplay we describe here highlights the potential pivotal role of the $\alpha 5\beta 1$ integrin in hallmarks of brain tumors, i.e. resistance to apoptosis and invasion in the normal brain. Antagonists of this specific integrin may thus be proposed as new options for helping to block both processes in subpopulations of high grade glioma.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Pr HEGI (Lausanne, Switzerland) for the LN series of glioma cells and Dr Nuesch (Heidelberg, Germany) for the T20 cell line.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

FUNDING

Work was supported by the University of Strasbourg, the Ligue Contre le Cancer (CCIR Grand Est), by the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer, by the Cancéropole Grand Est, by the Region Alsace. Guillaume Renner is a predoctoral fellow from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Marie-Cécile Mercier is a predoctoral fellow from the French Agence Régionale de la Santé.

REFERENCES

1. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 2012; 149:1192–205. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.012.
2. Yang K, Wang X, Zhang H, Wang Z, Nan G, Li Y, Zhang F, Mohammed MK, Haydon RC, Luu HH, Bi Y, He T-C. The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies. *Laboratory Investigation*. 2016; 96:116–36. doi: 10.1038/labinvest.2015.144.

3. Polakis P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012; 4. doi: 10.1101/cshperspect.a008052.
4. Sareddy GR, Panigrahi M, Challa S, Mahadevan A, Babu PP. Activation of Wnt/beta-catenin/Tcf signaling pathway in human astrocytomas. *Neurochemistry International*. 2009; 55:307–17. doi: 10.1016/j.neuint.2009.03.016.
5. Denysenko T, Annovazzi L, Cassoni P, Melcarne A, Mellai M, Schiffer D. WNT/ β -catenin Signaling Pathway and Downstream Modulators in Low- and High-grade Glioma. *Cancer Genomics & Proteomics*. 2016; 13:31–45.
6. Lee Y, Lee J-K, Ahn SH, Lee J, Nam D-H. WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities. *Laboratory Investigation*. 2016; 96:137–50. doi: 10.1038/labinvest.2015.140.
7. Nager M, Bhardwaj D, Cantí C, Medina L, Nogués P, Herreros J. β -Catenin Signalling in Glioblastoma Multiforme and Glioma-Initiating Cells. *Chemotherapy Research and Practice*. 2012; 2012:192362. doi: 10.1155/2012/192362.
8. Yang C, Iyer RR, Yu ACH, Yong RL, Park DM, Weil RJ, Ikejiri B, Brady RO, Lonser RR, Zhuang Z. β -Catenin signaling initiates the activation of astrocytes and its dysregulation contributes to the pathogenesis of astrocytomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109:6963–8. doi: 10.1073/pnas.1118754109.
9. Kahlert UD, Maciaczyk D, Doostkam S, Orr BA, Simons B, Bogiel T, Reithmeier T, Prinz M, Schubert J, Niedermann G, Brabletz T, Eberhart CG, Nikkhah G, et al. Activation of canonical WNT/ β -catenin signaling enhances *in vitro* motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Letters*. 2012; 325:42–53. doi: 10.1016/j.canlet.2012.05.024.
10. Kaur N, Chettiar S, Rathod S, Rath P, Muzumdar D, Shaikh ML, Shiras A. Wnt3a mediated activation of Wnt/ β -catenin signaling promotes tumor progression in glioblastoma. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 2013; 54:44–57. doi: 10.1016/j.mcn.2013.01.001.
11. Yang W, Xia Y, Ji H, Zheng Y, Liang J, Huang W, Gao X, Aldape K, Lu Z. Nuclear PKM2 regulates β -catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature*. 2011; 480:118–22. doi: 10.1038/nature10598.
12. Ji H, Wang J, Nika H, Hawke D, Keezer S, Ge Q, Fang B, Fang X, Fang D, Litchfield DW, Aldape K, Lu Z. EGF-induced ERK activation promotes CK2-mediated disassociation of alpha-Catenin from beta-Catenin and transactivation of beta-Catenin. *Molecular Cell*. 2009; 36:547–59. doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.034.
13. Paul I, Bhattacharya S, Chatterjee A, Ghosh MK. Current Understanding on EGFR and Wnt/ β -Catenin Signaling in Glioma and Their Possible Crosstalk. *Genes Cancer*. 2013; 4:427–46. doi: 10.1177/1947601913503341.
14. Kim Y, Kim KH, Lee J, Lee Y-A, Kim M, Lee SJ, Park K, Yang H, Jin J, Joo KM, Lee J, Nam D-H. Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. *Laboratory Investigation*. 2012; 92:466–73. doi: 10.1038/labinvest.2011.161.
15. Wickström M, Dyberg C, Milosevic J, Einvik C, Calero R, Sveinbjörnsson B, Sandén E, Darabi A, Siesjö P, Kool M, Kogner P, Baryawno N, Johnsen JI. Wnt/ β -catenin pathway regulates MGMT gene expression in cancer and inhibition of Wnt signalling prevents chemoresistance. *Nature Communications*. 2015; 6:8904. doi: 10.1038/ncomms9904.
16. Janouskova H, Maglott A, Leger DY, Bossert C, Noulet F, Guerin E, Guenot D, Pinel S, Chastagner P, Plenat F, Entz-Werle N, Lehmann-Che J, Godet J, et al. Integrin $\alpha 5 \beta 1$ plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma. *Cancer Research*. 2012; 72:3463–70. doi: 10.1158/0008-5472.can-11-4199.
17. Holmes KM, Annala M, Chua CYX, Dunlap SM, Liu Y, Hugen N, Moore LM, Cogdell D, Hu L, Nykter M, Hess K, Fuller GN, Zhang W. Insulin-like growth factor-binding protein 2-driven glioma progression is prevented by blocking a clinically significant integrin, integrin-linked kinase, and NF- κ B network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109:3475–80. doi: 10.1073/pnas.1120375109.
18. Blandin A-F, Renner G, Lehmann M, Lelong-Rebel I, Martin S, Dontenwill M. $\beta 1$ Integrins as Therapeutic Targets to Disrupt Hallmarks of Cancer. *Frontiers in Pharmacology*. 2015; 6:279. doi: 10.3389/fphar.2015.00279.
19. Ray A-M, Schaffner F, Janouskova H, Noulet F, Rognan D, Lelong-Rebel I, Choulier L, Blandin A-F, Lehmann M, Martin S, Kapp T, Neubauer S, Rechenmacher F, et al. Single cell tracking assay reveals an opposite effect of selective small non-peptidic $\alpha 5 \beta 1$ or $\alpha \beta 3 / \beta 5$ integrin antagonists in U87MG glioma cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2014; 1840:2978–87. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.04.024.
20. Martinkova E, Maglott A, Leger DY, Bonnet D, Stiborova M, Takeda K, Martin S, Dontenwill M. $\alpha 5 \beta 1$ integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells. *International Journal of Cancer*. 2010; 127:1240–8. doi: 10.1002/ijc.25187.
21. Renner G, Janouskova H, Noulet F, Koenig V, Guerin E, Bär S, Nuesch J, Rechenmacher F, Neubauer S, Kessler H, Blandin AF, Choulier L, Etienne-Selloum N, et al. Integrin $\alpha 5 \beta 1$ and p53 convergent pathways in the control of anti-apoptotic proteins PEA-15 and survivin in high-grade glioma. *Cell Death and Differentiation*. 2016; 23:640–53. doi: 10.1038/cdd.2015.131.
22. Burkhalter RJ, Symowicz J, Hudson LG, Gottardi CJ, Stack MS. Integrin regulation of beta-catenin signaling in ovarian carcinoma. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286:23467–75. doi: 10.1074/jbc.M110.199539.

23. Novak A, Hsu SC, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Papkoff J, Montesano R, Roskelley C, Grosschedl R, Dedhar S. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998; 95:4374–9.
24. Ridgway RA, Serrels B, Mason S, Kinnaid A, Muir M, Patel H, Muller WJ, Sansom OJ, Brunton VG. Focal adhesion kinase is required for β -catenin-induced mobilization of epidermal stem cells. *Carcinogenesis*. 2012; 33:2369–76. doi: 10.1093/carcin/bgs284.
25. Gupta SK, Oommen S, Aubry MC, Williams BP, Vlahakis NE. Integrin α 5 β 1 promotes malignant tumor growth and metastasis by potentiating epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*. 2013; 32:141–50. doi: 10.1038/onc.2012.41.
26. Saidak Z, Le Henaff C, Azzi S, Marty C, Da Nascimento S, Sonnet P, Marie PJ. Wnt/ β -catenin signaling mediates osteoblast differentiation triggered by peptide-induced α 5 β 1 integrin priming in mesenchymal skeletal cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015; 290:6903–12. doi: 10.1074/jbc.M114.621219.
27. van Noort M, Meeldijk J, van der Zee R, Destree O, Clevers H. Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277:17901–5. doi: 10.1074/jbc.M111635200.
28. Crampton SP, Wu B, Park EJ, Kim J-H, Solomon C, Waterman ML, Hughes CCW. Integration of the beta-catenin-dependent Wnt pathway with integrin signaling through the adaptor molecule Grb2. *PLoS One*. 2009; 4:e7841. doi: 10.1371/journal.pone.0007841.
29. Huang S-MA, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiethe E, Zhang Y, Wiessner S, Hill M, Shi X, Wilson CJ, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*. 2009; 461:614–20. doi: 10.1038/nature08356.
30. Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282:11221–9. doi: 10.1074/jbc.M611871200.
31. Han L, Yang Y, Yue X, Huang K, Liu X, Pu P, Jiang H, Yan W, Jiang T, Kang C. Inactivation of PI3K/AKT signaling inhibits glioma cell growth through modulation of β -catenin-mediated transcription. *Brain Research*. 2010; 1366:9–17. doi: 10.1016/j.brainres.2010.09.097.
32. Li C, Zhou C, Wang S, Feng Y, Lin W, Lin S, Wang Y, Huang H, Liu P, Mu Y-G, Shen X. Sensitization of glioma cells to tamoxifen-induced apoptosis by PI3-kinase inhibitor through the GSK-3 β / β -catenin signaling pathway. *PLoS One*. 2011; 6:e27053. doi: 10.1371/journal.pone.0027053.
33. Zhang X, Chen T, Zhang J, Mao Q, Li S, Xiong W, Qiu Y, Xie Q, Ge J. Notch1 promotes glioma cell migration and invasion by stimulating β -catenin and NF- κ B signaling via AKT activation. *Cancer Science*. 2012; 103:181–90. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02154.x.
34. Blandin AF, Noulet F, Renner G, Mercier MC, Choulier L, Vauchelles R, Ronde P, Carreiras F, Etienne-Selloum N, Vereb G, Lelong-Rebel I, Martin S, Dontenwill M, et al. Glioma cell dispersion is driven by alpha5 integrin-mediated cell-matrix and cell-cell interactions. *Cancer Lett*. 2016; 8:30220–8.
35. Schüle R, Dictus C, Campos B, Wan F, Felsberg J, Ahmadi R, Centner F-S, Grabe N, Reifenberger G, Bermejo JL, Unterberg A, Herold-Mende C. Potential canonical wnt pathway activation in high-grade astrocytomas. *TheScientificWorldJournal*. 2012; 2012:697313. doi:10.1100/2012/697313.
36. Kierulf-Vieira KS, Sandberg CJ, Grieg Z, Günther C-C, Langmoen IA, Vik-Mo EO. Wnt inhibition is dysregulated in gliomas and its re-establishment inhibits proliferation and tumor sphere formation. *Experimental Cell Research*. 2016; 340:53–61. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.12.010.
37. Foltz G, Yoon J-G, Lee H, Ma L, Tian Q, Hood L, Madan A. Epigenetic regulation of wnt pathway antagonists in human glioblastoma multiforme. *Genes Cancer*. 2010; 1:81–90. doi: 10.1177/1947601909356103.
38. Rossi M, Magnoni L, Miracco C, Mori E, Tosi P, Pirtoli L, Tini P, Oliveri G, Cosci E, Bakker A. β -catenin and Gli1 are prognostic markers in glioblastoma. *Cancer Biology & Therapy*. 2011; 11:753–61.
39. Cui D, Ren J, Shi J, Feng L, Wang K, Zeng T, Jin Y, Gao L. R132H mutation in IDH1 gene reduces proliferation, cell survival and invasion of human glioma by downregulating Wnt/ β -catenin signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2016; 73:72–81. doi: 10.1016/j.biocel.2016.02.007.
40. Zhang N, Wei P, Gong A, Chiu W-T, Lee H-T, Colman H, Huang H, Xue J, Liu M, Wang Y, Sawaya R, Xie K, Yung WKA, et al. FoxM1 promotes β -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2011; 20:427–42. doi: 10.1016/j.ccr.2011.08.016.
41. Xue J, Chen Y, Wu Y, Wang Z, Zhou A, Zhang S, Lin K, Aldape K, Majumder S, Lu Z, Huang S. Tumour suppressor TRIM33 targets nuclear β -catenin degradation. *Nature Communications*. 2015; 6:6156. doi: 10.1038/ncomms7156.
42. Duan R, Han L, Wang Q, Wei J, Chen L, Zhang J, Kang C, Wang L. HOXA13 is a potential GBM diagnostic marker and promotes glioma invasion by activating the Wnt and TGF- β pathways. *Oncotarget*. 2015; 6:27778–93. doi: 10.18632/oncotarget.4813.
43. Schaffner F, Ray AM, Dontenwill M. Integrin α 5 β 1, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors. *Cancers*. 2013; 5:27–47. doi: 10.3390/cancers5010027.
44. Chautard E, Ouédraogo ZG, Biau J, Verrelle P. Role of Akt in human malignant glioma: from oncogenesis to tumor aggressiveness. *Journal of Neuro-Oncology*. 2014; 117:205–15. doi: 10.1007/s11060-014-1382-9.

45. Kahlert UD, Nikkhah G, Maciaczyk J. Epithelial-to-mesenchymal(-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. *Cancer Letters*. 2013; 331:131–8. doi: 10.1016/j.canlet.2012.12.010.
46. Cheng W-Y, Kandel JJ, Yamashiro DJ, Canoll P, Anastassiou D. A multi-cancer mesenchymal transition gene expression signature is associated with prolonged time to recurrence in glioblastoma. *PLoS One*. 2012; 7:e34705. doi: 10.1371/journal.pone.0034705.
47. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O’Kelly M, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010; 17:98–110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.
48. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006; 9:157–73. doi: 10.1016/j.ccr.2006.02.019.
49. Huang RY-J, Kuay KT, Tan TZ, Asad M, Tang HM, Ng AHC, Ye J, Chung VY, Thiery JP. Functional relevance of a six mesenchymal gene signature in epithelial-mesenchymal transition (EMT) reversal by the triple angiokinase inhibitor, nintedanib (BIBF1120). *Oncotarget*. 2015; 6:22098–113. doi: 10.18632/oncotarget.4300.
50. Burkhalter RJ, Westfall SD, Liu Y, Stack MS. Lysophosphatidic Acid Initiates Epithelial to Mesenchymal Transition and Induces β -Catenin-mediated Transcription in Epithelial Ovarian Carcinoma. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015; 290:22143–54. doi: 10.1074/jbc.M115.641092.

II. Article 2

Blandin, A.-F., Noulet, F., Renner, G., **Mercier, M.-C.**, Choulier, L., Vauchelles, R., Ronde, P., Carreiras, F., Etienne-Selloum, N., Vereb, G., Lelong-Rebel, I., Martin, S., Dontenwill, M. and Lehmann, M. (2016). **Glioma cell dispersion is driven by $\alpha 5$ integrin-mediated cell matrix and cell-cell interactions.** *Cancer Lett.* 376, 328-338.

Comme nous l'avons montré, l'interaction de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et de la fibronectine participe à l'invasion des cellules de glioblastomes. Pourtant les données de la littérature apportent des hypothèses contradictoires. En accord avec nos travaux, certaines études montrent l'implication de l'intégrine et de la fibronectine dans la dissémination cellulaire, tandis que d'autres démontrent que le couple $\alpha 5 \beta 1$ /fibronectine régule la cohésion cellulaire. Cette étude permet de clarifier cette action opposée de l'intégrine $\alpha 5$ en s'intéressant à l'évasion cellulaire à partir d'un sphéroïde.

Les résultats ont mis en évidence l'implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la formation de sphéroïdes à partir de lignées cellulaires établies (U87MG, U373MG...) et dans les interactions entre cellules. Dans un environnement pauvre en fibronectine, les cellules présentes dans la sphère tumorale restent cohésives. En revanche, dans un microenvironnement riche en fibronectine, l'intégrine $\alpha 5$ induit la dispersion cellulaire à partir du sphéroïde. Ainsi, la concentration en fibronectine dans l'environnement tumoral régule les interactions entre les cellules ou les interactions avec l'ECM. Afin d'apporter une meilleure compréhension du rôle de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ dans la cohésion cellulaire ou la dissémination cellulaire, la distribution de l'intégrine et de la fibronectine au sein de sphéroïdes a été analysée par imagerie confocale. Dans les sphéroïdes, l'immunomarquage de l'intégrine et de la fibronectine présente un aspect fibrillaire. Lorsque les cellules s'évadent de la sphère, les fibrilles de fibronectine disparaissent et l'expression de l'intégrine se redistribue au niveau des sites d'adhésion à la matrice, entraînant progressivement la formation de contacts focaux. Ceux-ci présentent un marquage de la sous-unité $\alpha 5$ et de la protéine FAK active.

Ces travaux soulèvent la complexité du rôle de l'intégrine $\alpha 5$ et de la fibronectine dans le GBM. En accord avec cette étude, mes travaux de thèse ont mis en évidence la dépendance des cellules dérivées de patients exprimant l'intégrine à migrer dans un environnement riche en fibronectine. Mes résultats suggèrent également que les cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5$ participent à la croissance de la sphère tumorale. L'ensemble de ces données suggère un rôle bivalent de l'intégrine $\alpha 5$ où elle régule la migration cellulaire en présence de fibronectine et l'expansion tumorale dans un microenvironnement pauvre en fibronectine. L'analyse de banques de données montrent que les foyers hypoxiques et nécrotiques sont riches en fibronectine et en cellules présentant un taux d'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ élevé. Plusieurs études montrent également une corrélation entre la présence de nécrose et une faible survie. A partir de l'ensemble de ces données, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'intégrine $\alpha 5$ exprimée par les cellules tumorales localisées dans des foyers nécrotiques riches en fibronectine induit la migration cellulaire, participe à la formation de la récurrence et entraîne une faible survie. Ainsi l'inhibition de l'intégrine $\alpha 5$ est une stratégie pertinente pour limiter l'invasion du parenchyme sain et la formation de certaines formes de récurrences.



Contents lists available at ScienceDirect

Cancer Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/canlet

Original Articles

Glioma cell dispersion is driven by $\alpha 5$ integrin-mediated cell–matrix and cell–cell interactions

Anne-Florence Blandin ^a, Fanny Noulet ^a, Guillaume Renner ^a, Marie-Cécile Mercier ^a, Laurence Choulier ^a, Romain Vauchelles ^a, Philippe Ronde ^a, Franck Carreiras ^{a,b}, Nelly Etienne-Selloum ^a, Gyorgy Vereb ^{a,c}, Isabelle Lelong-Rebel ^a, Sophie Martin ^a, Monique Dontenwill ^a, Maxime Lehmann ^{a,*}

^a Integrins and Cancer, Faculté de Pharmacie, UMR7213 CNRS, LBP, Tumoral Signaling and Therapeutic Targets Department, Université de Strasbourg, Illkirch, France

^b Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire Cellules, ERRMECe (EA 1391), Institut des Matériaux, Université de Cergy-Pontoise, France

^c Department of Biophysics and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 January 2016

Received in revised form 1 April 2016

Accepted 4 April 2016

Keywords:

Glioblastoma

Integrin

Fibronectin

Focal adhesion kinase

Migration

ABSTRACT

Glioblastoma multiform (GBM) is the most common and most aggressive primary brain tumor. The fibronectin receptor, $\alpha 5$ integrin is a pertinent novel therapeutic target. Despite numerous data showing that $\alpha 5$ integrin support tumor cell migration and invasion, it has been reported that $\alpha 5$ integrin can also limit cell dispersion by increasing cell–cell interaction. In this study, we showed that $\alpha 5$ integrin was involved in cell–cell interaction and gliomasphere formation. $\alpha 5$ -mediated cell–cell cohesion limited cell dispersion from spheroids in fibronectin-poor microenvironment. However, in fibronectin-rich microenvironment, $\alpha 5$ integrin promoted cell dispersion. Ligand-occupied $\alpha 5$ integrin and fibronectin were distributed in fibril-like pattern at cell–cell junction of evading cells, forming cell–cell fibrillar adhesions. Activated focal adhesion kinase was not present in these adhesions but was progressively relocated with $\alpha 5$ integrin as cell migrates away from the spheroids. $\alpha 5$ integrin function in GBM appears to be more complex than previously suspected. As GBM overexpressed fibronectin, it is most likely that *in vivo*, $\alpha 5$ -mediated dissemination from the tumor mass overrides $\alpha 5$ -mediated tumor cell cohesion. In this respect, $\alpha 5$ -integrin antagonists may be useful to limit GBM invasion in brain parenchyma.

© 2016 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Introduction

Glioblastoma multiform (GBM, grade IV astrocytoma) is the most frequent and most aggressive brain cancer. Despite surgical resection, radiotherapy and concomitant chemotherapy, median survival for a patient with high grade glioma does not exceed 15 months. GBM is characterized by a diffuse infiltration of the brain tissue by tumor cells. This highly invasive phenotype prevents complete surgical resection, limits the efficiency of radiotherapy and is a critical prognostic factor for primary brain tumors. The establishment of efficient therapies requires a better understanding of the infiltrative behavior of glioma cells and the development of new strategies targeting cell invasion [1,2]. *In situ*, glioma cells individually infiltrate the brain tissue either by migrating along the blood vessels or by invading the parenchymal tissue [3,4]. Invasion is modulated by regional expression of extracellular matrix (ECM) molecules [5,6]. Some ECM proteins are overexpressed in human brain tumors

and their upregulation correlates with disease progression and worse prognosis. Comparison of gene expression in invasive GBM versus non-invasive pilocytic astrocytoma using suppressive hybridization identified fibronectin (FN) as one of the most overexpressed gene in GBM [7]. FN accumulates around neovasculature [8,9] and into tumor ECM as dense linear strands of assembled FN surrounding cancer cells [10–13]. FN supports tumor growth [14] and is unequivocally capable of mediating glioma cell motility and promoting invasion [11,13,15].

As primary receptors involved in cell–matrix adhesion, integrins bidirectionally link the ECM with the intracellular signaling network. They profoundly impact on tumor cell proliferation, survival and invasion, and trigger resistance to radio- and chemo-therapy [16]. In human brain, the FN receptor, $\alpha 5 \beta 1$ integrin, is expressed at significantly higher level in GBM than in adjacent normal tissue [17]. We [18,19] and others [20–22] recently confirmed these data in larger cohorts of patients and showed that a high expression of $\alpha 5 \beta 1$ integrin is associated with a worse prognosis. Preclinical data support the ability of $\alpha 5 \beta 1$ integrin antagonists to disrupt integrin signaling pathways leading to inhibition of angiogenesis and/or tumor growth but also to sensitization toward therapies [23]. Depletion

* Corresponding author. Tel.: +33 368854267; fax: +33 368854313.

E-mail address: Maxime.Lehmann@unistra.fr (M. Lehmann).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.04.007>

0304-3835/© 2016 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Please cite this article in press as: Anne-Florence Blandin, Fanny Noulet, Guillaume Renner, Marie-Cécile Mercier, Laurence Choulier, Romain Vauchelles, Philippe Ronde, Franck Carreiras, Nelly Etienne-Selloum, Gyorgy Vereb, Isabelle Lelong-Rebel, Sophie Martin, Monique Dontenwill, Maxime Lehmann, Glioma cell dispersion is driven by $\alpha 5$ integrin-mediated cell–matrix and cell–cell interactions, Cancer Letters (2016), doi: 10.1016/j.canlet.2016.04.007

of $\alpha 5$ integrin increased p53 activity and sensitized cells to chemotherapeutic agents [19,24]. Moreover $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists facilitated chemotherapy-induced apoptosis in human glioma cells [24,25]. Collectively, these data establish $\alpha 5\beta 1$ integrin as a promising target in GBM. $\alpha 5$ integrin mediates fibronectin assembly, an essential process that regulates cell morphology, growth and motility [26]. On 2D cell culture, fibrillogenesis is initiated by $\alpha 5$ integrin in cell-substratum adhesion sites called fibrillar adhesion (FBs). FBs are functionally and molecularly distinct from the classical focal adhesion (FAs) as they did not contain activated FAK (focal adhesion kinase) or other FAs proteins such as paxillin or vinculin [27,28]. Drug-mediated inhibition of FN fibrillogenesis sensitizes glioma cells to chemotherapy *in vitro* and *in vivo* [12]. Fibrillar FN/ $\alpha 5$ axis may thus play a pivotal role in glioma resistance to therapy and invasion.

Using single cell tracking assays, we showed that expression of $\alpha 5$ integrin in U87MG cells increased cell migration speed, which could be inhibited by the use of specific non-peptidic antagonists of $\alpha 5\beta 1$ integrin [29,30]. However, other reports showed that $\alpha 5\beta 1$ and fibrillary FN can promote cell/cell cohesion in various tissue [13,31–33] and may impair glioma cell dispersion [32]. This observation point out a potential anti-invasive role for $\alpha 5\beta 1$ and cell-mediated FN assembly. This may raise an important issue concerning the development of anti-invasive therapeutic strategies that target $\alpha 5\beta 1$ integrin.

In the present work, we showed that $\alpha 5$ -mediated cell-cell interaction can counteract cell dissemination only if fibronectin is absent from tumor cell microenvironment. We observed that in cells collectively emerging from the spheroid, $\alpha 5$ integrin delineated plasma membrane in a fibrillar-like pattern and is associated with a dense FN fibril network. Importantly, activated FAK (pFAK-tyr397) was not recruited by $\alpha 5$ integrin in these cell-cell fibrillar adhesions. As cells moved away from the spheroids, $\alpha 5$ became strictly engaged in cell-substratum adhesion sites, where it progressively recruited pFAK-tyr397. In conclusion, our data indicate that in GBM $\alpha 5$ integrin may have different function and that glioma cell invasion is regulated by the balance between $\alpha 5$ -mediated cell-cell and cell-substratum interaction.

Material and methods

Reagents

Function blocking antibodies directed against $\alpha 5$ integrin, clone IIA1 was from BD Biosciences and against αv integrin, clone 69.6.5 was produced and purified as previously described [34]. Following antibodies were used for confocal microscopy. Conformation dependent LIBS anti- $\alpha 5$ antibody clone SNAKA-51 was from Millipore. Phycoerythrin-conjugated anti- $\alpha 5$ antibody (clone SAM-1) was from Biologend. Anti- $\beta 1$ antibody clone TS2/16 was produced from the hybridoma cell line TS2/16.2.1 (HB-243, ATCC) and purified on protein-G-sepharose column (Pierce). Anti- αv antibody, clone PLW7, was from Santa Cruz Biotechnology, anti-fibronectin antibody, clone 10, was from BD Biosciences, anti-pFAK-tyr397, clone 141-9 from Life Technologies. Fluorescently labeled secondary antibodies were purchased from Invitrogen (Alexa Fluor –488; –546; –647). Dapi was purchased from Santa Cruz Biotechnology. Human fibronectin stabilized solution was purified as described in Reference 35. Cell culture medium and reagents were from Lonza. All other reagents were of molecular biology quality.

Cell culture

The human glioblastoma cell line U87MG was obtained from ATCC. U87MG cells were maintained in Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate and 1% non-essential amino-acid, in a 37 °C humidified incubator with 5% CO₂. U87MG cells were transfected with plasmid encoding $\alpha 5$ cDNA or specific shRNA targeting $\alpha 5$ mRNA as described [19], except that after selection with antibiotics, stably transfected cells were mass-selected by two steps of cell sorting (FACSARIA™ II, BD Bioscience) using PE-conjugated SAM-1 antibody. We selected cells expressing various amount of $\alpha 5$ integrin. Cell surface expression of $\beta 1$ and αv subunits were controlled by flow cytometry analysis (10,000 cells analyzed for each condition) using TS2/16 and 69-6-5 monoclonal antibodies respectively. $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrin expression levels were further analyzed by immunoblot using IIA1 and TS2/16 monoclonal antibodies as described [19]. In the present study we used U87 cells transfected with pcDNA3.1 $\alpha 5$

as high $\alpha 5$ expressing cells (U87 $\alpha 5+$) and U87 cells expressing $\alpha 5$ -shRNA as low $\alpha 5$ expressing (U87 $\alpha 5-$). LN229 and LN443 cells were cultured as described in Reference 24. LN229 cells were transfected as described for U87 cells. LN229 clonal populations were obtained by limited dilution and clones expressing various amount of $\alpha 5$ integrin were selected.

Proliferation assay

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

Spheroid formation

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

Spheroid organization

Spherical organization of 20 spheroids/condition was followed regularly from 0 to 48 hours on phase-contrast images (EVOS xl Core, 20 \times magnification). Circularity measurements (roundness) were measured using shape descriptors of ImageJ software [36]. When indicated function blocking anti-integrin antibodies (anti- $\alpha 5$, clone IIA1; anti- αv , clone 69.6.5) were added at 10 μ g/mL in the cell suspension.

Spheroid migration assays

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

Confocal microscopy and image analysis

Coverslips were coated with fibronectin (10 μ g/mL in PBS). Two-day old spheroids were seeded in complete medium for 18 hours. Cells were then fixed in 3.7% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.1% Triton-X100. After a 1 hour blocking step using TBS-BSA 3% solution, cells were incubated with primary antibodies O/N at 4 °C (2 μ g/mL each in TBS-BSA 3%). Cells were incubated with appropriate secondary antibodies (1 μ g/mL in TBS-BSA 3%) and DAPI for 1 hour. Spheroids were mounted on microscope slides using Permafluor Aqueous Mounting Medium (Fisher). Images were acquired using a confocal microscope (LEICA TCS SPE II, 60 \times magnification oil-immersion). Feret's diameter used as adhesion size criteria were quantified using an ImageJ plugin developed in the lab. Pearson correlation coefficient was calculated using JACoP plugin ImageJ software [37]. Suspended spheroids were fixed with 3.7% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.1% Triton-X100 for 5 min. Saturation and immunolabeling were performed on U-bottom 96 well plates.

Immunostaining on patient-derived xenograft

A patient-derived integrin $\alpha 5$ expressing glioblastoma xenograft was selected for *in vivo* analysis as described in Reference 19. Briefly, formalin-fixed paraffin-embedded xenograft was prepared as previously described [19] and 4 μ m sections were deparaffinized, rehydrated and subjected to unmask the antigen protocol using Dako retrieval solution pH9. Next, blocking buffer (5% Goat serum, 0.1% Tween-20, PBS) was applied for 1 hour at room temperature. Integrin $\alpha 5$ and fibronectin were labeled with rabbit antibody directed against $\alpha 5$ integrin cytoplasmic tail (AB1928, Millipore) and mouse anti-fibronectin Alexa Fluor® 488 (FN-3, eBioscience), respectively (overnight incubation at 4 °C). After washing in PBS-Tween 0.1%, tissue sections were incubated for 1 hour with appropriate secondary antibody (goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor® 647, Invitrogen). Nuclei were counterstained with DAPI and coverslips were mounted onto tissue section using Permafluor Aqueous Mounting Medium (Fisher). Images were acquired using a confocal microscope as previously described.

Dual wide field/TIRF imaging

Dual Wide field/TIRF images were acquired using an iMIC microscope (Till Photonics) equipped with a Cobolt Dual Calypso Laser 491/532 nm, a monochromator

Please cite this article in press as: Anne-Florence Blandin, Fanny Noulet, Guillaume Renner, Marie-Cécile Mercier, Laurence Choulter, Romain Vauchelles, Philippe Ronde, Franck Carreiras, Nelly Etienne-Selloum, Gyorgy Vereb, Isabelle Lelong-Rebel, Sophie Martin, Monique Dottenwill, Maxime Lehmann, Glioma cell dispersion is driven by $\alpha 5$ integrin-mediated cell-matrix and cell-cell interactions, Cancer Letters (2016), doi: 10.1016/j.canlet.2016.04.007

Polychrome V and an Olympus 60× TIRFM (1.45 NA) objective. A multiband filter set was used for excitation of DAPI, Alexa fluor 491 and Alexa fluor 568. Wide field and TIRF images were recorded on an EMCCD camera (Andor Technology) and analyzed using ImageJ software.

Statistical analysis

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

Results

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

Multicellular tumor spheroid is an *in vitro* model used in numerous studies to mimic micro-tumors [38]. FN assembly can promote cell–cell adhesion and foster spheroid formation in various cell types [39,40] including U87MG glioma cells [13,32]. In CHO cells, this process involves the $\alpha 5\beta 1$ integrin [31,41]. We seek to assess the role of the FN receptor $\alpha 5\beta 1$ in glioma cell–cell adhesion. U87MG cells express $\alpha 5\beta 1$ integrin endogenously and were manipulated to increase or decrease the expression of the $\alpha 5$ integrin subunit. Cells were sorted for various expressions of $\alpha 5$ integrin. $\alpha 5$, $\beta 1$ and αv integrin expression was controlled by flow cytometry analysis (Fig. 1A, left panel). $\alpha 5$ and $\beta 1$ expression was further confirmed by immunoblot (Fig. 1A, right panel). For this study we consistently used the cell expressing the highest (U87 $\alpha 5+$) and lowest (U87 $\alpha 5-$) level of $\alpha 5$ integrin.

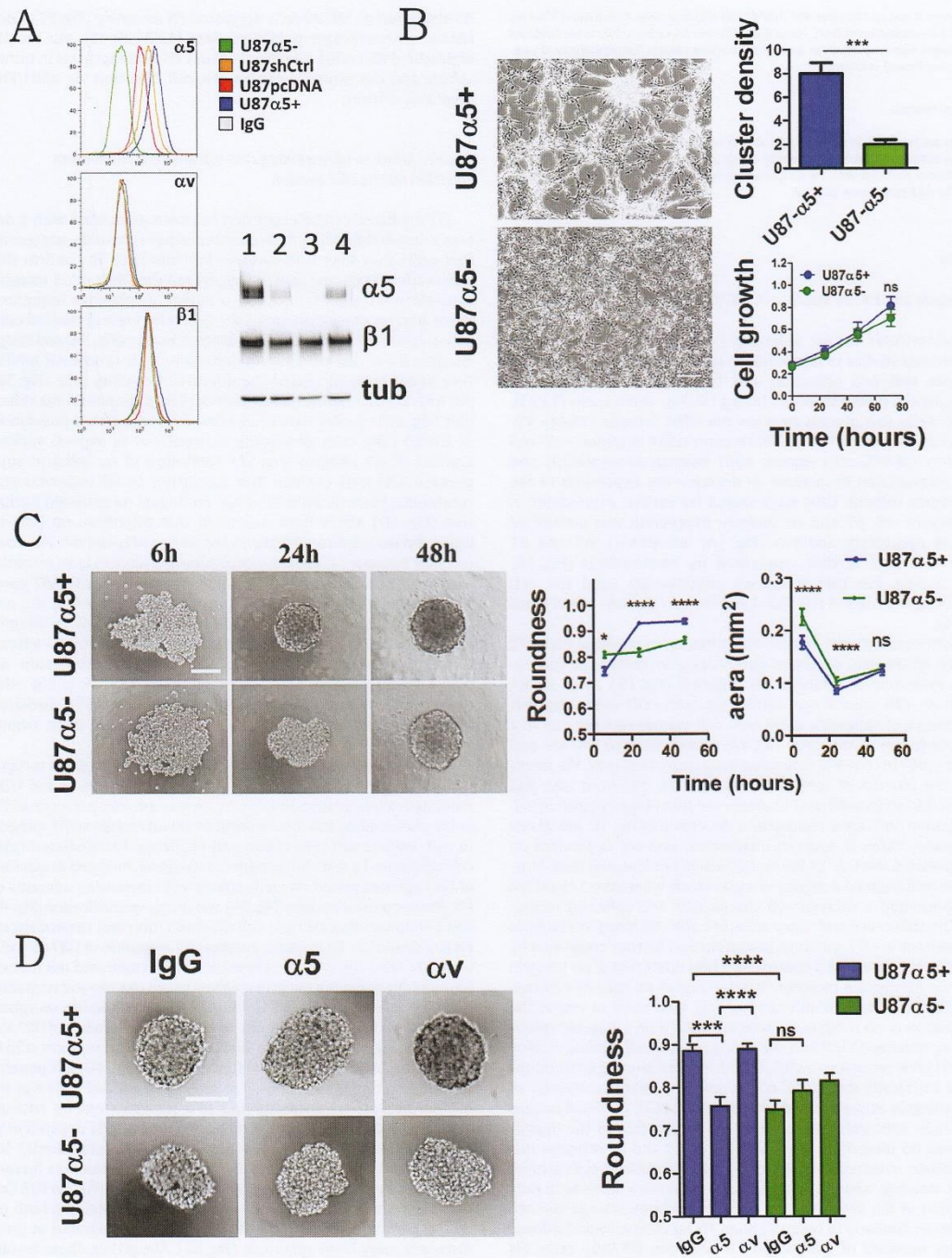
Under conventional culture condition, upon reaching high cell density, $\alpha 5$ integrin depletion significantly decreased the spontaneous formation of multicellular organoid (Fig. 1B). After 3 days of culture, cell growth was similar for both cells indicating that the absence of spheroids in U87 $\alpha 5-$ cell culture was not due to a decrease in cell density (Fig. 1B). We next challenged U87 $\alpha 5+$ and U87 $\alpha 5-$ cells in spheroid formation from suspended cells. We monitored the kinetics of spheroid formation, i.e., spheroid area and spherical form (roundness) to assess the role of $\alpha 5$ integrin in cell aggregation and tissue compaction. As shown in Fig. 1C, initial cell aggregation (after 6 hours of incubation) was not dependent on $\alpha 5$ expression level. At 24 hours, U87 $\alpha 5+$ cells increased their compaction and adopted a regular circular shape whereas $\alpha 5$ -depleted cells presented a delayed cell compaction and spheroid formation. This difference is no more observed after 48 hours. $\alpha 5$ integrin involvement in U87 spheroid formation was further confirmed by antibody-mediated. As a control, function inhibition of αv integrin (another fibronectin receptor) had no impact on spheroid formation (Fig. 1D). Confocal microscopy was next used to reveal the distribution of $\alpha 5$ integrin, $\beta 1$ integrin and FN on 2-day-old spheroids. For staining $\alpha 5$ integrin, we used a monoclonal antibody (clone Snaka51) that recognizes a LIBS (ligand-induced binding site) epitope on the calp1/calp2 domain of $\alpha 5$ integrin and that is a reporter of $\alpha 5\beta 1$ integrin activation and binding to FN [42]. Confocal images of U87 $\alpha 5+$ spheroids clearly show the localization of the ligand-occupied $\alpha 5$ integrin at the cell/cell contact and in vesicular-like intracellular structures (Fig. 2). Low-level $\alpha 5$ expressing cells present a faint staining, with some remaining cell surface labeling in only a fraction of the cells. Anti- $\beta 1$ integrin antibody stained the cell membrane similarly in both cell lines. FN labeling revealed a dense fibrillar network of assembled FN between U87 $\alpha 5+$ cells. FN fibrillogenesis was $\alpha 5\beta 1$ -dependent as depicted by FN-immunolabeling in U87 $\alpha 5-$ spheroids. Accordingly, immunolabeling of FN in LN229 glioma spheroids revealed the presence of a dense fibrillary network on $\alpha 5$ expressing cells. As shown in U87 cells,

$\alpha 5$ -depletion on LN229 cells decreased FN assembly (Fig. S1). Consistent with previous published data [13,31,39,41], our results highlighted that $\alpha 5\beta 1$ integrin mediates FN fibrillogenesis in tumor sphere and can promote glioma cell–cell adhesion via $\alpha 5\beta 1$ /FN-mediated bridges.

Balance between $\alpha 5$ -mediated cell–cell and cell–substratum adhesion directs U87 evasion

FN-mediated cell/cell cohesion has been associated with a decrease in cell dispersion from prostate tumor spheroids, suggesting that $\alpha 5\beta 1$ may have anti-invasive function [32]. To confirm this observation on glioma cells, we examined the effect of $\alpha 5$ integrin expression on spheroid evasion, a model of collective migration. In the first set of experiments, U87 spheroids were deposited onto poly-L-lysine coated plates. Phase contrast images (Fig. 3A) and image analysis show that $\alpha 5$ integrin depletion or its functional inhibition significantly increased the number of evading cells (Fig. 3B) but had no effect on the mean distance of migration from the spheroids (Fig. 3C). Similar data were obtained using clonal population of LN229 GBM cells genetically manipulated to express various amount of $\alpha 5$ integrin (Fig. S1). Inhibition of αv integrin suppressed U87 cell evasion and migration in all experimental conditions. Since αv inhibition had no impact on spheroid formation (Fig. 1D), these data suggested that migration on poly-L-lysine did not require $\alpha 5$ integrin but was αv -dependent. The non-receptor tyrosine kinase FAK (focal adhesion kinase) is an essential marker of focal adhesions and is phosphorylated on tyr397 upon its recruitment by integrins [43]. After immunolabeling the migrating cells, confocal images show the localization of αv integrin in pFAK-tyr397 positive focal adhesion (FA), supporting for a functional role of this integrin in U87 $\alpha 5-$ cell dispersion on poly-L-lysine (Fig. S2). Taken together, these data are in line with those from Reference 32, suggesting that $\alpha 5$ integrin/FN mediated cell–cell adhesion may impede cell dispersion from tumor mass.

However, cell dispersion from multicellular aggregates is regulated by opposite forces produced by cell–cell adhesion and ECM mediated cell migration [44,45]. In such a case, the presence of FN in the surrounding microenvironment would engage $\alpha 5\beta 1$ integrin in cell–substratum interaction and challenge FN-mediated cell–cell adhesion. To test this hypothesis, we examined cell dispersion of U87 spheres plated on wells coated with increasing amounts of FN. Phase-contrast images (Fig. 4A) and image quantification (Fig. 4B and C) showed that U87 $\alpha 5+$ cell dissemination was dependent on FN concentration. By contrast, evasion and migration of U87 $\alpha 5-$ cells were not stimulated by the presence of FN in spheroid microenvironment. To assess the integrin involved in cell evasion and migration from the spheroid, we used function blocking antibodies on spheroid plated on FN-rich substratum. In this case, the number of U87 $\alpha 5+$ cells evading cells and their distance of migration were $\alpha 5\beta 1$ -dependent and did not require functional αv (Fig. 4D, left panels). By contrast, for U87 $\alpha 5-$ cells, the number of evaded cells was inhibited by anti- αv antibody and to a lesser extent by anti- $\alpha 5$ antibody, and their distance of migration was strictly dependent of αv integrin and not of the $\alpha 5$ integrin (Fig. 4D, right panels). Involvement of αv integrin in U87 $\alpha 5-$ cell migration was further confirmed by immunostaining of αv integrin and pFAK-tyr397. Our data clearly show the presence of mature FAs containing both αv integrin and pFAK-tyr397 on U87 $\alpha 5-$ cells that migrated at great distances away from spheroids (Fig. S2). Altogether, these results highlight that changes in FN concentration in the tumor sphere microenvironment regulate the balance between $\alpha 5$ integrin-mediated cell–cell and cell–substratum adhesion, and as a consequence, U87 cell dissemination.



Please cite this article in press as: Anne-Florence Blandin, Fanny Noulet, Guillaume Renner, Marie-Cécile Mercier, Laurence Choulier, Romain Vauchelles, Philippe Ronde, Franck Carreiras, Nelly Etienne-Selloum, Gyorgy Vereb, Isabelle Lelong-Rebel, Sophie Martin, Monique Dontenwill, Maxime Lehmann, Glioma cell dispersion is driven by $\alpha 5$ integrin-mediated cell-matrix and cell-cell interactions, *Cancer Letters* (2016), doi: 10.1016/j.canlet.2016.04.007

Fig. 1. 87 cells expressing high (U87 α 5+) or low (U87 α 5-) amount of α 5 integrin were analyzed to show the involvement of α 5 in cell–cell adhesion. (A) Left panel – analyzed by flow cytometry of α 5, α v, β 1 cell surface expression on U87 cells manipulated to overexpress or repress α 5 integrin. Right panel – confirmation by immunoblot of α 5 and β 1 expression level on the U87 cell lines: lane 1, U87 α 5+; lane 2, U87pcDNA, lane 3, U87 α 5-; lane 4, U87shCtrl. (B) Phase contrast images of U87 cells cultured for 4 days under conventional conditions. Scale bar: 200 μ m. The number of cell clusters per field was manually counted. Data presented are the mean \pm s.e.m. of 3 different experiments (4 fields/experiments). U87 cells were cultured for 3 days on plastic dishes and cell growth was monitored as described in Material and methods. (C) Left panel – phase contrast images of U87 cell spheroid for the indicated period of time in non-adherent U-shaped wells (2000 cells/well). Right panel – morphological parameters (area and roundness) of each spheroid were measured using ImageJ software. (D) Spheroids were formed for 18 h in the presence of irrelevant IgG or function-blocking antibodies targeting α 5 or α v integrins (10 μ g/mL each) and spheroid roundness was monitored. Data are the mean \pm s.e.m of 15–20 spheroids from 3 independent experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001.

Remodeling of α 5 integrin adhesion during cell evasion from spheroid

To gain insight into the role of α 5 β 1 in cell–cell interaction and during cell evasion from tumor organoid, we examined by confocal microscopy, the distribution of ligand-occupied α 5 integrin and FN. In the first series of images (Fig. 5A), focal planes were selected at a distance of 5 μ m above the coverslips at the margin of the spheroid (indicated by the dashed lines in the figures). As U87 α 5+ cells emerged from the spheroid, α 5 integrin depicted a pattern with thin and long fibrils. 3D reconstruction of whole z-stacks showed that ligand-occupied α 5 is clearly around the cells (Fig. S3). Moreover, a dense fibrillar network of assembled FN was clearly visible. In α 5-depleted glioma cells evaded from the spheroid did not form any FN network (Fig. 5A). To confirm these results, we used LN443, another GBM cell line expressing a high level of α 5 integrin (Fig. S2). In LN443 cells, activated- α 5 integrin depicted a similar pattern to that of U87 α 5+ cells (Figs. S4 and S5). We also observed a dense network of assembled FN surrounding emerging LN443 cells (Figs. S6 and S7). To assess the presence of fibrillogenesis *in vivo*, FN and α 5 integrin distribution were examined by confocal immunofluorescence on paraffin embedded tissue sections of human tumor xenografts. Interestingly, we found numerous areas presenting dense FN fibrillary network and strong α 5 immunoreactivity (Fig. S8), confirming the relevance of fibrillary FN in GBM models. These observations indicated that glioma cells evaded collectively from the spheroid. During this process, α 5 integrin maintained cell–cell interaction in fibrillar-like adhesions. To the best of our knowledge, this is the first description of this kind of adhesive structure.

To examine the organization of α 5 integrin and of its ligand at the cell–substratum level, a second series of confocal images was taken on the same microscopic fields, but at a focal plane corresponding to the cell–substratum interface (Fig. 5B). Matrix-bound

α 5 integrin exhibited a pattern clearly distinguishable to that of cell–cell fibrillar adhesions. The integrin was distributed in thin dots with some elongated labeling resembling small fibrils (arrow heads). These integrin adhesion sites were morphologically distinct from classical focal adhesions (FAs, Fig. 6C). The presence of thin and short FN fibrils (arrow heads) indicated a reduced FN assembly at the substratum level compared to the one observed at cell–cell interaction level. In our experimental settings, coated FN was also immunodetected. The loss of immunoreactivity under the spheroid and under the evading cells likely reflected an intense matrix remodeling. In U87 α 5- cells, FN assembly was further decreased and FN remodeling was less pronounced. Together, these experiments described that glioma cells may maintain contact with their neighbor during collective evasion using α 5 integrin and assembled FN.

α 5 integrin does not colocalize with pFAK-tyr397 in cell–cell fibrillar adhesion

By confocal microscopy, we examined α 5 and pFAK-tyr397 colocalization on U87 α 5+ and LN443 glioma cells. Surprisingly, in cells that collectively emerged from the spheroid, pFAK-tyr397 was distributed as punctate intracellular clusters (Figs. 6A and S4A) of size smaller than the classical FAs (Fig. 6C and D). Image quantification showed that in U87 cells, pFAK-tyr397 did not colocalize with FN-bound α 5 integrin (Fig. 6E). The absence of colocalization between pFAK-tyr397 and α 5 integrin at cell–cell junction was also observed on confocal images of U87 α 5+ suspended spheroids (Fig. S9). Altogether, these data indicate that pFAK-tyr397 was not associated with cell–cell fibrillary adhesion. At the substratum level of glioma cells close to spheroids (Figs. 6B and S4B), pFAK-tyr397 was also found in small punctate cluster (Fig. 6D) that did not colocalize with α 5 integrin (Fig. 6E). Classical labeling of FAs and strong colocalization between α 5 integrin and pFAK-tyr397 were found in cells that had migrated to long distances from the tumor sphere (Figs. 6C, E and S4, arrow heads). α 5 integrin was also detected in thin classical fibrillar adhesions characterized by the absence of pFAK-tyr397 (Figs. 6C and S4C, arrows).

The previous experiments suggest that classical FAs were progressively formed as glioma cells migrated away from the spheroids. To further confirm this observation, we examined α 5 integrin adhesion reorganization at the substratum level using total internal reflection microscopy (TIRF). Dual color wide field TIRF experiments confirmed the presence of a punctate pFAK-tyr397 staining in cells localized beneath and in close proximity of the spheroid, suggesting that they were not able to assemble mature FAs. Integrin α 5 was not found with these punctate structures but was rather associated with cell–cell contacts and/or fibronectin fibrils as suggested by the elongated form of the staining (Fig. 7A and B). On the other hand, when cells migrated away from the spheroid, colocalization of integrin α 5 and pFAK-tyr397 at focal complexes and focal adhesions could be observed (Fig. 7C). Our data showed that cell–cell fibrillar adhesion did not contain activated FAK and that classical α 5-containing FAs are progressively formed during the process of cell migration.

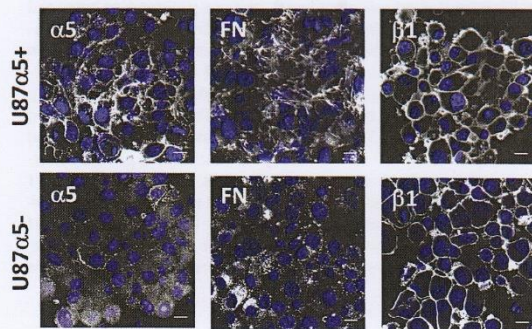
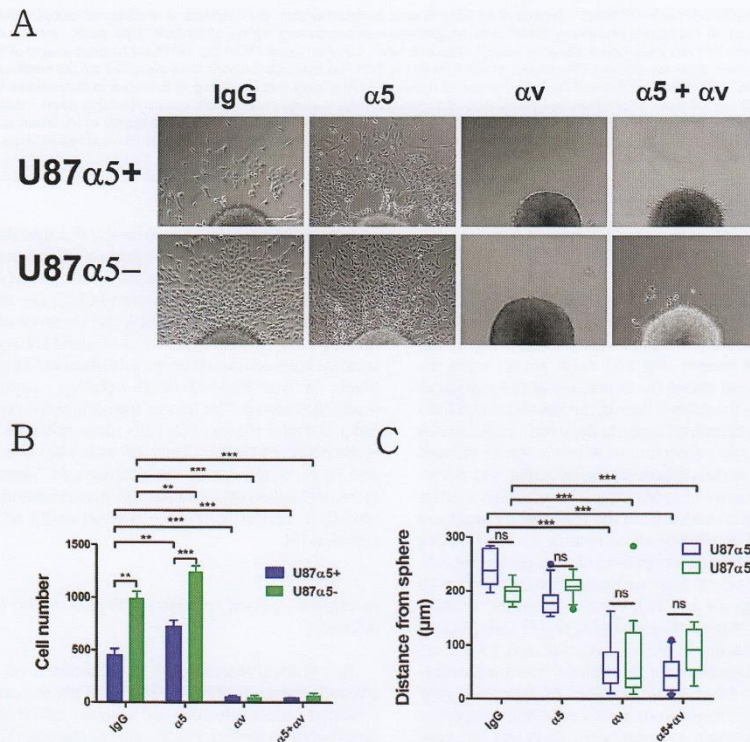


Fig. 2. Distribution of α 5, β 1 integrins and fibronectin in U87 cell spheroids. Suspended spheroids were immunolabeled as described in Material and methods. Confocal images were taken at an optical section between 10 μ m and 20 μ m above the base of the spheroid. Note the increase amount of fibrils in U87 α 5+ cells. Nuclei were stained with DAPI. Bar = 20 μ m.



456 **Fig. 3.** Two-day old spheroids were plated onto poly-L-lysine coated plastic dishes in the presence of irrelevant IgG or function-blocking antibodies targeting $\alpha 5$ or αv integrins
 457 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each). (A) Phase contrast images of representative spheroids after 24 hours of migration. Scale bar = 100 μm . (B) After DAPI staining, the number of evading cells
 458 were quantified by automated counting of nuclei using ImageJ software and plotted as the mean \pm s.e.m. (C) The distance of migration from the spheroid was measured for
 459 each cell and the mean distance was calculated for each spheroid. Data are plotted as Tukey box and whiskers. 15 spheroids from 3 independent experiments were used
 460 per condition. ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

461

462 Discussion

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

480 **Fig. 4.** (A) Two-day-old spheroids were plated on plastic dishes coated with indicated amount of fibronectin (FN). Phase contrast images were taken 24 hours after spheroid
 481 seeding. Scale bar = 200 μm . (B) After DAPI staining, cell evasion was quantified and mean number of evading cells was plotted \pm s.e.m. (C) The distance of migration
 482 from the spheroid was measured for each cell and the mean distance was calculated for each spheroid. Data are plotted as box and whiskers (min-max). (D) Spheroids
 483 were plated on plastic dishes coated with fibronectin in the presence of irrelevant IgG or function-blocking antibodies targeting $\alpha 5$, $\beta 1$ or αv integrins (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each).
 484 Data are the mean cell number \pm s.e.m. and the mean distance of cell migration per spheroid plotted as box and whiskers (min-max) – 12 to 18 spheroids from 4 independent
 485 experiments were analyzed. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Please cite this article in press as: Anne-Florence Blandin, Fanny Noulet, Guillaume Renner, Marie-Cécile Mercier, Laurence Choulier, Romain Vauchelles, Philippe Ronde, Franck Carreiras, Nelly Etienne-Selloum, Gyorgy Vereb, Isabelle Lelong-Rebet, Sophie Martin, Monique Döntenwill, Maxime Lehmann, Glioma cell dispersion is driven by $\alpha 5$ integrin-mediated cell-matrix and cell-cell interactions, Cancer Letters (2016), doi: 10.1016/j.canlet.2016.04.007

487 mediated glioma cell dissemination from the tumor mass. In such
 488 case patients would benefit from anti- $\alpha 5$ integrin therapy.

489 Multicellular tumor spheroids are three dimensional (3D) archi-
 490 tecture that mimic avascular tumor areas comprising the
 491 establishment of diffusion gradients, reduced proliferation rates and
 492 increased drug resistance. They are increasingly used as an im-
 493 provement of conventional 2D culture systems as they offer 3D *in*
 494 *vivo*-like environment as well as cell-ECM and cell-cell interac-
 495 tions. Spheroid formation from a cell suspension is a multistep
 496 process that required cell aggregation and tension force mediated
 497 cell compaction [46]. The present work illustrated that $\alpha 5\beta 1$ and
 498 cell-mediated FN fibrillogenesis play a pivotal role in glioma spheroid
 499 formation. Time course experiments indicated that $\alpha 5\beta 1$
 500 expression level has no impact on the early phase of spheroid for-
 501 mation. This is in line with other studies [47,48] showing that
 502 integrins are not involved in cell aggregation but rather promote
 503 the condensation phase of the spheroid formation. In agreement

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

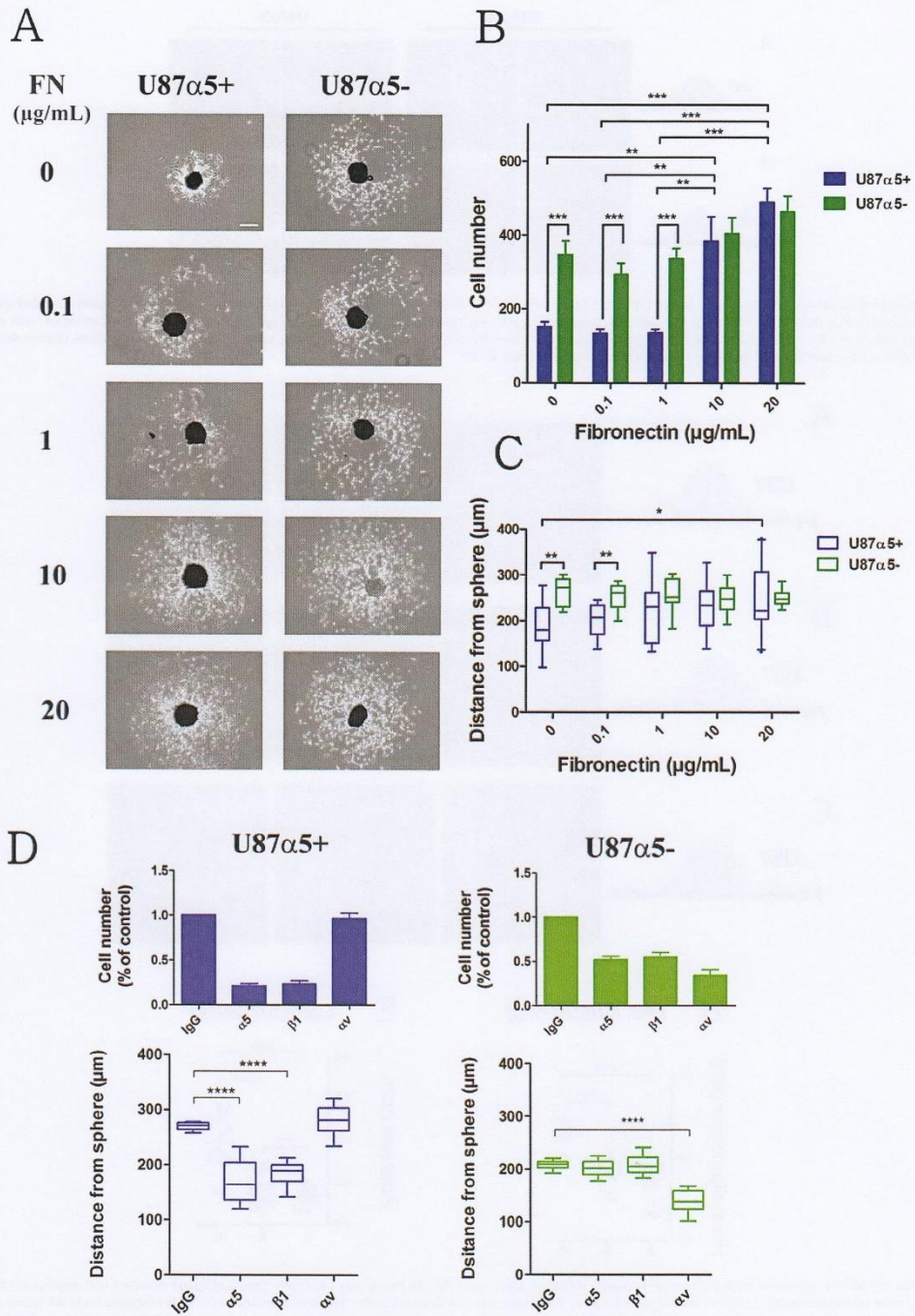
499

500

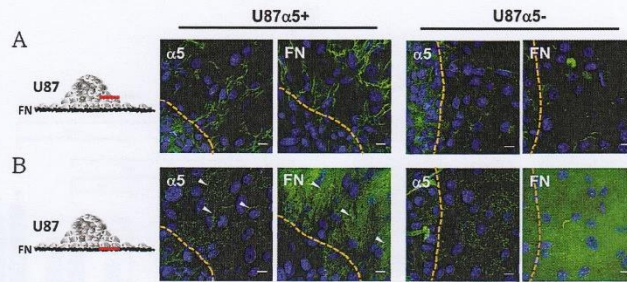
501

502

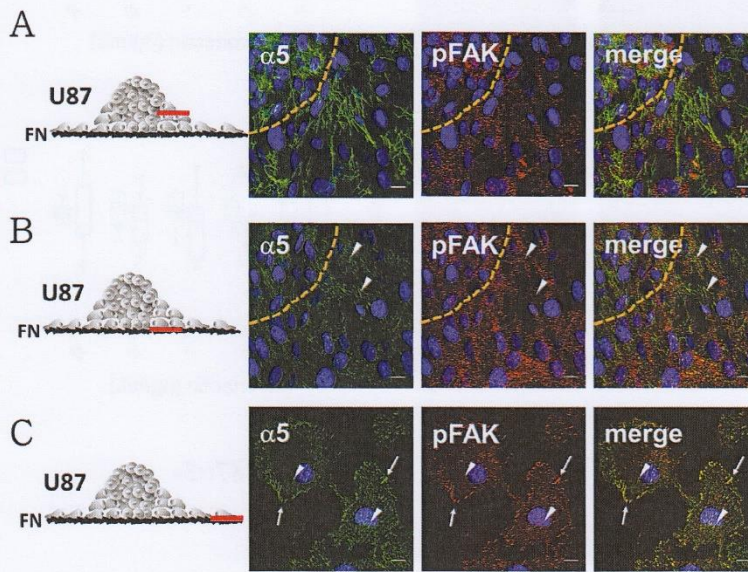
503



Please cite this article in press as: Anne-Florence Blandin, Fanny Noulet, Guillaume Renner, Marie-Cécile Mercier, Laurence Choulier, Romain Vauchelles, Philippe Ronde, Franck Carreiras, Nelly Etienne-Selloum, Gyorgy Vereb, Isabelle Lelong-Rebel, Sophie Martin, Monique Dontenwill, Maxime Lehmann, Glioma cell dispersion is driven by α5 integrin-mediated cell-matrix and cell-cell interactions, Cancer Letters (2016), doi: 10.1016/j.canlet.2016.04.007



504 **Fig. 5.** Two-day-old spheroids were plated on FN-coated (10 μg/mL) glass coverslips. 18 hours later, cells were fixed and immunolabeled to detect ligand-occupied α5 integrin
 505 (α5) and fibronectin (FN) as described in Material and methods. Confocal images were taken at 2 different zones as depicted in the diagrams to examine (A) cells emerging
 506 from the tumor sphere at a focal plane 5 μm above the coverslips and (B) same microscopic field but at a focal plane corresponding to the substratum. Orange dotted lines
 507 indicate the border of the spheroid. Arrow heads = fibrillar adhesion. Scale bar = 10 μm.



508

509 **Fig. 6.** Two-day-old U87α5+ spheroids were plated on FN-coated (10 μg/mL) glass coverslips. 18 hours later, cells were fixed and ligand-occupied α5 integrin (α5) and pFAK-
 510 tyr397 (pFAK) were immunodetected. Confocal images were taken at 3 different zones as depicted in the diagrams to examine (A) cells emerging from the tumor sphere at
 511 a focal plane 5 μm above the coverslips, (B) same microscopic field but at a focal plane corresponding to the substratum and (C) cell/substratum interface of cells that mi-
 512 grated away from the sphere. (D) Quantitative image analysis of pFAK-tyr397 cluster size was performed as described in Material and methods. Data are presented as the
 513 mean Feret diameters of each individual image (n = 8–12) from 2 independent experiments. (E) Integrin/pFAK-tyr397 colocalization was evaluated using Pearson's correla-
 514 tion coefficient. 10–12 images from 2 experiments were used. ****p < 0.0001. Orange dotted lines indicate the border of spheroids. Arrow heads = fibrillar adhesion; arrows = focal
 515 contacts. Scale bar = 10 μm.

Please cite this article in press as: Anne-Florence Blandin, Fanny Noulet, Guillaume Renner, Marie-Cécile Mercier, Laurence Choulier, Romain Vauchelles, Philippe Ronde, Franck Carreiras, Nelly Etienne-Selloum, Gyorgy Vereb, Isabelle Lelong-Rebel, Sophie Martin, Monique Dontenwill, Maxime Lehmann, Glioma cell dispersion is driven by α5 integrin-mediated cell-matrix and cell-cell interactions, Cancer Letters (2016), doi: 10.1016/j.canlet.2016.04.007

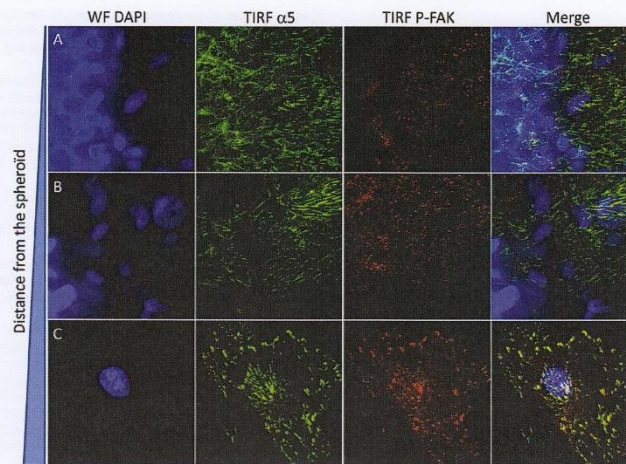


Fig. 7. Two-day-old U87 α 5- spheroids were plated on FN-coated (10 μ g/mL) glass coverslips in complete medium for 18 hours. Fixed cells were immunolabeled using anti- α 5 and rabbit anti-pFAKtyr397 antibodies. Dual color wide field TIRF images were acquired at increasing distances from the spheroid.

with previous published data [13,31–33,40,41,49], it is likely that, in tumor cell aggregates, α 5-mediated cell tension and contractility promotes FN assembly and cell–cell interaction.

An important observation of our work is that during their collective evasion from tumor sphere, glioma cells maintained contacts with their neighbor using cell–cell fibrillar adhesions. In line with previous studies comparing FN fibrillogenesis in 2D and 3D cell cultures [50–52], we observed that fibrillar FN networks were much more developed at cell–cell interaction than at cell–substratum level. In our experimental model, α 5 integrin relocalized at cell substratum adhesion sites and progressively formed mature FAs as cells migrated at distance from the spheroid, requiring FN matrix remodeling and turnover. It has been shown that RhoA signaling pathway and inverted formin 2 promote fibrillary adhesion and FN matrix assembly [53–57]. Conversely, the caveolin-1 and RAS-RAF signaling pathway inhibit FN fibrillogenesis [52,58]. FN fibrils turnover is also regulated by extracellular proteins such as transglutaminase 2 or the membrane type matrix metalloproteinase 1 [12,59,60]. Future experiments will help to decipher molecular pathways involved in cell–cell fibrillar adhesion turnover during glioma cell dissemination. In this context, cell dispersion from spheroids represents a useful model to study the dynamics of α 5 integrin adhesion sites and fibrillar FN remodeling that may take place during glioma cell invasion *in vivo*.

Our data indicate that α 5 integrin can trigger cell–cell interaction and FN fibrillogenesis independently of pFAK-tyr397 recruitment. At cell–substratum level, pFAK-tyr397 was poorly associated with ligand-bound α 5 integrin on cells close to the spheroid. pFAK-tyr397/integrin association was progressively detectable on migrating cells. This observation suggests that α 5 integrin engagement at cell–cell contact may regulate cell–substratum interaction by inhibiting pFAK-tyr397 recruitment at the plasma membrane and therefore FAs formation and maturation. In glioblastoma, α 5 β 1 integrin may thus not always be associated with pFAK-tyr397 and their interaction may be finely regulated by the balance between cell–cell and cell–substratum interactions. For instance, *in situ* analysis revealed that in glioblastoma, co-expression of β 1 integrin and pFAK-tyr397 was detected in morphologically defined regions such as perivascular or tumor infiltration zones and not in the tumor mass [61].

In the present work, we described for the first time cell–cell fibrillar adhesions as pFAK-tyr397-independent α 5 adhesion sites involved in glioma cell–cell interactions. A recent study demonstrated that α 5 integrin can foster cell–cell adhesion by an alternative mechanism, involving direct interaction between inactive integrins expressed by adjacent cells [62]. In light of these new data, it appears that α 5 integrin function is not restricted to cell–substratum adhesion and that its involvement in glioma and in other solid cancers progression may deserve a reevaluation. We and others have shown that α 5 integrins play a critical role in glioma resistance to radio- and chemo-therapy. It will be important in the future to characterize the composition, the regulation and the function of cell–cell fibrillar adhesions in order to better assess its involvement in glioma progression and resistance to therapy. In this context, our experimental model will be useful for the design of new effective strategies for fighting GBM.

Acknowledgements

We thank Pr José Luis and Dr. Sylvie Thuault for their technical expertise. This work was supported by the University of Strasbourg, the Ligue Contre le Cancer (Comité du Grand Est), the Cancéropole Grand Est and the Region Alsace – Program INTEGLIO, the Henri Curien Partnerships – Program Balaton and University of Strasbourg-Program IDEX. Anne-Florence Blandin and Guillaume Renner are doctoral fellows from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Conflict of interest

None.

Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.canlet.2016.04.007.

References

- [1] M. Nakada, S. Nakada, T. Demuth, N.L. Tran, D.B. Hoelzinger, M.E. Berens, Molecular targets of glioma invasion, *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (2007) 458–478, doi:10.1007/s00018-007-6342-5.
- [2] A. Vehlou, N. Cordes, Invasion as target for therapy of glioblastoma multiforme, *Biochim. Biophys. Acta* 2013 (1836) 236–244, doi:10.1016/j.bbcan.2013.07.001.
- [3] V. Montana, H. Sontheimer, Bradykinin promotes the chemotactic invasion of primary brain tumors, *J. Neurosci.* 31 (2011) 4858–4867, doi:10.1523/JNEUROSCI.3825-10.2011.
- [4] E. Hirata, H. Yukinaga, Y. Kamioka, Y. Arakawa, S. Miyamoto, T. Okada, et al., In vivo fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 858–868, doi:10.1242/jcs.089995.
- [5] A.C. Bellail, S.B. Hunter, D.J. Brat, C. Tan, E.G. Van Meir, Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 1046–1069, doi:10.1016/j.biocel.2004.01.013.
- [6] D.J. Silver, F.A. Siebzehnrub, M.J. Schildts, A.T. Yachnis, G.M. Smith, A.A. Smith, et al., Chondroitin sulfate proteoglycans potentially inhibit invasion and serve as a central organizer of the brain tumor microenvironment, *J. Neurosci.* 33 (2013) 15603–15617, doi:10.1523/JNEUROSCI.3004-12.2013.
- [7] A. Lal, A.E. Lash, S.F. Altschul, V. Velculescu, L. Zhang, R.E. McLendon, et al., A public database for gene expression in human cancers, *Cancer Res.* 59 (1999) 5403–5407.
- [8] P. Castellani, L. Borsi, B. Carnemolla, A. Birò, A. Dorcaratto, G.L. Viale, et al., Differentiation between high- and low-grade astrocytoma using a human recombinant antibody to the extra domain-B of fibronectin, *Am. J. Pathol.* 161 (2002) 1695–1700.
- [9] R. Mahesparan, T.-A. Read, M. Lund-Johansen, K.O. Skaftnesmo, R. Bjerkgvig, O. Engebraten, Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model, *Acta Neuropathol.* 105 (2003) 49–57, doi:10.1007/s00401-002-0610-0.
- [10] E. Serres, F. Debarbieux, F. Stanchi, L. Maggiorella, D. Grall, L. Turchi, et al., Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane in vitro and orthotopic tumor growth in mice, *Oncogene* 33 (2014) 3451–3462, doi:10.1038/nc.2013.305.
- [11] T. Ohnishi, S. Hiraga, S. Izumoto, H. Matsumura, Y. Kanemura, N. Arita, et al., Role of fibronectin-stimulated tumor cell migration in glioma invasion in vivo: clinical significance of fibronectin and fibronectin receptor expressed in human glioma tissues, *Clin. Exp. Metastasis* 16 (1998) 729–741, doi:10.1023/A:1006532812408.
- [12] L. Yuan, M. Siegel, K. Choi, C. Khosla, C.R. Miller, E.N. Jackson, et al., Transglutaminase 2 inhibitor, KCC009, disrupts fibronectin assembly in the extracellular matrix and sensitizes orthotopic glioblastomas to chemotherapy, *Oncogene* 26 (2007) 2563–2573, doi:10.1038/sj.onc.1210048.
- [13] E. Serres, F. Debarbieux, F. Stanchi, L. Maggiorella, D. Grall, L. Turchi, et al., Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane in vitro and orthotopic tumor growth in mice, *Oncogene* 33 (2013) 3451–3462, doi:10.1038/nc.2013.305.
- [14] S. Sengupta, S. Nandi, E.S. Hindi, D.A. Wainwright, Y. Han, M.S. Lesniak, Short hairpin RNA-mediated fibronectin knockdown delays tumor growth in a mouse glioma model, *Neoplasia* 12 (2010) 837.
- [15] T. Ohnishi, N. Arita, S. Hiraga, T. Taki, S. Izumoto, Y. Fukushima, et al., Fibronectin-mediated cell migration promotes glioma cell invasion through chemokinetic activity, *Clin. Exp. Metastasis* 15 (1997) 538–546.
- [16] A.-F. Blandin, G. Renner, M. Lehmann, I. Lelong-Rebel, S. Martin, M. Dentenwill, $\beta 1$ integrins as therapeutic targets to disrupt hallmarks of cancer, *Front Pharmacol.* (2015) 279, doi:10.3389/fphar.2015.00279.
- [17] M.C. Gingras, E. Roussel, J.M. Bruner, C.D. Branch, R.P. Moser, Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue, *J. Neuroimmunol.* 57 (1995) 143–153.
- [18] E.C. Cosset, J. Godet, N. Entz-Werlé, E. Guérin, D. Guenot, S. Froelich, et al., Involvement of the TGF β pathway in the regulation of $\alpha(5)\beta(1)$ integrins by caveolin-1 in human glioblastoma, *Int. J. Cancer* 131 (2012) 601–611, doi:10.1002/ijc.26415.
- [19] H. Janouskova, A. Maglott, D.Y. Leger, C. Bossert, F. Noulet, E. Guerin, et al., Integrin $\alpha 5 \beta 1$ plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma, *Cancer Res.* 72 (2012) 3463–3470, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-4199.
- [20] K.M. Holmes, M. Annala, C.Y.X. Chua, S.M. Dunlap, Y. Liu, N. Hugen, et al., Insulin-like growth factor-binding protein 2-driven glioma progression is prevented by blocking a clinically significant integrin, integrin-linked kinase, and NF- κ B network, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) 3475–3480, doi:10.1073/pnas.1120375109.
- [21] J.D. Lathia, M. Li, M. Sinyuk, A.G. Alvarado, W.A. Flavahan, K. Stoltz, et al., High-throughput flow cytometry screening reveals a role for junctional adhesion molecule as a cancer stem cell maintenance factor, *Cell Rep.* 6 (2014) 117–129, doi:10.1016/j.celrep.2013.11.043.
- [22] D.M. Mallawaarachchi, M.E. Buckland, K.L. McDonald, C.C.Y. Li, L. Ly, E.K. Sykes, et al., Membrane proteome analysis of glioblastoma cell invasion, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 74 (2015) 425–441, doi:10.1097/NEN.0000000000000187.
- [23] F. Schaffner, A.M. Ray, M. Dentenwill, Integrin $\alpha 5 \beta 1$, the fibronectin receptor, as a pertinent therapeutic target in solid tumors, *Cancers (Basel)* 5 (2013) 27–47, doi:10.3390/cancers5010027.
- [24] G. Renner, H. Janouskova, F. Noulet, V. Koenig, E. Guerin, S. Bär, et al., Integrin $\alpha 5 \beta 1$ and p53 convergent pathways in the control of anti-apoptotic proteins PEA-15 and survivin in high-grade glioma, *Cell Death Differ.* 23 (2015) 640–653, doi:10.1038/cdd.2015.131.
- [25] E. Martinkova, A. Maglott, D.Y. Leger, D. Bonnet, M. Stiborova, K. Takeda, et al., $\alpha 5 \beta 1$ integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells, *Int. J. Cancer* 127 (2010) 1240–1248, doi:10.1002/ijc.25187.
- [26] J.E. Schwarzbauer, D.W. DeSimone, Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011) a005041, doi:10.1101/cshperspect.a005041.
- [27] B.-Z. Katz, E. Zamir, A. Bershadsky, Z. Kam, K.M. Yamada, B. Geiger, Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 1047–1060, doi:10.1091/mbc.1.13.1047.
- [28] R. Pankov, E. Cukierman, B.-Z. Katz, K. Matsumoto, D.C. Lin, S. Lin, et al., Integrin dynamics and matrix assembly tensin-dependent translocation of $\alpha 5 \beta 1$ integrin promotes early fibronectin fibrillogenesis, *J. Cell Biol.* 148 (2000) 1075–1090, doi:10.1083/jcb.148.5.1075.
- [29] A.-M. Ray, F. Schaffner, H. Janouskova, F. Noulet, D. Rognan, I. Lelong-Rebel, et al., Single cell tracking assay reveals an opposite effect of selective small non-peptidic $\alpha 5 \beta 1$ or $\alpha v \beta 3 / \beta 5$ integrin antagonists in U87MG glioma cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1840 (2014) 2978–2987, doi:10.1016/j.bbagen.2014.04.024.
- [30] S. Martin, E.C. Cosset, J. Terrand, A. Maglott, K. Takeda, M. Dentenwill, Caveolin-1 regulates glioblastoma aggressiveness through the control of $\alpha(5)\beta(1)$ integrin expression and modulates glioblastoma responsiveness to SJ749, an $\alpha(5)\beta(1)$ integrin antagonist, *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (2009) 354–367, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.09.019.
- [31] E.E. Robinson, R.A. Foty, S.A. Corbett, Fibronectin matrix assembly regulates $\alpha 5 \beta 1$ -mediated cell cohesion, *Mol. Biol. Cell* 15 (2004) 973–981, doi:10.1091/mbc.E03-07-0528.
- [32] J. Sabari, D. Lax, D. Connors, I. Brotman, E. Mindrebo, C. Butler, et al., Fibronectin matrix assembly suppresses dispersal of glioblastoma cells, *PLoS ONE* 6 (2011) e24810, doi:10.1371/journal.pone.0024810.
- [33] P. Singh, J.E. Schwarzbauer, Fibronectin matrix assembly is essential for cell condensation during chondrogenesis, *J. Cell Sci.* 127 (2014) 4420–4428, doi:10.1242/jcs.150276.
- [34] M. Lehmann, C. Rabenandrasana, R. Tamura, J.C. Lissitzky, V. Quaranta, J. Pichon, et al., A monoclonal antibody inhibits adhesion to fibronectin and vitronectin of a colon carcinoma cell line and recognizes the integrins $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha v \beta 6$, and $\alpha v \beta 7$, *Cancer Res.* 54 (1994) 2102–2107.
- [35] L. Carduner, R. Agniet, S. Kellouche, C.R. Picot, C. Blanc-Fournier, J. Leroy-Dudal, et al., Ovarian cancer ascites-derived vitronectin and fibronectin: combined purification, molecular features and effects on cell response, *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (2013) 4885–4897, doi:10.1016/j.bbagen.2013.06.023.
- [36] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods* 9 (2012) 671–675, doi:10.1038/nmeth.2089.
- [37] S. Bolte, F.P. Cordelières, A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy, *J. Microsc.* 224 (2006) 213–232, doi:10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x.
- [38] F. Hirschtmaier, H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller-Klieser, L.A. Kunz-Schughart, Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again, *J. Biotechnol.* 148 (2010) 3–15, doi:10.1016/j.jbiotec.2010.01.012.
- [39] D. Jia, I. Entersz, C. Butler, R.A. Foty, Fibronectin matrix-mediated cohesion suppresses invasion of prostate cancer cells, *BMC Cancer* 12 (2012) 94, doi:10.1186/1471-2407-12-94.
- [40] P. Salmenperä, E. Kankuri, J. Bizik, V. Sirén, I. Virtanen, S. Takahashi, et al., Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin-integrin interaction, *Exp. Cell Res.* 314 (2008) 3444–3452, doi:10.1016/j.yexcr.2008.09.004.
- [41] E.E. Robinson, K.M. Zazzali, S.A. Corbett, R.A. Foty, $\alpha 5 \beta 1$ integrin mediates strong tissue cohesion, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 377–386, doi:10.1242/jcs.00231.
- [42] K. Clark, R. Pankov, M.A. Travis, J.A. Askari, A.P. Mould, S.E. Craig, et al., A specific $\alpha 5 \beta 1$ -integrin conformation promotes directional integrin translocation and fibronectin matrix formation, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 291–300, doi:10.1242/jcs.01623.
- [43] A. Hamadi, M. Bouali, M. Dentenwill, H. Stoekel, K. Takeda, P. Rondé, Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 4415–4425, doi:10.1242/jcs.02565.
- [44] B. da Rocha-Azevedo, E. Grinnell, Fibroblast morphogenesis on 3D collagen matrices: the balance between cell clustering and cell migration, *Exp. Cell Res.* 319 (2013) 2440–2446, doi:10.1016/j.yexcr.2013.05.003.
- [45] P.L. Ryan, R.A. Foty, J. Kohn, M.S. Steinberg, Tissue spreading on implantable substrates is a competitive outcome of cell-cell vs. cell-substratum adhesivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 4323–4327, doi:10.1073/pnas.071615398.
- [46] L.-B. Weiswald, D. Bellet, V. Dangles-Marie, Spherical cancer models in tumor biology, *Neoplasia* 17 (2015) 1–15, doi:10.1016/j.neo.2014.12.004.
- [47] A. Ivascu, M. Kubbies, Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids, *Int. J. Oncol.* 31 (2007) 1403–1413.
- [48] L. Saia, A. Gomes, M. Cazzales, B. Ducommun, V. Lobjois, Cell-cell adhesion and cytoskeleton tension oppose each other in regulating tumor cell aggregation, *Cancer Res.* 75 (2015) 2426–2433, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3534.
- [49] R.C. Casey, K.M. Burleson, K.M. Skubitz, S.E. Pambuccian, T.R. Oegema Jr., L.E. Ruff, et al., $\beta 1$ -Integrins regulate the formation and adhesion of ovarian

Please cite this article in press as: Anne-Florence Blandin, Fanny Noulet, Guillaume Renner, Marie-Cécile Mercier, Laurence Choulier, Romain Vauchelles, Philippe Ronde, Franck Carreiras, Nelly Etienne-Selloum, Gyorgy Vereb, Isabelle Lelong-Rebel, Sophie Martin, Monique Dentenwill, Maxime Lehmann, Glioma cell dispersion is driven by $\alpha 5$ integrin-mediated cell-matrix and cell-cell interactions, *Cancer Letters* (2016), doi: 10.1016/j.canlet.2016.04.007

766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788

- carcinoma multicellular spheroids, *Am. J. Pathol.* 159 (2001) 2071–2080, doi:10.1016/S0002-9440(10)63058-1.
- [50] Y. Mao, J.E. Schwarzbauer, Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process, *Matrix Biol.* 24 (2005) 389–399, doi:10.1016/j.matbio.2005.06.008.
- [51] E. Cukierman, R. Pankov, D.R. Stevens, K.M. Yamada, Taking cell-matrix adhesions to the third dimension, *Science* 294 (2001) 1708–1712, doi:10.1126/science.1064829.
- [52] B.S. Winters, B.M. Raj, E.E. Robinson, R.A. Foty, S.A. Corbett, Three-dimensional culture regulates Raf-1 expression to modulate fibronectin matrix assembly, *Mol. Biol. Cell* 17 (2006) 3386–3396.
- [53] S. Fernandez-Sauze, D. Grall, B. Cseh, E. Van Obberghen-Schilling, Regulation of fibronectin matrix assembly and capillary morphogenesis in endothelial cells by Rho family GTPases, *Exp. Cell Res.* 315 (2009) 2092–2104, doi:10.1016/j.yexcr.2009.03.017.
- [54] C. Zhong, M. Chrzanowska-Wodnicka, J. Brown, A. Shaub, A.M. Belkin, K. Burridge, Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly, *J. Cell Biol.* 141 (1998) 539–551, doi:10.1083/jcb.141.2.539.
- [55] V. Vouret-Craviari, E. Boulter, D. Grall, C. Matthews, E.V. Obberghen-Schilling, ILK is required for the assembly of matrix-forming adhesions and capillary morphogenesis in endothelial cells, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 4559–4569, doi:10.1242/jcs.01331.
- [56] D. Ilić, B. Kovačić, K. Johkura, D.D. Schlaepfer, N. Tomašević, Q. Han, et al., FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 177–187, doi:10.1242/jcs.00845.
- [57] C.T. Skau, S.V. Plotnikov, A.D. Doyle, C.M. Waterman, Inverted formin 2 in focal adhesions promotes dorsal stress fiber and fibrillar adhesion formation to drive extracellular matrix assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 (2015) E2447–E2456, doi:10.1073/pnas.1505035112.
- [58] J. Sottile, J. Chandler, Fibronectin matrix turnover occurs through a caveolin-1-dependent process, *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 757–768, doi:10.1091/mbc.E04-08-0672.
- [59] F. Shi, J. Sottile, MT1-MMP regulates the turnover and endocytosis of extracellular matrix fibronectin, *J. Cell Sci.* 124 (2011) 4039–4050, doi:10.1242/jcs.087858.
- [60] T. Takino, R. Nagao, R. Manabe, T. Domoto, K. Sekiguchi, H. Sato, Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates fibronectin assembly to promote cell motility, *FEBS Lett.* 585 (2011) 3378–3384, doi:10.1016/j.febslet.2011.09.039.
- [61] M.J. Riemenschneider, W. Mueller, R.A. Betensky, G. Mohapatra, D.N. Louis, In situ analysis of integrin and growth factor receptor signaling pathways in human glioblastomas suggests overlapping relationships with focal adhesion kinase activation, *Am. J. Pathol.* 167 (2005) 1379–1387.
- [62] D. Jülich, G. Cobb, A.M. Melo, P. McMillen, A.K. Lawton, S.G.J. Mochrie, et al., Cross-scale integrin regulation organizes ECM and tissue topology, *Dev. Cell* 34 (2015) 33–44, doi:10.1016/j.devcel.2015.05.005.

789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811

Please cite this article in press as: Anne-Florence Blandin, Fanny Noulet, Guillaume Renner, Marie-Cécile Mercier, Laurence Choulier, Romain Vauchelles, Philippe Ronde, Franck Carreiras, Nelly Etienne-Selloum, Gyorgy Vereb, Isabelle Lelong-Rebel, Sophie Martin, Monique Dontenwill, Maxime Lehmann, Glioma cell dispersion is driven by $\alpha 5$ integrin-mediated cell-matrix and cell-cell interactions, *Cancer Letters* (2016), doi: 10.1016/j.canlet.2016.04.007

III. Article 3

Mercier, MC., Dontenwill, M. and Choulier, L. (2017). **Selection of Nucleic Acid Aptamers Targeting Tumor Cell-Surface Protein Biomarkers.** *Cancers.* 9, 69.

L'équipe vise à rechercher de nouveaux ligands de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en explorant les aptamères. Les travaux du Dr Laurence Choulier ont permis de développer un aptamère ciblant de manière spécifique l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Au cours de ma thèse, j'ai participé à la rédaction d'une revue faisant le point sur la sélection d'aptamères et leur utilisation diagnostique et thérapeutique en oncologie.

Les aptamères sont des acides nucléiques de types ARN ou ADN, capables de lier des cibles avec une grande affinité et sélectivité. Ils sont sélectionnés par un criblage nommé « SELEX » (selective evolution of ligands by exponential enrichment). Cette technique repose sur l'interaction d'une banque de molécules (ARN ou ADN) avec une cible cellulaire (cell-SELEX) ou une protéine (protein-SELEX). Cette étude s'intéresse à l'utilisation d'aptamères en cancérologie dans un but diagnostic ou thérapeutique.

Plusieurs aptamères ont été sélectionnés (ciblant l'EGFRvIII, HER-2, les intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha v...$) afin de détecter certaines protéines sur des tissus biologiques ou de bloquer leurs effets. En ce qui concerne l'utilisation clinique, 11 aptamères sont testés en étude clinique, dont 3 dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, 4 dans la coagulation, 2 dans l'inflammation et 2 en cancérologie. Le NOX-A12 est un antagoniste de l'axe CXCL12/SDF-1 perturbant l'interaction des cellules tumorales avec le microenvironnement. Il est évalué en étude clinique de phase II, en combinaison au Rituximab et à la Bendamustine chez les patients atteints de leucémie lymphocytaire chronique (NCT01486797) et en association au Bortezomib et à la Dexaméthasone dans le myélome multiple (NCT01521533). Le deuxième aptamère est l'AS1411. Celui-ci cible la nucléoline, une protéine surexprimée dans de nombreux cancers qui interagit avec des protéines oncogènes (BCL-2, Rb, p53). L'AS1411 est testé en phase II en monothérapie chez les patients atteints de cancers rénaux métastatiques (NCT00740441) et associé à la cytarabine chez les patients atteints de leucémie myéloïde aigüe récurrente (NCT00512083).

L'étude de l'hétérogénéité du GBM repose sur l'identification de biomarqueurs moléculaires, permettant de proposer des traitements de plus en plus personnalisés et répondant davantage à la composition et à l'évolution du GBM. Comme il a été décrit dans l'introduction de ce manuscrit, le développement de ligands spécifiques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ s'est intensifié ces dernières années (568,577). Néanmoins, ils restent peu nombreux. La sélection d'aptamères est une stratégie complémentaire à celle permettant de caractériser des inhibiteurs peptidiques non peptidiques ou des anticorps ciblant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Un aptamère spécifique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est actuellement disponible dans le laboratoire dont l'utilisation permet de détecter les cellules ou les tissus exprimant l'intégrine.

Review

Selection of Nucleic Acid Aptamers Targeting Tumor Cell-Surface Protein Biomarkers

Marie-Cécile Mercier, Monique Dontenwill and Laurence Choulier *

UMR 7213 CNRS, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Tumor Signaling and Therapeutic Targets, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France; marie-cecile.mercier@unistra.fr (M.-C.M.); monique.dontenwill@unistra.fr (M.D.)

* Correspondence: laurence.choulier@unistra.fr; Tel.: +33-36885-4197; Fax: +33-36885-4313

Academic Editor: Samuel C. Mok

Received: 9 May 2017; Accepted: 13 June 2017; Published: 21 June 2017

Abstract: Aptamers are nucleic acids referred to as chemical antibodies as they bind to their specific targets with high affinity and selectivity. They are selected via an iterative process known as ‘selective evolution of ligands by exponential enrichment’ (SELEX). Aptamers have been developed against numerous cancer targets and among them, many tumor cell-membrane protein biomarkers. The identification of aptamers targeting cell-surface proteins has mainly been performed by two different strategies: protein- and cell-based SELEX, when the targets used for selection were proteins and cells, respectively. This review aims to update the literature on aptamers targeting tumor cell surface protein biomarkers, highlighting potentials, pitfalls of protein- and cell-based selection processes and applications of such selected molecules. Aptamers as promising agents for diagnosis and therapeutic approaches in oncology are documented, as well as aptamers in clinical development.

Keywords: aptamer; SELEX; cell-surface biomarker

1. Introduction

Nucleic acid aptamers are single stranded DNA (ssDNA) or RNA molecules. They are selected through a fully in vitro well-established iterative process known as ‘selective evolution of ligands by exponential enrichment’ (SELEX) [1–3]. A large library of 10^{14} – 10^{15} ssDNA or RNA sequences of 20–50 variable bases is combined with a target, under temperature and buffer conditions dependent on requirements. During the partitioning step, nucleic acid molecules which bind to the target are selected while the vast majority of sequences which do not bind are washed away. Binding molecules are amplified thanks to the fixed primer-binding sequences flanking the variable region, by PCR or RT-PCR according to the nature of the oligonucleotide, ssDNA or RNA. Double-stranded DNA molecules are then separated from ssDNA in DNA-SELEX, or in vitro transcribed in RNA-SELEX by means of a T7-RNA polymerase binding site in the fixed region. The three steps (selection, partitioning and amplification) constitute a round of SELEX. Negative selection to environmental elements (usually supports of the SELEX process, like filters, beads . . .) and/or counter selection to target’s counterparts (like related proteins or cells) is usually performed, either before or after the positive selection, to eliminate non-specific binding nucleic acids. The rounds of selection are repeated several times, increasing stringency progressively, until molecules with the desired binding properties are cloned and sequenced. Those selected oligonucleotides are named aptamers, from the greek aptus (“to fit”) and the suffix “-mer”. Databases dedicated to aptamers provide information on targets of specific aptamers, length, molecular weight, extinction coefficient, GC (guanine-cytosine) content, chemistry, primary sequences, predictive secondary structures, as well as affinities, assay buffers . . . (for example, [4–6]).

More than 900 aptamers have been generated from SELEX [7] towards a wide range of targets such as inorganic ions, small organic ligands, amino-acids, nucleotides and derivatives, oligonucleotides, antibiotics, peptides, proteins, sugars, parasites, virus, cells and tissues; the most common targets remaining proteins. In oncology, the aptamer field is rapidly expanding. On 3 May 2017, Medline listed 1398 entries for 'aptamer and cancer', including 167 reviews, with more than half entries published in the last 4 years. Deregulation of cell-surface membrane protein expressions and activities are hallmarks of cancer cells. Receptors that are uniquely expressed, overexpressed or mutated in tumors are major pharmaceutical targets for therapies in the era of personalized medicine. Advances in genomic, proteomic, metabolomic techniques led to the discovery of tumor biomarkers including cell surface receptors (tyrosine kinase receptors, cell adhesion receptors, cell death receptors) [8–10]. A vast majority of drugs are currently designed to target such proteins/receptors and to inhibit their oncogenic activities [11]. Recent data emphasized the high inter- and intra-tumoral heterogeneity of histologically similar tumors, at genomic but also protein levels of relevant targets [12,13]. Failure of clinical trials for targeted therapies in non-stratified patient populations may be linked to this underappreciated tumor heterogeneity. Highly specific tools, such as aptamers, may represent molecular probes for labeling the targets on tumor samples and thus helping to patient stratification. In addition, accessibility of cell surface receptors for targeting with aptamers will allow not only molecular imaging but also the direct delivery of drugs to relevant cancer cells [14].

The success of a SELEX process relates to the identification of aptamers of high affinities and specificities for their targets. Identification of aptamers is more complex for cell-surface proteins which activities depend on their conformation and on their cellular environment than for non-amphipatic molecules. To target cell surface biomarkers, it can therefore be important when possible to choose selection conditions and processes mimicking as far as possible the targets natural environment. This review will thus focus on the main selection strategies which have been used to identify aptamers to tumor cell-surface proteins, highlighting differences, success, and limitations of the SELEX processes. Tumor cell-surface biomarkers used as targets for SELEX are listed in Table 1. This review includes three more tables describing characteristics and applications of aptamers identified by protein- and cell-based SELEX, for which targets are proteins and cells, respectively. For cell-based SELEX, a distinction has been made between pre- and post-identified targets. Powerful potential applications of aptamers as diagnostic and therapeutic agents in the field of oncology will be briefly discussed and recent developments of the few aptamers already in clinical trials in oncology described.

Table 1. Major functions of biomarkers cited in this review.

Biomarker	Major Functions of Biomarker in Cancer
Cell-adhesion molecules	
Epithelial cell adhesion molecule-EpCAM (CD326)	EpCam is a pleiotropic molecule able to promote and prevent epithelial cell-cell adhesion. Induces proliferation, up-regulates proto-oncogene (c-myc, cyclins A/E) and is involved in migration, proliferation, differentiation and metastasis. Circulating tumor cell marker Implicated in self-renewal of stem cells
Carcinoembryonic antigen-CEA (CD66e)	Implicated in cell adhesion, anoikis resistance, promotion of metastasis
Integrin $\alpha v \beta 3$	Essential for endothelial cell survival. Involved in cell growth and migration, tumor invasion, metastasis and angiogenesis
Integrin $\alpha 6 \beta 4$	Implicated in tumor cell growth, invasion and metastasis
Integrin αv	Endothelial adhesion receptor. Implicated in angiogenesis
Integrin $\alpha 4$	Prognostic marker in lymphocytic leukemia
E-and P-Selectin	Implicated in tumor cell adhesion to vascular endothelium, migration, proliferation of cancer cells and step of metastasis formation
L-Selectin	Roles in cell adhesion and in initiation of cell-cell interaction in vasculature system. Initiates events leading to leukocyte extravasations for the blood. Biomarker of naïve T cells

Table 1. Cont.

Biomarker	Major Functions of Biomarker in Cancer
Tyrosine kinase receptors	
EGFR	EGFR is a receptor tyrosine kinase expressed at the surface of cell. Involved in proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis. Associated with poor prognosis
EGFRVIII	The most common form of EGFR mutation. Associated with poor survival of patients.
PDGFR β	Promotes tumor cell motility
HER-2	Cell surface tyrosine kinase receptor. Implicated in proliferation, migration and angiogenesis
HER-3	Belongs to ErbB family (EGFR, ErbB2). Implicated in formation, progression of human tumor, aggressiveness and resistance to therapy. Implicated in poor prognosis
c-MET	Member of the receptor tyrosine kinase. Contributes to increased drug resistance in HER2 cells
Receptor tyrosine kinase-RET ^{C634Y}	Receptor tyrosine kinase involved in development and progression of cancer. Induces cell proliferation, cell survival, cell motility and invasion
Neurotrophin receptor TrkB	Mutated form of RET (proto-oncogene)
TGF β III receptor	Cancer cell resistance to chemotherapy. Promotes growth of cancer cells. Implicated in cell proliferation, differentiation, survival, and invasion
Protein Tyrosine Kinase 7-PTK7	Role in signal transduction. Role in disease is poorly understood but correlates with higher tumor grade
Insulin Receptor	Biomarker for leukemia
Axl	Receptor tyrosine kinase. Implicated in activation of MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways
	Implicated in cancer development and progression
	Belongs to TAM family of tyrosine kinase receptors. Implicated in invasiveness and metastasis
Cell membrane-associated enzyme	
Prostate specific membrane antigen-PSMA	Prostate tumor cell marker
Mucines	
MUC-1	Cell surface mucin glycoprotein
Tumor necrosis factor receptor (TNF-R) and co-stimulatory receptors	
T-cell receptor OX40	Member of TNF family receptors. Co-stimulatory receptor on CD4+ T cells. Increases immune response to cancer and foreign entities. Implicated in exacerbating effects of inflammation through the increased cytokine production (IL2) and in cell survival of CD4+ OX40+ T cells
T-cell receptor 4-1BB	Co-stimulatory receptor implicated in survival and expansion of activated T cells
Receptor activator of NF- κ B-RANK	NF κ B is a member of the tumor necrosis factor (TNF) receptor family. Implicated in osteoclast differentiation and in focal bone erosion and bone malignancies
CD28	Co-stimulatory receptor implicated in activation of T lymphocytes
Surface transmembrane glycoproteins	
CD133	Cancer stem cells marker
CD30 TNFRSF8	Hematological malignancies biomarker
Others	
Cytotoxic T cell antigen-4-CTLA-4	Receptor expressed on activated T cells. Reduction in T-cell responses and activation
B-cell-activating factor (BAFF)-receptor (BAFF-R)	BAFF is a member of the tumor necrosis factor (TNF) family cytokines. BAFF receptor is expressed on B-cells. Implicated in proliferation, maturation and cell survival of cancer B cells
CD124 (IL-4R α)	Implicated in survival and in suppressor activity of myeloid derived suppressor cells
VCAM-1	Member of the immunoglobulin-like super family. Implicated in recruitment of immune cells to inflammation sites
Toll-like receptor 3 ectodomain	Implicated in the production of INF- β and inflammatory cytokine
hyaluronic acid (HA) binding domain of CD44	Belongs to the proteoglycan family of transmembrane glycoproteins. Receptor for hyaluronic acid. Role in tumor growth and metastasis. Marker for subpopulations of tumor initiating cells and implicated in chemo resistance
Angiopoietin-1	Promotes endothelial cell survival and vascular impermeability. Prevents increase in endothelial cell adhesion molecule expression
Angiopoietin-2	Potentialisation of proangiogenic growth factors
CD71	Responsible for cellular iron transport. Rapidly proliferative cells require more iron.
Multidrug resistant-associated protein 1-MRP1	Cofactor for enzyme involved in DNA synthesis of proliferative cells
CD16 α	MRP1 correlates with chemotherapy drug resistance. Expressed in cancer stem cells
Alkaline phosphatase placental-like 2-ALPPL-2	Implicated in antibody dependent cellular cytotoxicity and recruitment of NK cells. NK cells are important for suppressing tumor metastasis and outgrowth
Nucleolin	Implicated in cell growth and invasion. Ectopically expressed on cell surface and in cell secretion
Immunoglobulin heavy mu chain	Multifunctional protein interacting with DNA and RNA. Involved in rRNA maturation, ribosome assembly and exportation of ribosome components to the cytoplasm
	Role in mRNA stabilization (example: role in stabilization of bcl-2 mRNA in human leukemia).
	Overexpressed on the surface of certain cancer cells
	Major component of the B-cell antigen receptor in Burkitt's lymphoma cells
	Implicated in transforming healthy cells and in cancer progression

2. Generalities on Aptamers

Owing to their three-dimensional conformation and the strong shape complementarity between aptamers and their targets, aptamers are known to recognize their specific target with high affinity and selectivity. Analogous to antibodies in their range of target recognition and variety of applications, they are referred as 'chemical antibodies' [15]. Aptamers though possess several advantages over antibodies: Temperature stability, self-refolding, easy production, and presumably lack of immunogenicity/toxicity . . . Due to their molecular weight, which is comprised between 10 and 30 Da, aptamers penetrate tissues faster and more efficiently than the 150 kDa antibodies [16]. Aptamers are chemically synthesized, rapidly, at reasonable cost, with no or low variation from batch to batch, and independently of any biological systems. Risks of viral and bacterial contamination are thus eliminated. Aptamers are thermally stable. Denatured at 95 °C, they refold into their correct three-dimensional conformation when cooled down to room temperature. To date, aptamers have never elicited toxicity in therapeutic applications.

RNA aptamers fold into more diverse three-dimensional structures than ssDNA aptamers, because of their 2'-hydroxyl (2'-OH) group on ribose and the non-Watson-Crick base pairing. The chemical production of ssDNA aptamers is easier and cheaper than RNA aptamers. But the preparation of ssDNA molecules during the SELEX process is more challenging than RNAs [17,18]. Nucleic aptamers suffer from two major disadvantages: their nuclease sensitivity, especially for RNA aptamers that can be cleared from the circulation within minutes or seconds [19], which limits their development as pharmaceuticals. Further, the chemical diversity of a 4 nucleotides based DNA and RNA library may be limited compared to that of a 20 amino acids based library. Developments allowed overcoming these weaknesses. The 2'-OH group is the naturally occurring cleavage site prone to nucleophilic attack. Typical modifications that can be inserted during the SELEX process include masking the nuclease-sensitive 2'OH group by replacing it with 2'fluoro (2'-F) or 2'-amino (2'-NH₂). Such modified pyrimidines are incorporated via an efficient engineered mutant T7 RNA polymerase [20]. Other modified nucleotides can also be incorporated in SELEX libraries like 2'-O-methyl nucleotides, locked nucleic acid (LNA), hexitol nucleic acid (HNA) [21–25]. Modifications, if they do not alter much specificity and target binding properties of aptamers, can be introduced post-selection. Those modifications include 2'-F, 2'-NH₂, 2'-thio (2'-SH), 2'-azido (2'-N₃), 2'-hydroxymethyl (2'-CH₂OH) or 2'-methoxy (2'-O-Me) groups, LNA [26]. Synthetic nucleic acids, named xeno nucleic acids (XNA), increase the resistance and also the diversity of such modified aptamers [27,28]. Gold et al. [29] demonstrated that the success rate of a conventional SELEX on difficult proteins is lower than 30% and improved this rate up to 84%, by the incorporation of four modified nucleotide triphosphate analogs: 5-benzylaminocarbonyl-dU (BndU), 5-naphthylmethylaminocarbonyl-dU (NpndU), 5-tryptaminocarbonyl-dU (TrpdU), and 5-isobutylaminocarbonyl-dU (iBudU). The idea was to expand the chemical diversity of aptamers by adding functional groups that mimic amino acid side chains [30]. These modifications enhance protein binding through direct hydrophobic contacts with the target protein, resulting in increased binding affinities and slower complex dissociation rates compared to unmodified aptamers. So called Slow Off-rate Modified Aptamers (SOMAmers), are developed by the SomaLogic Company (Boulder, CO, USA) to currently more than 1300 proteins. SOMAmers are used in SOMAscan™ assay, a highly sensitive proteomic tool for discovering and validation of biomarkers. Capping aptamers with inverted nucleotides is another alternative to reduce exonuclease degradation [31]. The native phosphodiester backbone of nucleotides can also be modified with boranophosphate or phosphorothioates [32–34]. The company NOXXON Pharma AG (Berlin, Germany) takes advantage of spiegelmers ('spiegel' means 'mirror' in German) to prevent enzymatic degradation in biological fluids [19,35]. Spiegelmers are artificial RNA-like molecules built from L-ribose units, images of natural D-units, highly resistant to nuclease degradation and much more stable in vivo, with lifetimes greater than 60 hours in plasma. The SELEX is performed with D-RNA libraries combined with mirror images of peptides or small proteins artificially synthesized with D-aminoacids. Once aptamers are identified, they are converted to stable L-RNAs and they bind to the

natural L-form of peptide or protein targets with equally high affinities. Three spiegelmers are actually in clinical trials, of which one in oncology (described in Section 5). This process is however limited to artificially synthesized targets. To increase their size, consequently reducing their systemic clearance and prolonging their in vivo half-lives, ssDNA and RNA aptamers are often coupled to bulky groups, such as poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly ethylene glycol (PEG), liposomes, streptavidin or cholesterol [36–41].

3. Protein- and Cell-Based SELEX Processes

Different SELEX processes have been developed for the selection of aptamers targeting tumor cell-surface protein biomarkers. Figure 1 illustrates the classical protein- and cell-based SELEX procedures, the two main methods that are used to identify aptamers to tumor cell-surface biomarkers for which targets are proteins and cells, respectively.

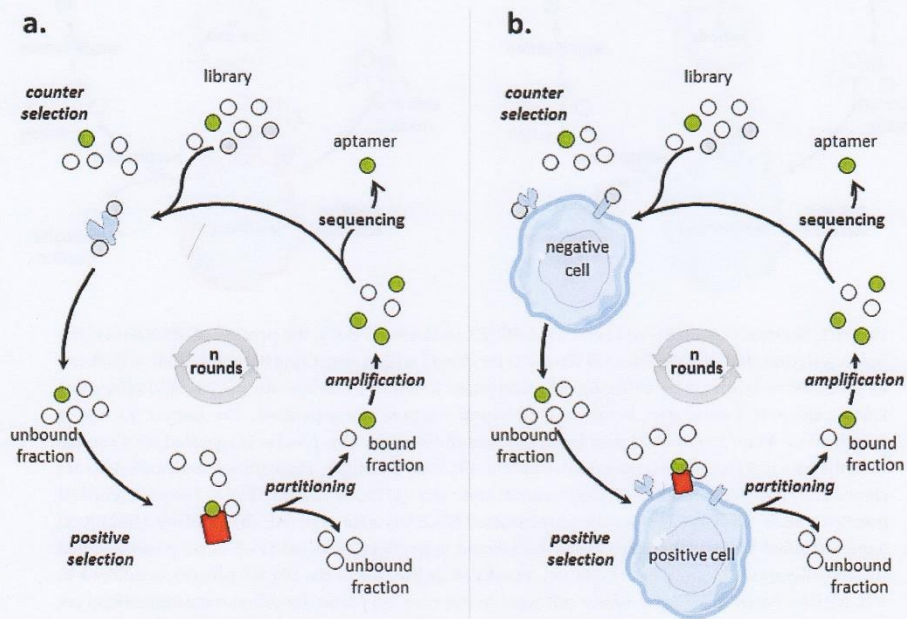


Figure 1. Cont.

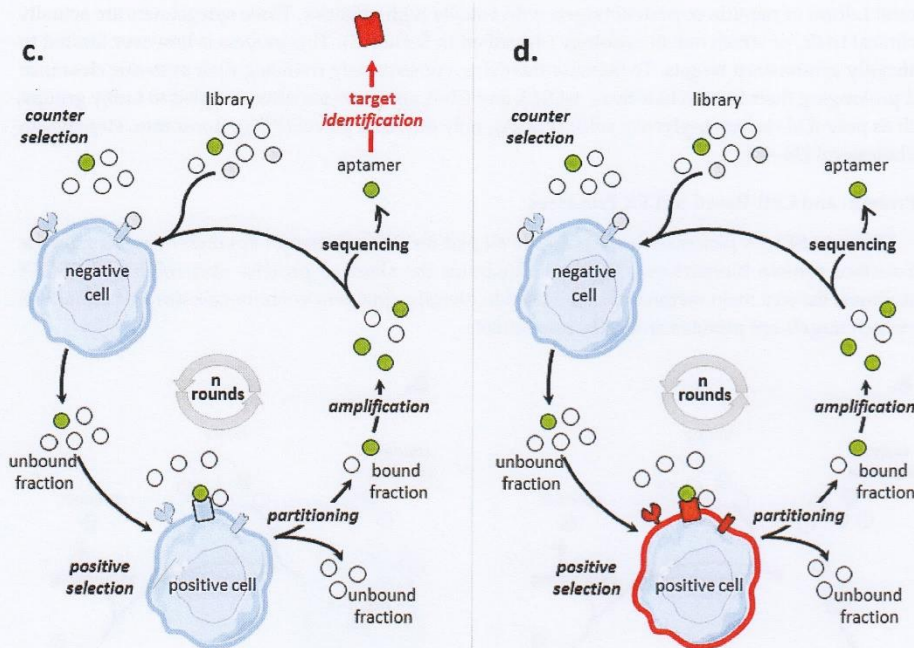


Figure 1. Scheme of protein- and cell-based SELEX processes. Briefly, the process of SELEX involves first a selection step: the nucleic acid library is incubated with a target (positive selection), which can be preceded or followed by a counter selection phase to remove non-specific nucleic acid molecules. During the partitioning step, bound and unbound fractions are separated. The bound fraction is amplified to obtain an enriched pool for next round of selection. This process is repeated for n rounds until the pool is enriched for sequences that specifically bind the target. These nucleic acid molecules are cloned and sequenced. Individual sequences are aptamers. (a) Protein-based SELEX. The pre-identified purified protein used as target for the protein-based SELEX is colored in red. (b) Cell-based SELEX on a pre-identified tumor cell-surface biomarker colored in red. (c) Cell-based SELEX on a post-identified tumor cell-surface biomarker. The target, identified at the end of the SELEX process, is colored in red. (d) Cell-based SELEX to a tumor cell type. In this case, no particular cell-surface biomarkers are identified and aptamers are specific to the cell's molecular signature. The whole cell used for positive selection is colored in red.

3.1. Aptamers Selected by Protein-Based SELEX

Protein SELEX is the simplest form of SELEX process (Figure 1a). Table 2 provides an inventory of most of tumor cell-surface protein biomarkers selected by protein-SELEX. Aptamers selected by protein-based SELEX have been reported for cell-adhesion molecules, tyrosine kinase receptors, cell membrane-associated enzymes, mucins, T-cell receptors, co-stimulator receptors, surface transmembrane glycoproteins ... Some of the biomarkers have been subjects to different SELEX procedures, like integrin $\alpha\beta3$, MUC-1, L-selectin and CD44 and the tyrosine kinase receptors EGFR, HER-2, and c-Met. Many factors varied, like the nature and the number of random nucleotides of the library, the separation procedures, the numbers of selection rounds. All of these selection procedures lead to aptamers of high affinities for their targets, usually in the low nanomolar range.

Table 2. Aptamers to tumor cell-surface biomarkers selected by protein-based SELEX (updated since 2011 [42–44]).

Biomarker	Target Used for Protein-SELEX	Aptamer Library	Number of Variable Nucleotides	Number of Rounds of Selection	Separation Method	Name of Selected Aptamers	K _D	Applications	Year	References
Cell-adhesion molecules										
Epithelial cell adhesion molecule-EpCAM (CD326)	His-tagged C-terminal domain of EpCAM	2'F-RNA	40	12	affinity chromatography	Truncated EpCAM RNA aptamer	55 nM to human cells	Target stem cell marker. Potential applications: development of targeted cancer nanomedicine and molecular imaging agents	2011	[45]
EpCAM	His-tagged C-terminal domain of EpCAM	DNA	40	12	affinity chromatography	Truncated aptamer SYL3C	38 and 67 nM to cells	Imaging (confocal) Cancer cell capture	2013	[46]
Carcinoembryonic antigen-CEA (CD66c)	His-tagged recombinant protein of full-length CEA	2'F-RNA	40	17	affinity chromatography	Group I, II and III	low nM range	Inhibition of cell migration/invasion in vivo. Promotion of cell anoikis resistance in vitro Inhibition of liver metastasis in vivo Inhibition of endothelial cell adhesion and proliferation	2012	[47]
Integrin α v β 3	purified α v β 3 integrin	2'F-RNA	50	15–17	affinity chromatography	Apt- α v β 3	nM range	Reduction of endothelial cell tube formation Inhibition of cancer cell proliferation and adhesion (HUVCEC) Increases endothelial cell apoptosis Recognizes distinct binding sites on a single target (α V or β 3) with minimal cross-reactivity	2005	[48,49]
Integrin α v β 3	purified α v β 3 integrin	2'F-RNA	50	6	MAI-SELEX ¹	α V-1 and β 3-1	8.9–10.5 nM	Potential applications: molecular diagnosis and targeted therapies Inhibition of cancer cell adhesion Potential applications in therapies during metastasis formation	2012	[50]
E-and P-Selectin	recombinant human E-selectin/IgG-Fc-chimeras	DNA	50	17	affinity chromatography	SDA	100 nM	Inhibition of cancer cell adhesion Potential applications in therapies during metastasis formation	2014	[51]
L-Selectin	L-selectin-Ig chimera	2'-NH ₂ RNA	40	14	affinity chromatography	14.12	0.2–3 nM range	Preferential blockade of a specific selectin	1996	[52]
L-Selectin	L-selectin-IgG fusion protein	DNA	40	17	affinity chromatography	LD201, LD174 and LD196	1.8, 5.5 and 3.1 nM	Inhibition of lymphocyte rolling on endothelial cells	1996	[53]

Table 2. Cont.

Biomarker	Target Used for Protein-SELEX	Aptamer Library	Number of Variable Nucleotides	Number of Rounds of Selection	Separation Method	Name of Selected Aptamers	K _D	Applications	Year	References
Tyrosine kinase receptors										
EGFR	purified extracellular domain of human EGFR	RNA	62	12	not documented	J18	7 nM	Drug delivery (internalization of gold nanoparticles) Potential application: delivery of siRNA and cancer detection	2010	[54]
EGFR	human EGFR-Fc protein	2'F-RNA	62	9 + 7-9 rounds with a 30% doped sequence (from aptamer E01)	affinity chromatography	E07 Internalized	2.4 nM	Prevention of proliferation of tumor cells (blocks receptor autophosphorylation) Drug delivery (Gemcitabine) and induces cell death	2011	[55,56]
EGFR	purified extracellular domain of EGFR	DNA	40	11	affinity chromatography	Tutu-22	56 nM	Recognizes EGFR-positive cancer cells with strong affinity and selectivity Potential applications: development of novel targeted cancer detection, imaging and therapy	2014	[57]
EGFRVIII	histidine-tagged EGFRVIII ectodomain (<i>E. coli</i> system) recombinant	2'F-RNA	40	12	affinity chromatography	E21	33 nM	Disruption of post-translational modifications of immature EGFR-III Induction of apoptosis	2009	[58]
HER-2	glutathione S-transferase (GST)-tagged ErbB2 protein (22-122 amino acids)	2'F-RNA	50	15	affinity chromatography	SE15-8	low nM range	High specificity to ErbB2 and not to other members of the ErbB family Potential applications: drug delivery and imaging for in vivo diagnosis	2011	[59]
HER-2	peptide from the juxtamembrane region of HER2 extracellular domain	DNA	40	multiple	affinity chromatography	HB5	18.9 nM	Drug delivery (Doxorubicin)	2012	[60]
HER-2	20-amino acid HER2 peptide	Thio-DNA	21	12	affinity chromatography	HY6	172 nM	Potential application: targeted therapy	2015	[61]
HER-2	His-tagged Her2-extra cellular domain (<i>E. coli</i> system)	DNA	40	15	membrane filtration	ECD_Apt1	6.33 nM	Potential applications: theranostic (non invasive cancer diagnosis), therapeutics and monitoring patient compliance	2017	[62]
HER-3	extracellular domains of HER3 produced in S2 insect cells	RNA	49	15	membrane filtration and gel shift assay	A30	0.1 nM range	Inhibition of HER3 activation and growth of tumor cells Potential application: anticancer drug	2003	[63]
c-MET	c-Met-Fc	DNA	40	12	membrane filtration	CLN3 and CLN4	91 pm and 11 nM	Recruits NK cells to tumor and induces ADCC	2011	[64]
c-MET	c-Met-Fc	2'F-RNA	40	16	membrane filtration	CLN64	1 nM	Inhibition of tumor cell migration Potential application: therapeutics and diagnosis	2015	[65]

Table 2. Cont.

Biomarker	Target Used for Protein-SELEX	Aptamer Library	Number of Variable Nucleotides	Number of Rounds of Selection	Separation Method	Name of Selected Aptamers	K _D	Applications	Year	References
Cell membrane-associated enzyme										
Prostate specific membrane antigen-PSMA	706 extracellular amino acids of PMSA	2'-F-RNA	40	6	affinity chromatography	A9, A10, A10-3 after minimization & optimization	low nM range	Promotion of tumor regression Delivery of siRNA Potential application: diagnosis and therapies	2002	[66,67]
MUC-1	MUC-1 peptides of 2 lengths: 9 and 60 amino acids	DNA	25	10	affinity chromatography	S1.3/S2.2	low nM range to 0.1 nM	Potential application: detection by fluorescent microscopy	2006	[68]
MUC-1	His-tagged unglycosylated form of the MUC1 protein containing five tandem repeats of the VTR (<i>E. coli</i> system)	DNA	25	10	affinity chromatography	MUC1-STR-1, 2, 3, 4	47–85 nM	Potential application: diagnosis assays for early or metastatic diseases	2008	[69]
Tumor necrosis factor receptor (TNF-R) and co-stimulatory receptors										
T-cell receptor OX40	extracellular domain of OX40-Fc fusion protein	2'-F-RNA	40	9–11	affinity chromatography	9C7, 11F11	2–10 nM for purified OX40 protein and # 50 nM for OX40 on activated T cells	Increasing proliferation of T lymphocytes and production of IFN- γ . Potential application: therapeutics in association with dendritic cell-based vaccines (adoptive cellular therapy) Induces nuclear localization of NF- κ B, cytokine production and cell proliferation. Increases dendritic cell based tumor vaccine effects	2013	[70]
T-cell receptor OX40	murine extracellular domain of OX40-Fc fusion protein	2'-F-RNA	40	11	affinity chromatography	9.8	8 nM	Inhibition of tumor growth in vivo. Potential application: therapeutic manipulation of the immune system	2008	[71]
T-cell receptor 4-1BB	murine extracellular domain of 4-1BB-Fc fusion protein	2'-F-RNA	40	12	affinity chromatography	M12-Z3 (multimeric aptamer)	40 nM	Inhibition of tumor growth in vivo. Potential application: therapeutic manipulation of the immune system	2008	[72]
Receptor activator of NF- κ B-RANK	recombinant human soluble RANK/IgG ₁ Fc chimera	RNA	40	7	affinity chromatography	apt1, apt2 and apt3	0.33, 1.8 and 5.8 μ M, 100 nM for the 2'-F version of aptamers	Potential application: therapeutics against osteoclastogenesis	2004	[73]
CD28 ²	murine recombinant CD28-Fc fusion protein	2'-F-RNA	25	9	affinity chromatography	CD28Apt2 and CD28Apt7	60 nM for CD28Apt7-dimer	Potentialisation of antitumor vaccine efficacy Reduction of tumor progression and increased overall survival (in vivo) Potential application: enhancing vaccine-induced immune responses	2013	[74]

Table 2. Cont.

Biomarker	Target Used for Protein-SELEX	Aptamer Library	Number of Variable Nucleotides	Number of Rounds of Selection	Separation Method	Name of Selected Aptamers	K _D	Applications	Year	References
					Others					
Cytotoxic T cell Antigen-4/CTLA-4	murine CTLA-4/Fc fusion protein	2'-F-RNA	40	9	membrane filtration	M9-9	30–60 nM	Increases tumor immunity (in vivo) Potential application: immunotherapy	2003	[75]
B-cell-activating factor (BAFF)-receptor (BAFF-R)	Human recombinant BAFF-R protein	2'-F-RNA	50	12	membrane filtration	R-1, R-2 and R-14	47, 95 and 96 nM	Delivery of siRNA. Potential application: combinatorial therapeutics	2013	[76]
CD124 (IL-4R α)	recombinant IL4R α protein enzymatically cleaved	2'-F-RNA	40	5	affinity chromatography	cL42	14 nM for recombinant protein and 788 nM for MCS2 cells	Induction of MDSCs apoptosis Promotes CD8+ T cell infiltration and reduces the number of MDSCs infiltration. Reduction of tumor progression in vivo	2012	[77]
VCAM-1	N-terminal fragment of VCAM-1	2'-F-RNA	40	12	affinity chromatography	12.11	10 nM	Potential application: imaging	2007	[78]
Toll-like receptor 3 ectodomain	Toll-like receptor 3 ectodomain with N-terminal FLAG and C-terminal His	RNA	40	7	membrane filtration	Family-I and Family II	# 3 nM	Aptamer without agonist and antagonist effects	2006	[79]
hyaluronic acid (HA) binding domain of CD44	HA-binding domain of human CD44 (cell-free expression system)	Thio-DNA	30	10	affinity chromatography	TA1-TA6	180–295 nM	Potential applications targeted therapy and imaging	2010	[80]
CD44	GST-tagged human recombinant full length CD44 protein	2'-F-RNA	45	11	affinity chromatography	Apt1	81.3 nM	Potential applications therapeutic (targeted delivery against stem cells) and diagnosis	2013	[81]
Angiopoietin-1	recombinant human Ang1	2'-F-RNA	40	9	membrane filtration	ANG9-4	2.8 nM	Inhibition of cell endothelial cell survival	2008	[82]
Angiopoietin-2	recombinant human Ang2	2'-F-RNA	40	11	membrane filtration	11-1 and truncated 11-1.41	3.1 and 2.2 nM	Inhibition of angiogenesis (in vivo)	2003	[83]

¹ Integrin $\alpha v\beta 3$ is a heterodimeric transmembrane protein composed of α and β chains, for which the selection procedure of a 2'-fluoro aptamer has been patented [48]. In order to select for aptamers specific to homodimer αv and $\beta 3$, Gong et al [50], developed a strategy called MAI-SELEX (MAI for multivalent aptamer isolation). Two distinct selection stages were employed, the first being a classical affinity selection on the purified full-length $\alpha v\beta 3$ integrin. The second module, for specificity, leads selection to $\beta 3$ as integrin $\alpha 11\beta 3$ served as a protein decoy. Two aptamers, specific for αv and $\beta 3$ were identified with affinities in the low nanomolar range. This selection strategy applied to heterodimeric proteins is limited to the availability of decoy proteins. ² Aptamer, GR1, targets CD28. This G-rich oligonucleotide, which, alike AS1411 [84], has not selected by SELEX, inhibits CD28 T cell responses in vitro and in vivo [85].

Cell surface proteins used as targets for protein-based SELEX are either full-length or truncated versions of full length proteins, generally recombinant ectodomains coupled to tags (His-tags, Fc fragments of antibody or GST), facilitating purification and selection by affinity. Peptides can also be used as targets. In that case, the advantages linked to the exact knowledge of the aptatope, and to the facility of production of large amounts of targets can be offset by the limitations of these peptides as protein mimics. Cell-surface proteins are amphipatic membrane proteins, and therefore not easily extracted from the lipidic membrane, purified and solubilized. Even though membrane proteins can be purified and solubilized, large amount of proteins are needed for a whole protein-SELEX procedure. Further, full-length membrane proteins or ectodomains, expressed in prokaryotic or lower eukaryotic systems, may lack or have different post-translational modifications (phosphorylation, glycosylation, ubiquitination, methylation, myristoylation, acetylation . . .). For example, the 2'F-RNA aptamer E21, elicited against the EGFRvIII ectodomain produced in bacteria, did not bind to the native protein expressed from eucaryotic cells because glycosylation, a post-translational modification present only in eukaryotic systems, significantly alters the structure of the target protein [58].

Some of the biomarkers have been subjects to different SELEX, like MUC-1, that allowed comparison between aptamers targeting proteins and peptides mimics of proteins. For example, Ferreira et al. [68] selected ssDNA aptamers targeting two peptides of the native MUC1. They used the 9-amino-acid immune-dominant antibody-binding epitope APDTRPAPG which contains only part of the variable tandem repeat region of MUC-1, as well as a larger peptide (60 amino acids long) which comprised three complete tandem repeats of the MUC1 region. From a preceding experience with an antibody binding to MUC1, the short peptide was weakly binding to the antibody compared to longer peptides, possibly due to increased flexibility resulting in higher entropic cost [86]. The two SELEX on the two peptides of different lengths resulted in identical aptamer sequences with affinities as low as 0.1 nM. Moreover, aptamers selected on the short peptide have been shown to successfully recognize and bind to the native MUC1 at the surface of the MCF7 breast cancer cell line. In comparison, the same group has selected aptamers to the MUC-1 protein with higher K_D (47–85 nM) than those obtained for aptamers to peptides, which might be due to an unstructured MUC-1 protein [69].

Overall, the main disadvantage of protein SELEX is that purified and solubilized membrane proteins, recombinant proteins and peptides may not adopt the same state (in terms of lengths, conformation, post-translational modifications . . .), than the cell-surface biomarker in its endogenous environment. Thus, some aptamers selected against purified membrane proteins failed to recognize their targets in whole cells [58,78], limiting their use for medical applications [87]. Moreover, some biomarkers like receptors require co-receptors for proper folding, that prevents the use of protein-SELEX. Other processes, like cell-based SELEX using whole living cells as targets may overcome these limitations.

3.2. Aptamers Selected by Cell-Based SELEX

The general process of cell-SELEX is shown in Figure 1b–d. In cell-based SELEX, the target of the selection is embedded in its native environment in cells. PubMed indicates 829 entries with 'cell SELEX' of which more than 1/3 are on 'cancer and cell SELEX'. There has been growing developments in cell-SELEX these last years. Recent reviews detail advances in aptamer selection technology, particularly the high-throughput next-generation sequencing and bioinformatics [88], the cell-SELEX process [89], the evolution of complex target SELEX [90]. For example, FACS (Fluorescence activated cell sorting) SELEX aims at removing, from the cell suspension, dead cells which could have an impact on the selection [91–93]. In Internalized cell-SELEX, aptamers are selected on their ability to bind to cell-surface target and to internalize in the cell [94–100]. Nucleic acid sequences which do not internalize are eliminated. To best mimic the natural environment of targets, Souza et al. [101] developed 3D cell-SELEX, in which aptamers are selected on spheroid cells in 3D cell culture by magnetic levitation method to mimic the tissue microenvironment in vitro.

3.2.1. Cell-Based SELEX to Identify Aptamers to Tumor Cell-Surface Protein Biomarkers

Depending on the objective, knowledge of the target identity prior to selection can be useful, or not. Therefore, different strategies can be distinguished:

Pre-Identified Tumor Cell-Surface Biomarkers

When the objective of a cell-based SELEX is the identification of aptamers to a clearly identified cell-surface biomarker (Figure 1b), the SELEX procedure is sometimes termed TECS-SELEX for 'target expressed on cell surface-SELEX' [102]. In Table 3, selections by cell-based SELEX realized on pre-identified tumor cell-surface biomarkers are described. Many identical tumor biomarkers, in particular tyrosine kinase receptors, EpCAM and integrins, were used as pre-identified targets for protein- and cell-based SELEX (Tables 2 and 3). As an example of solid tumor targeted by cell-based SELEX, Delac et al. [103] reviewed aptamers designed to target glioblastoma cells. Some of the key cell surface molecules that have been identified as glioblastoma biomarkers (transferrin receptor, $\alpha\beta$ integrin, EGFR, EGFRvIII) [104], have already been targets of protein- and/or cell-based SELEX (Tables 2 and 3).

Different procedures have been developed to direct the recognition of the target by the aptamer. For example, ligand-guided selection (LIGS) SELEX guides the selection to a specific epitope of a known cell-surface target. Zumur et al. [105,106] used antibodies as secondary ligands to elute specific aptamers. The antibody interacts with its cognate antigen to outcompete aptamers specific for a pre-determined cell-surface receptor and replace specific aptamers from an enriched SELEX pool. Immunoprecipitation (IP) SELEX is an approach combining cell-SELEX and protein-nucleic acid immunoprecipitation to ensure that aptamers bind to a pre-identified target [7,107]. Hybrid-SELEX, also called cross-over SELEX, is a combinatorial approach to guide selection towards a pre-identified target. Usually, the first rounds of selection are realized on cells which express the target by cell-SELEX, and then rounds of selection are realized on the same version of the target in its purified form by protein-based SELEX. A reverse hybrid-SELEX combines first protein-SELEX followed by cell-SELEX. Hybrid- or reverse hybrid-SELEX have been used to isolate aptamers targeting the RET^{C634Y} mutant receptor tyrosine kinase overexpressed in PC12 cells [108], the HER-2 tyrosine kinase receptor expressed in SKOV3 ovarian cancer cells [109], CD16 α on Jurkat cells overexpressing CD16 alloforms [64], integrin $\alpha\beta$ 4 on PC-3 cells [110], the transferrin receptor CD71 expressed in HeLa cells [94]. In this last example, a combination of protein-SELEX and cell-internalized SELEX was realised. Soldevilla et al. [111] used another variant of reverse hybrid-SELEX, combining cell-SELEX to peptide-SELEX. Ten rounds of selection were first realized by peptide-SELEX, followed by one round of cell-SELEX on a chemotherapy-resistant tumor cell line that highly express MRP1 (H69AR).

Cell-based SELEX involves positive selection to collect aptamers that interact specifically with the target cells and usually counter selection to eliminate nonspecific nucleic acid sequences binding to negative cells. Different human tumor cell lines have been used for positive selection: glioblastoma (U251, U87MG), breast carcinoma (SKBR-3, N202.1), ovarian cancer (SKOV3), gastric cancer (N87), lung carcinoma (A549, H69), lymphoma (Jurkat, K299T), liver cancer (HepG2), prostate adenocarcinoma (PC-3), cervical cancer (HeLa). The PC12 cell line derived from pheochromocytoma of the rat adrenal medulla has also been used, as well as other non-tumoral cells lines, like Chinese hamster ovary (CHO), Human embryonic kidney (HEK) cells. The choice of the couple of cells used for positive- and counter-selections is of great importance for cell-based SELEX on pre-identified cell-surface protein. The two cell type should display a high difference in target expression levels, so that aptamers interact specifically with the target on positive cells and does not interact with cells used for counter-selection which does not display or displays lower levels of the target protein. For positive selection, the pre-identified target can be naturally expressed or over-expressed at the surface of the cell line. Cells used for counter selection are chosen in light of positive cells. In the literature, cell lines used for counter selection were:

(i) isogenic to cells used for positive selection. Most of the cell-based SELEX process used cells overexpressing the target of interest for the positive selection, and the parental cell line for counter selection (Table 3). As an example over many others, a cell-based SELEX was realized on Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cells ectopically expressing human transforming growth factor- β type III receptor while CHO-K1 cells were used for counter selection [102]. In two examples described in Table 3, both on integrins, cells used for counter-selection were under-expressing the target. In the first example, the parental isogenic cell lines are used for the positive selection. Berg et al. [110] used this strategy to select an ssDNA aptamer specific for $\alpha 6\beta 4$ integrin in its native state. Five rounds of positive cell selection were realized on PC-3 cells. PC-3 $\beta 4$ integrin (ITGB4) knockdown cells were used in a preselection step to deplete aptamers specific for cell surface marker other than $\beta 4$ sub-unit. However, the counter-selection strategy was found to be insufficient. And seven more rounds of protein-SELEX were performed on a recombinant $\alpha 6\beta 4$ protein to select for $\alpha 6\beta 4$ -specific aptamers. In the second example, HEK293 cells lines are used. For positive selection, HEK293 cells were manipulated to generate positive αv selection cells by overexpressing ITGAV. For counter selection, the same cell line was depleted in ITGAV with microRNA-mediated silencing. Takahashi et al. [112] named this strategy Icell-SELEX for isogenic cell SELEX.

(ii) unrelated to cells used for positive selection. Two studies [113,114] related the use for positive selection of the breast cancer cell line SK-BR3 modified to overexpress HER-2. For counter-selection, the human breast cell types MDA-MB-231 and MDA-MB-468, respectively underexpressing and negative for HER-2 were used. Twelve and sixteen rounds of selection were performed to select RNA- [113] and ssDNA- [114] aptamers. According to Dastjerdi et al. [114], the use of the HER2 underexpressing cell line (MDA-MB-231) in Kang et al's study [113], instead of a HER2-negative cell line may have compromised counter selection. A hybrid-SELEX strategy was used to get aptamers to the surface transmembrane glycoprotein CD30 [115]. For the cell-SELEX, lymphoma cells K299T and Jurkat cells were used for positive and counter-selection, respectively.

(iv) inexistent or not documented [116]. ssDNA aptamers to HER-2 have recently been selected through a hybrid-SELEX [109], combining 8 rounds a protein-SELEX using the His-tagged extracellular domain of HER-2 and 7 rounds of cell-SELEX on HER-2 over-expressed in SKOV3 cancer cells. Human serum albumin was used for negative screening in protein-SELEX and added to ssDNA pools during cell-SELEX, but no cells were used for counter-selection. Post-selection, HER2-negative MCF7, MDA-MB-435 and MDA-MB-231 cells were used to test the specificity of aptamers. Seven aptamer candidates from hybrid-SELEX were radiolabeled with ^{18}F and further screened in vivo by PET imaging in a SKOV3 tumor model. Two aptamers, Heraptamer-1 and-2 which had relatively high tumor uptake ratios, are promising ligands for HER-2 imaging in cancer. A similar approach was used by Wilner et al. [94]. Four rounds of protein-SELEX were performed using the His-tagged recombinant transferring receptor CD71 (TfR) as target, followed by 1 round of cell-SELEX on HeLa cells, a human cervical cancer cell line known to express TfR. Following the first round, a negative selection step was performed in which the library was pre-incubated with Ni-NTA agarose prior to the positive selection. But the cell-SELEX procedure did not include counter-selection steps.

Table 3. Aptamers selected by cell-based SELEX on pre-identified tumor cell-surface biomarkers.

Biomarker	Aptamer Library	Number of Variable Positions	K _D Range	Number of Positive Selection Rounds (selection method) ¹	Cells Used for Positive Selection	Cells Used for Counter-SELEX	Applications	References
Tyrosine kinase receptors								
EGFRvIII	DNA	30	0.62–37.57 nM	14	U87-EGFRvIII U87-MG, GBM cells overexpressing EGFRvIII	U87-MG	Potential applications: delivery of chemical drug and diagnosis	[17]
EGFRvIII	DNA	40	3–16 nM	11	U87-MG, GBM cells overexpressing EGFRvIII	U87-MG	Imaging (radiolabeled 188Re, in vivo) Potential applications: diagnosis in stratifying patient and monitoring treatment	[18]
HER-2	RNA	40	94.6 nM	20	HER-2-overexpressing SK-BR-3 cell line	MDA-MB-231, a HER-2-overexpressing breast cancer cell line	Potential application: therapy	[13]
HER-2	2'F-RNA	20	46–82 nM	9 (cell-internalization SELEX)	N202.1A mammary carcinoma clonal cell lines expressing high levels of surface HER-2/neu.	N202.1 E clonal cell line has no detectable surface expression of the HER2/neu oncoprotein.	Drug delivery (Bd-2 siRNA) Induces chemosensitisation and reduces drug resistance	[100]
HER-2	DNA	50	Not documented	4 rounds	Cloned extract of ErbB-2-overexpressing N87 cells	Not documented	Acceleration of ErbB-2 degradation in lysosomes Inhibition of growth of tumor cell in vitro and tumor mass in vivo	[16]
HER-2	DNA	30	5–23 nM	8 rounds of protein SELEX followed by 7 rounds of cell-SELEX (hybrid-SELEX)	HER-2 overexpressed in SKOV3 ovarian cancer cells	No cells	FET imaging (radio labeled, in vivo)	[109]
HER-2	DNA	40	Not documented	16	HER2-overexpressing breast cancer cell line, SK-BR3	HER2 negative breast cancer cell line, MDA-MB468	Development of a new method to monitor the enrichment of aptamers in a given round of cell-SELEX	[114]
Receptor tyrosine kinase-RET ^{C634Y}	2'F-RNA	50	Tens of nM	15 rounds of selection on cells, followed by 7 rounds on purified protein (hybrid SELEX)	RET ^{C634Y} mutant receptor expressed in PC12 cells (PC12/MEN2A)	PC12	Potential applications: diagnosis, imaging and therapy	[108]
Neurotrophin receptor TrkB	2'F-RNA	20	2 nM	4 (cell-internalization SELEX)	TrkB-expressing HEK cells	HEK	Neuroprotective effects Potential in therapy for neurodegenerative disease	[119]
TGFβ III receptor	2'F-RNA	60	1 nM	11	Other kinase receptors TGFβ III receptor ectopically expressed on CHO-K1 cells Transferrin receptors (TR)	CHO-K1	Potential application: therapy through inhibition of TGFβIII receptor	[102]
CD71	2'F-RNA	50	nM range	4 rounds of protein-SELEX on the His-tagged recombinant protein and 1 round on cells (hybrid SELEX combined with cell-internalization SELEX)	HeLa cells, a human cervical cancer cell line known to express TR	NO cells	Delivery of siRNA Targets cell in liposomes	[94]
Multidrug resistant-associated protein 1-MRP1	2'F-RNA	25	50 nM	10 rounds of peptide-SELEX followed by 1 round of cell-SELEX (hybrid-SELEX)	ATP-binding cassette (ABC) transporters chemotherapy-resistant tumor cell line that has high MRP1 expression (H69AR)	Parental cell line H69	Reduction of cell growth in vitro and improved survival in vivo	[111]

Table 3. Cont.

Biomarker	Aptamer Library	Number of Variable Positions	K _D Range	Number of Positive Selection Rounds (selection method) ¹	Cells Used for Positive Selection	Cells Used for Counter-SELEX	Applications	References
Cell adhesion molecules								
Epithelial cell adhesion molecule-EpCAM (CD326)	DNA	40	μM range	7 (FACS-SELEX)	EpCAM over-expressed in HepG2 cells	HepG2 cells	Potential application: stem cell marker	[120]
Integrin α6β4	DNA	39	139 nM	5 rounds of cell-SELEX followed by 7 rounds of protein-SELEX (hybrid-SELEX)	PC-3 cells	PC-3 β4 integrin (ITGB4) knockdown cells	Imaging (confocal) Potential application: drug delivery	[110]
Integrin αv	RNA	35 & 40	359–408 nM	13 (Isogenic cell-SELEX)	Human HEK293 cells manipulated to generate positive αv selection cells by overexpressing ITGAV	Human HEK293 cells depleted in ITGAV with microRNA-mediated silencing.	Potential application: targeting channels, transporters ...	[112]
CD16a	DNA	40	6–429 nM	9 rounds of protein-SELEX and 6 rounds of cell-SELEX (hybrid-SELEX)	Fc receptors CD16 ₆ -6His and CD16 ₆ -Val-158 or Phe-158 alloforms expressed on recombinant Jurkat cells	Jurkat E6.1 cell line	ADCC (tumor cell lysis)	[64]
CD133	2'F RNA	40	Not determined	6	Surface transmembrane glycoproteins HEK293T expressing CD133	His-tagged irrelevant protein expressed in HEK293T	Potential application: target cancer stem cells and molecular imaging	[121]
CD30 TNFRSF8	DNA	30	nM range	20 rounds of cell-SELEX followed by 5 rounds on purified His-tagged CD30 protein (hybrid-SELEX)	CD30-positive K299 T-cells lymphoma	Jurkat cells	Potential application: therapy	[115]

¹ Selection method is specified if it is different from classical cell-SELEX.

Post-Identified Tumor Cell-Surface Biomarkers—Discovery of Tumor Biomarkers

Aptamers are valuable tools to isolate tumor-specific biomarkers [122–124], as cell-based SELEX can also be used to identify targets after the selection (Figure 1c). The idea is first to select and identify aptamers specific for a tumor cell type, and then to use these high-affinity aptamers as probes to identify their cell-surface targets. These cell-surface targets, specific for tumor cells under study, are identified as (new) biomarkers. The main challenge is the identification of the protein target, usually by affinity purification followed by mass-spectrometry. The first post cell-SELEX identification of a tumor biomarker was realized in 2003 by Daniels et al. [125]. The U251 glioblastoma cell line was used as target for positive selection. Counter selection rounds were not included in SELEX. Twenty-one rounds of cell-SELEX using a 34 nucleotide long random library of ssDNA were performed to select aptamer GBI-10, shown to be the ligand for Tenascin-C, which is not a cell-surface receptor, but an extracellular matrix protein. Table 4 presents some (certainly not all) tumor cell-surface protein biomarkers which have been identified post-SELEX.

The ssDNA aptamer AS1411 in clinical trials as a novel treatment for cancer is original compared to all other aptamers cited in this review, as its discovery does not result from a SELEX approach. It is referred as an aptamer as its activity arises from binding to a specific target via shape-specific recognition. Briefly, Bates et al. [84], in the late 1990's, tested G-rich oligonucleotides (GRO) in a variety of cell lines and showed that they had unexpected anti-proliferative effect. AS1411 is a 26-nucleotide GRO, which forms quadruplex. It blocks the activation of secondary targets (NF- κ B, and B-cell lymphoma 2, BCL2), sensitizes tumor cells to chemotherapy, has direct anti-proliferative effects *in vitro*, is efficiently internalized even at nanomolar doses ... [126,127]. Later, aptamer AS1411 was found to target nucleolin [127,128], a multifunctional protein that was first considered to be nucleolar. Nucleolin was found to be highly expressed by cancer cells, intracellularly but also at the cell surface. A recent review described uses and mechanisms of the G-quadruplex oligonucleotide AS1411 as a targeting agent [129].

Table 4. Aptamers Selected by Cell-Based SELEX on Post-Identified Tumor Cell-Surface Biomarkers.

Biomarker	Aptamer Library	Applications	References
EGFR	2'F-RNA	Induces EGFR-mediated signal pathways causing selective cell death	[130]
		Inhibits tumor growth <i>in vivo</i> Combined cetuximab-aptamer treatment shows clear synergy in inducing apoptosis <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> Potential application: translational therapy	
PDGFR β	2'F-RNA	Inhibition of receptor signaling and of glioblastoma-derived tumor growth Inhibition of cell migration and proliferation Induction of differentiation	[99]
Alkaline phosphatase placental-like 2-ALPPL-2	2'F-RNA	Targets ALPPL-2 in both membrane bound and secretory forms Potential applications: diagnosis, imaging and therapy	[131]
selectin L and integrin $\alpha 4$	DNA	Potential application: therapeutic intervention	[132]
CD44/CD24	DNA	Potential applications: disruption of therapeutic resistance, invasion and angiogenesis	[133]
CD44	DNA	Potential applications: cancer detection, imaging and drug delivery	[134]
Protein Tyrosine Kinase 7-PTK7	DNA	Potential application: drug delivery	[135]
Insulin Receptor	2'-fluoro RNA	Inhibition of IR signaling Reduction of cell viability Potential applications: targeted therapies	[136]
Axl	2'F-RNA	Interferes with cell migration and invasion Inhibition of spheroid formation and cell transformation Inhibition of tumor growth	[137]
Nucleolin	DNA	Interferes with multiple biological activities in tumor cells Induction of apoptosis via down-regulation of bcl-2 proteins	[84,127–129]
Immunoglobulin heavy mu chain	DNA	Role in identification of cell membrane receptor with increased expression levels Potential applications: early diagnosis, targeted therapy and mechanistic studies	[138]

Berezovski et al. [139] described a technology for biomarker discovery, named aptamer-facilitated biomarker discovery (AptaBiD). It involves working with pool of aptamers rather than individual sequences. It is based on three steps: (i) cell-SELEX is performed to select ssDNA aptamers to biomarkers differentially expressed at the cell surfaces; (ii) a pool of biotinylated aptamers is used to isolate biomarkers from the cells, and then (iii) biomarkers are identified. AptaBiD was used to discover previously unknown surface biomarkers that distinguish live mature and immature dendritic cells [139] and to select DNA aptamers on lung adenocarcinoma cells derived from post-operative tissues [140].

Undetermined Targets

By cell-based SELEX process, aptamers have also been selected for tumor cell types (Figure 1d), without pre- or post-identification of targets. In this respect, aptamers are specific to the molecular signature of a tumor cell type. Such cell-based SELEX have been performed on several tumor cells, including breast cancer cells [141], colorectal cancer cells [142], small-cell lung cancer [143,144], non-small cell lung cancer [145], liver cancer cells [146], leukemia cells [147,148], gastric cancer cells [149], pancreatic ductal adenocarcinoma cells [150], prostate cancer cells [101], metastatic cells [151,152], and tumor initiating cells [153]. For example, J.N. Rich's team [153], identified tumor initiating cell (TIC) specific ssDNA aptamers. They used a cell-based SELEX approach with positive selection for CD133(+) TICs and counter selection for CD133(-) non-TICs both from human GBM xenografts in mice. In addition, counter selection was also made on human non-tumoral neural progenitor cells. Selected aptamers specifically bound to TICs with dissociation constants (K_D) in the low nanomolar range. These aptamers internalized into glioblastoma TICs that self-renew, proliferate, and initiate tumors.

3.2.2. Advantages and Limitations of Cell-Based SELEX

Aptamer binding is dependent on the target conformation which is conditioned by its environment. Full-length purified recombinant proteins, ectodomains or peptidic fragments of proteins used in protein-based SELEX may not be relevant targets if they have to be used in clinical developments. In cell-based SELEX, cell-surface targets post-translationally processed are in their endogenous environment, as close as possible to their natural distributions and conformations. Cell-based SELEX does not necessitate the production and purification steps usually required for protein-based SELEX and therefore the method may be useful to target proteins difficult to be produced and/or purified. Moreover, aptamers can be selected without prior knowledge of cell-surface targets. In that case, the aptamer acts as a bait to identify its target, which can be a new tumor protein biomarker.

But cell-based SELEX is a complex process, much more difficult than protein-based SELEX [122]. Cells lines need to be available, cultivable and stable. Aptamers might be difficult to generate for less expressed target proteins on cells. For most of the tumor cell-based selections described in this review, SELEX required modifications of cell lines, like over- and/or under-expression of the cell-surface protein target for selection and/or counter-selection. Over- or under-expression of a protein might deregulate expression of other proteins. This can trigger modifications to the cell line that might not represent anymore the disease cellular context. It is commonly admitted that more rounds of positive selection are performed in cell-SELEX compared to protein-SELEX and more rounds of counter selection are required to improve the selectivity of aptamers.

Post-SELEX characterization of the target is often required to check if the predetermined target is the 'real' target of selected aptamers, or to identify the target if it has not been identified prior selection. Selected aptamers are used as bait, a posteriori, to purify and then to identify their targets. Briefly, biotinylated-aptamers are used to retain whole live cells on streptavidin beads. The cell lysate is then loaded on a SDS-PAGE gel. After electrophoresis and silver staining, proteins that have a higher intensity than controls (extracted proteins with empty beads and extracted proteins with a scrambled nucleic acid sequence) are extracted from the gel and analyzed by nano-LC-MS/MS mass spectroscopy [132,154]. Aptamer-mediated target identification is not an easy process, due to the

inherent properties of lipid embedded proteins (hydrophobicity, poor solubility, resistance to digestion ...), even though significant advances have occurred to address these challenges [155].

Other methods, indirect compared to the method described above, have been used to identify a protein target post-cell-based SELEX. For example, Esposito et al. [130] used different techniques to characterize an aptamer's target. They realized a whole-cell-based SELEX strategy on human NSCLC to select 2'-fluoro RNA aptamers, which distinguish A549 cells (used for positive selection) from H460 cells (used for counter selection). The best candidate, CL4, was used to identify functional targets using a phospho-RTK array analysis, which provided convincing evidence that the target could likely be EGFR and/or ErbB3. To definitively identify the target, authors performed first a filter binding analysis with the soluble extracellular domains of EGFR and ErbB3, which showed a strong affinity for the EGFR protein (in its monomeric and dimeric forms), while no binding was observed for the ErbB3 protein. Binding of the radiolabeled CL4 aptamer to EGFR was confirmed on NIH3T3 cells overexpressing EGFR and compared to NIH3T3 cells. Binding to A549 cells was decreased by interfering with EGFR expression and by high concentration of EGF. Binding of radiolabeled CL4 on A549 cells was competed by soluble EGFR but not by soluble ErbB3. The specific interaction of CL4 with EGFR on cell surface was further analyzed by affinity purification on streptavidin coated beads of extracts from A549 cells treated with biotin-labeled CL4 followed by immunoblotting with anti-EGFR antibodies. Then, CL4 was detected on stable tumor derived cell lines that express high levels of EGFR. Later [156] this aptamer has been shown to bind to the EGFRvIII mutant, even though the mutant lacks most of domains I and III in the extracellular part of the protein. Other methods have been used to demonstrate the binding of CL4 to glioblastoma U87MG cells stably transfected with the EGFRvIII mutant: reverse transcription polymerase chain reaction, confocal microscopy with fluorescent FAM-labelled aptamer and flow cytometry. The binding was shown to inhibit EGFRvIII autophosphorylation and to affect migration, invasion and proliferation of glioblastoma cells.

Cell-based SELEX might lead to the selection of aptamers against other proteins than the pre-identified target. A cell-based SELEX was performed by Cibiel et al. [157] to identify aptamers against CHO-K1 cells expressing the Endothelin type B receptor (ET_BR), using the isogenic CHO-K1 cell line for counter selection rounds. None of the selected aptamers could discriminate between both cell lines. Nevertheless, the authors decided to study the 2'-fluoro RNA aptamer ACE4. The band excised from the PAGE-gel revealed that ACE4 did not interact with ET_BR, but with Annexin-2, a calcium dependent phospholipid-binding protein which is up-regulated in various tumor types and plays multiple roles in regulating cellular functions (angiogenesis, proliferation, cell migration and adhesion). The high affinity aptamer, although not initially planned to bind to the post-SELEX identified tumor biomarker Annexin A2, could however be a promising tool for biomedical applications. In another example [158], a panel of G-rich ssDNA aptamers was selected by cell-SELEX against EGFR-transfected A549 cell line, using A549 cells for counter selection, and their targets was suggested to be nucleolin.

4. Applications of Aptamers in Oncology

Besides their role for biomarker discovery above mentioned, aptamers have many applications in oncology. Some relevant applications of aptamers in the cancer field will be briefly described.

4.1. Aptamers as Detection and Imaging Reagent

Current approaches of protein biomarker detection include gel electrophoresis and conventional immunoassays (for capture and/or detection) such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), surface plasmon resonance, mass-sensing BioCD protein array, surface enhanced Raman spectroscopy (SERS), microfluidics and colorimetric, electrochemical and fluorescence assays (flow cytometry, europium or gold nanoparticle based detection, protein microarray, quantum dots ...). Most of these approaches still lack accuracy, sensitivity and specificity required for diagnostic application. Advantages and limitations of these methods have been compared for the prostate specific antigen (PSA) biomarker detection [159]. Different cancer biosensors and their characteristics were recently

reported [160]. Aptamers are a class of bio-recognition element which can be used as molecular tools for clinical diagnosis [161,162]. For localization of proteins on tissue sections to aid in histopathological diagnosis, aptahistochemistry methods have been developed [163]. Soluble tumor biomarkers (notably CEA, EGFR, HER2, MUC1, PSA) were detected on aptamer-based analytical platforms with low limits of detection [164]. Aptamers can be used in sufficiently sensitive diagnosis assays for the detection and capture of circulating tumor cells [165,166]. Upon the binding to their targets, conformational changes undergone by aptamers can be converted into measurable signals. So called aptasensors match the requirements of fast and portable molecular devices. The most current applications of aptasensors in oncology concerns biomarker detection [167]. A recent review reports the development of aptasensors for analysis of tumor biomarkers using electrochemical, electrochemoluminescence and photoelectrochemical transduction. In particular, nano-structure-based aptasensors significantly improved analytical performances [168]. Aptasensors can also be used to detect exosomes [169]. Aptamers can be used as imaging agents [170–173], for example to track cell status and functions [174]. In particular, glioblastoma-specific aptamers were developed by either targeting the whole cell surface or known glioma biomarkers. Coupled with radionuclide or fluorescent labels, bioconjugates or nanoparticles, they represent a noninvasive manner for defining the tumor tissue border [103].

4.2. Aptamers in Therapy

Applications of aptamers as targeted therapeutics have been reviewed recently [15,175,176]. Nucleic acid aptamers can serve as antagonist or agonist and have therefore a direct therapeutic effect by themselves by activating or blocking key cellular functions upon interaction with their cellular targets. Particularly, aptamers have been successfully used as agonists of co-stimulatory receptors, like CD28, OX40 and 4-1BB, in aptamer-mediated cancer immunotherapy [177–179]. Multivalent aptamers which induce receptor multimerization, are often more efficient than monovalent aptamers to trigger downstream signaling [87]. Aptamers can also be used as delivery tools of therapeutic agents [15,180–183]. Internalized receptors carry along loaded aptamers [184]. Aptamers are thus cargoes which deliver therapeutics inside the cytosol of specific targeted cells where therapeutics exert their intracellular actions. Aptamer chimera, composed of an aptamer and a therapeutic nucleic acid, may target cancer cells and deliver anti-cancer nucleic acids, e.g. small interfering RNA, micro RNA, antimicroRNA and small hairpin RNA, for aptamer-mediated gene therapy [185]. Aptamers can also act as carriers for anti-tumor drugs or toxins [186,187]. Therapeutic agents are either non-covalently or covalently conjugated to aptamers. Doxorubicin, a chemotherapeutic agent extensively used in the treatment of various cancers, has often been used as a drug non-covalently conjugated to aptamers containing CG/GC sequences or covalently conjugated to aptamer through a functional linker [87]. Other aptamer-drug or-toxin conjugates include gemcitabine, docetaxel, daunorubicin, cisplatin, gelonin. For aptamer-mediated therapeutics delivery, aptamers have also been associated to nanoparticles [87,188–193]. Such aptamer nanocomplexes can be composed of copolymers, liposomes, metal nanomaterials (like gold nanoparticles, [194]), or virus-like particles.

5. Aptamers in Clinical Trials

Eleven aptamers have entered clinical stages [175,195] for eye disorders (three aptamers), coagulation (four aptamers), inflammation (two aptamers) and cancer (two aptamers). The majority of aptamer targets in clinical trials are extracellular proteins. The advantage linked to an extracellular protein is that the aptamer activity can be reversed by the use of an oligonucleotide antidote. Pegnivacogin is an antithrombotic aptamer that binds and inhibits coagulation factor IXa. The pegnivacogin dose-dependent antithrombotic activity can be reversed with an antidote, anivamersen, a 15-nucleotide long 2'-O-methyl RNA [196,197]. Pegnivacogin is a 2'-fluoro-2'-O-methyl 31 nucleotide long RNA aptamer, protected from exonuclease degradation by a 3' inverted deoxythymidine cap. It is branched with a 40 kDa PEG carrier. PEGylation is generally used to increase aptamers molecular weight, prolong their circulating half-life by limiting renal clearance,

enhance their stability and decrease their toxic accumulation in tissues and the volume of distribution of therapeutic molecules [198–200]. Tested in a phase IIb study, in patients with acute coronary syndrome, pegnivacogin administration resulted in allergic reactions after the first dose in three patients of 640. Two of them presented an anaphylactic reaction and one presented an isolated dermal reaction. These observations induced an early termination of the trial [201]. A phase III clinical trial (NCT01848106), enrolling 3232 patients undergoing percutaneous coronary intervention, terminated at an early stage, due to severe allergic reactions reported in 1% of patients receiving pegnivacogin versus <1% of patients treated with bivalirudin [202–204]. However, it was observed that pegnivacogin did not induce inflammation response or histamine release. This aptamer, or its degradation, was therefore not responsible for the observed severe allergic reactions. Patients with allergic reactions had high levels of antibody to PEG, induced by complement activation and trypase release [205]. In 1983 was first reported the induction of antibodies against PEG in animals [206], but induction of PEG immunogenicity became clearer these last years as more PEGylated therapeutics enter clinical trials [207–209]. Currently formulated with a 40 kDa PEG carrier, pegnivacogin is associated with severe allergic reactions [203].

Pegaptanib sodium or Macugen [210] was the first aptamer-based drug approved by the U.S. Food and Drug Administration, in December 2004. Pegaptanib sodium is a 2'-fluoropyrimidine RNA-based aptamer, 28 nucleotides in length that terminates in a pentylamino linker, to which two 20-kiloDalton monomethoxy PEG units are covalently attached. It recognizes the abundant isoform of vascular endothelial growth factor, VEGF₁₆₅. As an inhibitor of VEGF₁₆₅-associated vessel formation, pegaptanib sodium is an anti-angiogenic medicine for the treatment of wet age-related macular degeneration. Pegaptanib sodium has also potential therapeutic effects as an agent for solid cancers characterized by extensive angiogenesis [15].

In oncology, two aptamers have undergone clinical trials. The first one was AS1411 (AGRO100), a DNA quadruplex targeting nucleolin. This multifunctional protein, located in the nucleolus but overexpressed at the membrane of several cancer cells, is implicated in cancer development by interacting with key oncogenes (bcl-2, Rb, p53, Akt-1) and by transferring specific extracellular ligands into the cells. The interaction of AS1411 and nucleolin induces internalization, inhibition of DNA synthesis and induction of apoptosis [127,211–214]. In a phase I study (September 2003 and July 2004), AS1411 was tested in advanced cancer. Results showed that 8/16 patients had a stable disease during 2–9 months and one patient presented a complete response after more than 6 months [215]. In another phase I study (NCT00881244, September 2003–April 2009) [216], AS1411 was tested in patients with advanced solid tumors. AS1411 was well-tolerated. It induced a partial and a complete response in twelve patients with metastatic renal-cell carcinoma (RCC) and a stabilization of disease (>2 months) for seven patients. In 2008, Aptamer AS1411 was tested in a phase II study, in monotherapy, in patients with advanced metastatic RCC who had failed treatment with >1 prior tyrosine kinase inhibitor (NCT00740441, August 2008–September 2009). AS1411 has been administered at 40 mg/kg/j for the 4 first days of a 28 days cycle for two cycles. Out of 35 patients, 33 finished the two cycles. One patient presented a partial response. The OOR was only 2.9% (24 months). Twelve (34.3%) patients presented a stabilization of disease (5.5 month) and 21 patients (60%) presented a progression of disease. Adverse effects were observed on 12 grade 1 or 2 patients. This study showed a low level of activity of AS1411 in patients with metastatic RRC. An important and durable response has however been observed without toxicity [217]. AS1411 has also been evaluated in a phase II study combined with cytarabine (chemotherapy) for the treatment of patients with primary refractory or relapsed acute myeloid leukemia (NCT00512083, December 2009–February 2011). Few patients presented a durable remission. But the drug combination was proved to be safe (40 mg/kg/day for 7 days), well tolerated and shows promising signs of activity [218].

NOX-A12 (olaptased pegol) is in clinical development for the treatment of chronic lymphatic leukemia and multiple myeloma [219–221]. NOX-A12 is a 45 nucleotide long L-stereoisomer RNA aptamer (Spiegelmer®, NOXXON Pharma AG, Berlin, Germany), which is a specific antagonist of CXCL12/SDF-1 (C-X-C motif ligand 12/stromal cell-derived factor 1). This chemokine, via interaction

with the receptors CXCR4 and CXCR7, induces attraction and activation of immune and non-immune cells, migration and adhesion of tumor cells to the protective tissue microenvironment. In tumor cells expressing a high level of CXCR4, the disruption of the CXCR4-CXCL2 interaction induces a diminution of the interactions of cancer cells with the bone marrow environment. This cell mobilization sensitizes cancer cells to therapy. NOX-A12 has been evaluated in two phase I and two phase II clinical studies. In a phase IIa study, in combination with bendamustine and rituximab (chemotherapy) in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL) (NCT01486797 march 2012 and January 2016) [222], results showed an effective long-term mobilization of CLL cell and an increased CLL cells circulating in the periphery blood. In term of clinical efficacy, all patients responded to the combination of chemotherapy and NOX-A12. The ORR was 100%. A partial response was achieved for 19/28 patients (68%) and a complete remission for 4/28 patient (14%). Among them, 8 high-risk patients, who had relapsed within 24 months after the first fludarabine/bendamustine treatment or presenting TP53-deletion/mutation, presented a partial or complete response. NOX-A12 was safe and well tolerated. In another independent phase IIa clinical study, NOX-A12 has been evaluated in combination with a proteasome inhibitor, bortezomib, and a corticosteroid, dexamethasone (VD) in previously treated patients with multiple myeloma. This study started in March 2012 and finished in October 2015 (NCT01521533) [223]. A mobilization of myeloma cells was shown in plasma. The OOR was estimated at 68%. Five patients (18%) presented a very good partial response, 2/28 (7%) a complete response and 12/28 (43%) a partial response. These studies showed that aptamer NOX-A12 merits further study in randomized controlled trials.

6. Conclusions

Due to their pleiotropic characteristics and improvements in the SELEX technology, aptamers, which can be selected to virtually any type of targets, are thought to gain rapidly an important place in clinical applications and may replace in many cases animal-derived antibodies. Aptamers as synthetic molecules are believed to save cost and time in R&D and manufacture. The targets of aptamers actually in clinical trials [175] are extracellular proteins (VEGF165, C5, PDGF β , coagulation factor IXa, A1 domain of von Willebrand factor, thrombin, TFPI, CXCL12, CCL2, hepcidin peptide hormone), except nucleolin which is highly expressed at the surface of several tumor cells. Most of the aptamers in clinical trials were identified by protein-SELEX. Combination of protein- and cell-based selection processes may allow the discovery of highly selective but also conformation-dependent aptamers against tumor cell membrane biomarkers. Other selection processes more difficult to settle than protein- and cell-based SELEX and for which targets cannot be determined before selection, have been described to target a tumor under near-in vivo conditions. Aptamers have been selected on tissue sections [224,225], and very recently by Morph-X-Select (morphology based tissue aptamer selection, a combination of image-directed laser micro-dissection technology with tissue SELEX) on targeted tissue sections for ovarian cancer biomarker discovery [226]. Such selected DNA thio-aptamers have shown specificity to tumor vasculature of human ovarian tissue and human microvascular endothelial cells but not to the tumor stromal cells. Aptamers selected in living animals, through in vivo tissue-specific SELEX, have been shown to localize to hepatic colon cancer metastase [227] or to enter the brain after peripheral delivery [228]. These processes should prove helpful to characterize new tumor cell surface protein biomarkers, post-selection. Exciting new fields for aptamer applications in oncology emerge nowadays including detection of circulating tumor cells or tumor exosomes in biological fluid, and specific delivery of therapeutics inside cells with possibilities of co-targeting multiple oncogenic pathways. New opportunities for aptamers as multipotent tools will be characterized and will provide the pavement for approved clinical applications in the near future.

Acknowledgments: We are grateful to Pierre Fechter for valuable comments of the manuscript. This study was supported by the CNRS-French National Center for Scientific Research, the University of Strasbourg (PEPS-IDEX W15RPE24) and SATT-Conectus. Marie-Cécile Mercier is a doctoral fellow from Hospital of Strasbourg.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ellington, A.D.; Szostak, J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **1990**, *346*, 818–822. [CrossRef] [PubMed]
2. Robertson, D.L.; Joyce, G.F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* **1990**, *344*, 467–468. [CrossRef] [PubMed]
3. Tuerk, C.; Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **1990**, *249*, 505–510. [CrossRef] [PubMed]
4. Ponomarenko, J.V.; Orlova, G.V.; Frolov, A.S.; Gelfand, M.S.; Ponomarenko, M.P. SELEX_DB: A database on in vitro selected oligomers adapted for recognizing natural sites and for analyzing both SNPs and site-directed mutagenesis data. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 195–199. [CrossRef] [PubMed]
5. Aptamer Database Apta-Index™. Available online: <http://www.aptagen.com/aptamer-index/aptamer-list.aspx> (accessed on 1 June 2017).
6. Cruz-Toledo, J.; McKeague, M.; Zhang, X.; Giamberardino, A.; McConnell, E.; Francis, T.; DeRosa, M.C.; Dumontier, M. Aptamer base: A collaborative knowledge base to describe aptamers and SELEX experiments. *Database* **2012**, *2012*, bas006. [CrossRef] [PubMed]
7. Lao, Y.-H.; Phua, K.K.L.; Leong, K.W. Aptamer nanomedicine for cancer therapeutics: Barriers and potential for translation. *ACS Nano* **2015**, *9*, 2235–2254. [CrossRef] [PubMed]
8. Jacobi, N.; Seeboeck, R.; Hofmann, E.; Eger, A. ErbB family signalling: A paradigm for oncogene addiction and personalized oncology. *Cancers* **2017**, *9*, 33. [CrossRef] [PubMed]
9. Lemech, C.; Arkenau, H.-T. Biomarkers in advanced colorectal cancer: Challenges in translating clinical research into practice. *Cancers* **2011**, *3*, 1844–1860. [CrossRef] [PubMed]
10. Ciriello, G.; Miller, M.L.; Aksoy, B.A.; Senbabaoglu, Y.; Schultz, N.; Sander, C. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 1127–1133. [CrossRef] [PubMed]
11. Camorani, S.; Crescenzi, E.; Gramanzini, M.; Fedele, M.; Zannetti, A.; Cerchia, L. Aptamer-mediated impairment of EGFR-integrin $\alpha\beta 3$ complex inhibits vasculogenic mimicry and growth of triple-negative breast cancers. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46659. [CrossRef] [PubMed]
12. Szász, A.M.; Györfy, B.; Marko-Varga, G. Cancer heterogeneity determined by functional proteomics. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *64*, 132–142. [CrossRef] [PubMed]
13. Ceccarelli, M.; Barthel, F.P.; Malta, T.M.; Sabedot, T.S.; Salama, S.R.; Murray, B.A.; Morozova, O.; Newton, Y.; Radenbaugh, A.; Pagnotta, S.M.; et al. Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. *Cell* **2016**, *164*, 550–563. [CrossRef] [PubMed]
14. Monaco, I.; Camorani, S.; Colecchia, D.; LOCATELLI, E.; Calandro, P.; Oudin, A.; Niclou, S.; Arra, C.; Chiariello, M.; Cerchia, L.; et al. Aptamer functionalization of nanosystems for glioblastoma targeting through the blood-brain-barrier. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 4510–4516. [CrossRef] [PubMed]
15. Zhou, G.; Wilson, G.; Hebbard, L.; Duan, W.; Liddle, C.; George, J.; Qiao, L. Aptamers: A promising chemical antibody for cancer therapy. *Oncotarget* **2016**, *7*, 13446–13463. [PubMed]
16. Xiang, D.; Zheng, C.; Zhou, S.-F.; Qiao, S.; Tran, P.H.-L.; Pu, C.; Li, Y.; Kong, L.; Kouzani, A.Z.; Lin, J.; et al. Superior performance of aptamer in tumor penetration over antibody: Implication of aptamer-based theranostics in solid tumors. *Theranostics* **2015**, *5*, 1083–1097. [CrossRef] [PubMed]
17. Avci-Adali, M.; Paul, A.; Wilhelm, N.; Ziemer, G.; Wendel, H.P. Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for Single-Stranded DNA generation. *Molecules* **2009**, *15*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
18. Paul, A.; Avci-Adali, M.; Ziemer, G.; Wendel, H.P. Streptavidin-coated magnetic beads for DNA strand separation implicate a multitude of problems during cell-SELEX. *Oligonucleotides* **2009**, *19*, 243–254. [CrossRef] [PubMed]
19. Eulberg, D.; Klusmann, S. Spiegelmers: Biostable aptamers. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 979–983. [CrossRef] [PubMed]
20. Padilla, R.; Sousa, R. Efficient synthesis of nucleic acids heavily modified with non-canonical ribose 2'-groups using a mutant T7 RNA polymerase (RNAP). *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 1561–1563. [CrossRef] [PubMed]
21. Burmeister, P.E.; Lewis, S.D.; Silva, R.F.; Preiss, J.R.; Horwitz, L.R.; Pendergrast, P.S.; McCauley, T.G.; Kurz, J.C.; Epstein, D.M.; Wilson, C.; et al. Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 25–33. [CrossRef] [PubMed]

22. Pinheiro, V.B.; Taylor, A.I.; Cozens, C.; Abramov, M.; Renders, M.; Zhang, S.; Chaput, J.C.; Wengel, J.; Peak-Chew, S.-Y.; McLaughlin, S.H.; et al. Synthetic genetic polymers capable of heredity and evolution. *Science* **2012**, *336*, 341–344. [CrossRef] [PubMed]
23. Kuwahara, M.; Obika, S. In vitro selection of BNA (LNA) aptamers. *Artif. DNA PNA XNA* **2013**, *4*, 39–48. [CrossRef] [PubMed]
24. Kasahara, Y.; Irisawa, Y.; Ozaki, H.; Obika, S.; Kuwahara, M. 2',4'-BNA/LNA aptamers: CE-SELEX using a DNA-based library of full-length 2'-O,4'-C-methylene-bridged/linked bicyclic ribonucleotides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1288–1292. [CrossRef] [PubMed]
25. Veedu, R.N.; Wengel, J. Locked nucleic acid nucleoside triphosphates and polymerases: On the way towards evolution of LNAaptamers. *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 787–792. [CrossRef] [PubMed]
26. Shigdar, S.; Macdonald, J.; O'Connor, M.; Wang, T.; Xiang, D.; Al-Shamaileh, H.; Qiao, L.; Wei, M.; Zhou, S.-F.; Zhu, Y.; et al. Aptamers as theranostic agents: Modifications, serum stability and functionalisation. *Sensors* **2013**, *13*, 13624–13637. [CrossRef] [PubMed]
27. Anosova, I.; Kowal, E.A.; Dunn, M.R.; Chaput, J.C.; Van Horn, W.D.; Egli, M. The structural diversity of artificial genetic polymers. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 1007–1021. [CrossRef] [PubMed]
28. Pinheiro, V.B.; Holliger, P. Towards XNA nanotechnology: New materials from synthetic genetic polymers. *Trends Biotechnol.* **2014**, *32*, 321–328. [CrossRef] [PubMed]
29. Gold, L.; Ayers, D.; Bertino, J.; Bock, C.; Bock, A.; Brody, E.N.; Carter, J.; Dalby, A.B.; Eaton, B.E.; Fitzwater, T.; et al. Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15004. [CrossRef] [PubMed]
30. Eaton, B.E. The joys of in vitro selection: Chemically dressing oligonucleotides to satiate protein targets. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 10–16. [CrossRef]
31. Sun, H.; Zu, Y. A Highlight of recent advances in aptamer technology and its application. *Molecules* **2015**, *20*, 11959–11980. [CrossRef] [PubMed]
32. Andreola, M.-L.; Calmels, C.; Michel, J.; Toulmé, J.-J.; Litvak, S. Towards the selection of phosphorothioate aptamers. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5032–5040. [CrossRef] [PubMed]
33. Lato, S.M.; Ozerova, N.D.S.; He, K.; Sergueeva, Z.; Shaw, B.R.; Burke, D.H. Boron-containing aptamers to ATP. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1401–1407. [CrossRef] [PubMed]
34. Keefe, A.D.; Cload, S.T. SELEX with modified nucleotides. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 448–456. [CrossRef] [PubMed]
35. Vater, A.; Klusmann, S. Turning mirror-image oligonucleotides into drugs: The evolution of Spiegelmer® therapeutics. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 147–155. [CrossRef] [PubMed]
36. Farokhzad, O.C.; Cheng, J.; Teply, B.A.; Sherifi, I.; Jon, S.; Kantoff, P.W.; Richie, J.P.; Langer, R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 6315–6320. [CrossRef] [PubMed]
37. Lee, I.-H.; An, S.; Yu, M.K.; Kwon, H.-K.; Im, S.-H.; Jon, S. Targeted chemoimmunotherapy using drug-loaded aptamer-dendrimer bioconjugates. *J. Control. Release* **2011**, *155*, 435–441. [CrossRef] [PubMed]
38. Baek, S.E.; Lee, K.H.; Park, Y.S.; Oh, D.-K.; Oh, S.; Kim, K.-S.; Kim, D.-E. RNA aptamer-conjugated liposome as an efficient anticancer drug delivery vehicle targeting cancer cells in vivo. *J. Control. Release* **2014**, *196*, 234–242.
39. Willis, M.C.; Collins, B.; Zhang, T.; Green, L.S.; Sebesta, D.P.; Bell, C.; Kellogg, E.; Gill, S.C.; Magallanez, A.; Knauer, S.; et al. Liposome-anchored vascular endothelial growth factor aptamers. *Bioconjug. Chem.* **1998**, *9*, 573–582. [CrossRef] [PubMed]
40. Farokhzad, O.C.; Jon, S.; Khademhosseini, A.; Tran, T.-N.T.; LaVan, D.A.; Langer, R. Nanoparticle-aptamer bioconjugates. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7668–7672. [CrossRef] [PubMed]
41. Healy, J.M.; Lewis, S.D.; Kurz, M.; Boomer, R.M.; Thompson, K.M.; Wilson, C.; McCauley, T.G. Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 2234–2246. [CrossRef] [PubMed]
42. Wang, J.; Li, G. Aptamers against cell surface receptors: Selection, modification and application. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 4107–4116. [CrossRef] [PubMed]
43. Dua, P.; Kim, S.; Lee, D. Nucleic acid aptamers targeting cell-surface proteins. *Methods* **2011**, *54*, 215–225. [CrossRef] [PubMed]

44. Cibiel, A.; Dupont, D.M.; Ducongé, F. Methods to identify aptamers against cell surface biomarkers. *Pharmaceuticals* **2011**, *4*, 1216–1235. [CrossRef]
45. Shigdar, S.; Lin, J.; Yu, Y.; Pastuovic, M.; Wei, M.; Duan, W. RNA aptamer against a cancer stem cell marker epithelial cell adhesion molecule. *Cancer Sci.* **2011**, *102*, 991–998. [CrossRef] [PubMed]
46. Song, Y.; Zhu, Z.; An, Y.; Zhang, W.; Zhang, H.; Liu, D.; Yu, C.; Duan, W.; Yang, C.J. Selection of DNA aptamers against epithelial cell adhesion molecule for cancer cell imaging and circulating tumor cell capture. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4141–4149. [CrossRef] [PubMed]
47. Lee, Y.J.; Han, S.R.; Kim, N.Y.; Lee, S.; Jeong, J.; Lee, S. An RNA aptamer that binds carcinoembryonic antigen inhibits hepatic metastasis of colon cancer cells in mice. *Gastroenterology* **2012**, *143*, 155–165.e8. [CrossRef] [PubMed]
48. Ruckman, J.; Gold, L.; Stephens, A.; Janjic, N. Nucleic acid ligands to integrins. U.S. Patent 6,331,394, 18 December 2001.
49. Mi, J.; Zhang, X.; Giangrande, P.H.; McNamara II, J.O.; Nimjee, S.M.; Sarraf-Yazdi, S.; Sullenger, B.A.; Clary, B.M. Targeted inhibition of $\alpha\beta 3$ integrin with an RNA aptamer impairs endothelial cell growth and survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 956–963. [CrossRef] [PubMed]
50. Gong, Q.; Wang, J.; Ahmad, K.M.; Csordas, A.; Zhou, J.; Nie, J.; Stewart, R.; Thomson, J.A.; Rossi, J.J.; Soh, H.T. Selection strategy to generate aptamer pairs that bind to distinct sites on protein targets. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5365–5371. [CrossRef] [PubMed]
51. Faryammanesh, R.; Lange, T.; Magbanua, E.; Haas, S.; Meyer, C.; Wicklein, D.; Schumacher, U.; Hahn, U. SDA, a DNA aptamer Inhibiting E- and P-Selectin mediated adhesion of cancer and leukemia cells, the first and pivotal step in transendothelial migration during metastasis formation. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e93173. [CrossRef] [PubMed]
52. O'Connell, D.; Koenig, A.; Jennings, S.; Hicke, B.; Han, H.L.; Fitzwater, T.; Chang, Y.F.; Varki, N.; Parma, D.; Varki, A. Calcium-dependent oligonucleotide antagonists specific for L-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 5883–5887. [CrossRef] [PubMed]
53. Hicke, B.J.; Watson, S.R.; Koenig, A.; Lynott, C.K.; Bargatze, R.F.; Chang, Y.F.; Ringquist, S.; Moon-McDermott, L.; Jennings, S.; Fitzwater, T.; et al. DNA aptamers block L-selectin function in vivo. Inhibition of human lymphocyte trafficking in SCID mice. *J. Clin. Invest.* **1996**, *98*, 2688–2692. [CrossRef] [PubMed]
54. Li, N.; Larson, T.; Nguyen, H.H.; Sokolov, K.V.; Ellington, A.D. Directed evolution of gold nanoparticle delivery to cells. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2010**, *46*, 392–394. [CrossRef] [PubMed]
55. Li, N.; Nguyen, H.H.; Byrom, M.; Ellington, A.D. Inhibition of cell proliferation by an anti-EGFR aptamer. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20299. [CrossRef] [PubMed]
56. Ray, P.; Cheek, M.A.; Sharaf, M.L.; Li, N.; Ellington, A.D.; Sullenger, B.A.; Shaw, B.R.; White, R.R. Aptamer-mediated delivery of chemotherapy to pancreatic cancer cells. *Nucleic Acid Ther.* **2012**, *22*, 295–305. [PubMed]
57. Wang, D.-L.; Song, Y.-L.; Zhu, Z.; Li, X.-L.; Zou, Y.; Yang, H.-T.; Wang, J.-J.; Yao, P.-S.; Pan, R.-J.; Yang, C.J.; et al. Selection of DNA aptamers against epidermal growth factor receptor with high affinity and specificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *453*, 681–685. [CrossRef] [PubMed]
58. Liu, Y.; Kuan, C.-T.; Mi, J.; Zhang, X.; Clary, B.M.; Bigner, D.D.; Sullenger, B.A. Aptamers selected against the unglycosylated EGFRvIII ectodomain and delivered intracellularly reduce membrane-bound EGFRvIII and induce apoptosis. *Biol. Chem.* **2009**, *390*, 137–144. [CrossRef] [PubMed]
59. Kim, M.Y.; Jeong, S. In Vitro Selection of RNA Aptamer and Specific Targeting of ErbB2 in Breast Cancer Cells. *Nucleic Acid Ther.* **2011**, *21*, 173–178. [CrossRef] [PubMed]
60. Liu, Z.; Duan, J.-H.; Song, Y.-M.; Ma, J.; Wang, F.-D.; Lu, X.; Yang, X.-D. Novel HER2 aptamer selectively delivers cytotoxic drug to HER2-positive breast cancer cells in vitro. *J. Transl. Med.* **2012**, *10*, 148. [CrossRef] [PubMed]
61. Hu, Y.; Duan, J.; Cao, B.; Zhang, L.; Lu, X.; Wang, F.; Yao, F.; Zhu, Z.; Yuan, W.; Wang, C.; et al. Selection of a novel DNA thioaptamer against HER2 structure. *Clin. Transl. Oncol.* **2015**, *17*, 647–656. [CrossRef] [PubMed]
62. Sett, A.; Borthakur, B.B.; Bora, U. Selection of DNA aptamers for extra cellular domain of human epidermal growth factor receptor 2 to detect HER2 positive carcinomas. *Clin. Transl. Oncol.* **2017**, *1*–13. [CrossRef] [PubMed]

63. Chen, C.B.; Chernis, G.A.; Hoang, V.Q.; Landgraf, R. Inhibition of heregulin signaling by an aptamer that preferentially binds to the oligomeric form of human epidermal growth factor receptor-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9226–9231. [CrossRef] [PubMed]
64. Boltz, A.; Piater, B.; Toleikis, L.; Guenther, R.; Kolmar, H.; Hock, B. Bi-specific aptamers mediating tumor cell lysis. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 21896–21905. [CrossRef] [PubMed]
65. Piater, B.; Doerner, A.; Guenther, R.; Kolmar, H.; Hock, B. Aptamers binding to c-Met inhibiting tumor cell migration. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0142412. [CrossRef] [PubMed]
66. Lupold, S.E.; Hicke, B.J.; Lin, Y.; Coffey, D.S. Identification and characterization of nuclease-stabilized rna molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4029–4033. [PubMed]
67. McNamara, J.O.; Andreckek, E.R.; Wang, Y.; Viles, K.D.; Rempel, R.E.; Gilboa, E.; Sullenger, B.A.; Giangrande, P.H. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1005–1015. [CrossRef] [PubMed]
68. Ferreira, C.S.M.; Matthews, C.S.; Missailidis, S. DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers. *Tumour Biol.* **2006**, *27*, 289–301. [CrossRef] [PubMed]
69. Ferreira, C.S.M.; Papamichael, K.; Guilbault, G.; Schwarzacher, T.; Garipey, J.; Missailidis, S. DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: Design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 1039–1050. [CrossRef] [PubMed]
70. Pratico, E.D.; Sullenger, B.A.; Nair, S.K. Identification and characterization of an agonistic aptamer against the T Cell costimulatory receptor, OX40. *Nucleic Acid Ther.* **2013**, *23*, 35–43. [CrossRef] [PubMed]
71. Dollins, C.M.; Nair, S.; Boczkowski, D.; Lee, J.; Layzer, J.M.; Gilboa, E.; Sullenger, B.A. Assembling OX40 Aptamers on a molecular scaffold to create a receptor-activating aptamer. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 675–682. [CrossRef] [PubMed]
72. McNamara, J.O.; Kolonias, D.; Pastor, F.; Mittler, R.S.; Chen, L.; Giangrande, P.H.; Sullenger, B.; Gilboa, E. Multivalent 4-1BB binding aptamers costimulate CD8+ T cells and inhibit tumor growth in mice. *J. Clin. Investig.* **2008**, *118*, 376–386. [CrossRef] [PubMed]
73. Mori, T.; Oguro, A.; Ohtsu, T.; Nakamura, Y. RNA aptamers selected against the receptor activator of NF- κ B acquire general affinity to proteins of the tumor necrosis factor receptor family. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 6120–6128. [CrossRef] [PubMed]
74. Pastor, F.; Soldevilla, M.M.; Villanueva, H.; Kolonias, D.; Inoges, S.; de Cerio, A.L.; Kandzia, R.; Klimyuk, V.; Gleba, Y.; Gilboa, E.; et al. CD28 aptamers as powerful immune response modulators. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2013**, *2*, e98. [CrossRef] [PubMed]
75. Santulli-Marotto, S.; Nair, S.K.; Rusconi, C.; Sullenger, B.; Gilboa, E. Multivalent RNA aptamers that inhibit Ctl4 and enhance tumor immunity. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7483–7489. [PubMed]
76. Zhou, J.; Tiemann, K.; Chomchan, P.; Alluin, J.; Swiderski, P.; Burnett, J.; Zhang, X.; Forman, S.; Chen, R.; Rossi, J. Dual functional BAFF receptor aptamers inhibit ligand-induced proliferation and deliver siRNAs to NHL cells. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 4266–4283. [CrossRef] [PubMed]
77. Roth, F.; Fuente, A.C.D.L.; Vella, J.L.; Zoso, A.; Inverardi, L.; Serafini, P. Aptamer-mediated blockade of IL4R α triggers apoptosis of MDSCs and limits tumor progression. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 1373–1383. [CrossRef] [PubMed]
78. Chauveau, F.; Aissouni, Y.; Hamm, J.; Boutin, H.; Libri, D.; Ducongé, F.; Tavitian, B. Binding of an aptamer to the N-terminal fragment of VCAM-1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6119–6122. [CrossRef] [PubMed]
79. Watanabe, T.; Ito, K.; Matsumoto, M.; Seya, T.; Nishikawa, S.; Hasegawa, T.; Fukuda, K. Isolation of RNA aptamers against human Toll-like receptor 3 ectodomain. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2006**, 251–252. [CrossRef] [PubMed]
80. Somasunderam, A.; Thiviyathan, V.; Tanaka, T.; Li, X.; Neerathilingam, M.; Lokesh, G.L.R.; Mann, A.; Peng, Y.; Ferrari, M.; Klostergaard, J.; et al. Combinatorial selection of DNA thioaptamers targeted towards the HA binding domain of human CD44. *Biochemistry* **2010**, *49*, 9106–9112. [CrossRef] [PubMed]
81. Ababneh, N.; Alshaer, W.; Allozi, O.; Mahafzah, A.; El-Khateeb, M.; Hillaireau, H.; Noiray, M.; Fattal, E.; Ismail, S. In vitro selection of modified RNA aptamers against CD44 cancer stem cell marker. *Nucleic Acid Ther.* **2013**, *23*, 401–407. [CrossRef] [PubMed]

82. White, R.R.; Roy, J.A.; Viles, K.D.; Sullenger, B.A.; Kontos, C.D. A nuclease-resistant RNA aptamer specifically inhibits angiotensin-1-mediated Tie2 activation and function. *Angiogenesis* **2008**, *11*, 395–401. [CrossRef] [PubMed]
83. White, R.R.; Shan, S.; Rusconi, C.P.; Shetty, G.; Dewhirst, M.W.; Kontos, C.D.; Sullenger, B.A. Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiotensin-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5028–5033. [CrossRef] [PubMed]
84. Bates, P.J.; Laber, D.A.; Miller, D.M.; Thomas, S.D.; Trent, J.O. Discovery and development of the g-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp. Mol. Pathol.* **2009**, *86*, 151–164. [CrossRef] [PubMed]
85. Tam, R.C.; Phan, U.T.; Milovanovic, T.; Pai, B.; Lim, C.; Bard, J.; He, L. Oligonucleotide-mediated inhibition of CD28 expression induces human T-cell hyporesponsiveness and manifests impaired contact hypersensitivity in mice. *J. Immunol.* **1997**, *158*, 200–208. [PubMed]
86. Spencer, D.I.; Missailidis, S.; Denton, G.; Murray, A.; Brady, K.; Matteis, C.I.; Searle, M.S.; Tendler, S.J.; Price, M.R. Structure/activity studies of the anti-MUC1 monoclonal antibody C595 and synthetic MUC1 mucin-core-related peptides and glycopeptides. *Biospectroscopy* **1999**, *5*, 79–91. [CrossRef]
87. Sun, H.; Zhu, X.; Lu, P.Y.; Rosato, R.R.; Tan, W.; Zu, Y. Oligonucleotide aptamers: New tools for targeted cancer therapy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2014**, *3*, e182. [CrossRef] [PubMed]
88. Blind, M.; Blank, M. Aptamer selection technology and recent advances. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2015**, *4*, e223. [CrossRef] [PubMed]
89. Shangguan, D.; Bing, T.; Zhang, N. Cell-SELEX: Aptamer selection against whole cells. In *Aptamers Selected by Cell-SELEX for Theranostics*; Tan, W., Fang, X., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015; pp. 13–33.
90. Mallikaratchy, P. Evolution of complex target SELEX to identify aptamers against mammalian cell-surface antigens. *Molecules* **2017**, *22*, 215. [CrossRef] [PubMed]
91. Mayer, G.; Ahmed, M.-S.L.; Dolf, A.; Endl, E.; Knolle, P.A.; Famulok, M. Fluorescence-activated cell sorting for aptamer SELEX with cell mixtures. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1993–2004. [CrossRef] [PubMed]
92. Raddatz, M.-S.L.; Dolf, A.; Endl, E.; Knolle, P.; Famulok, M.; Mayer, G. Enrichment of cell-targeting and population-specific aptamers by fluorescence-activated cell sorting. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5190–5193. [CrossRef] [PubMed]
93. Avci-Adali, M.; Metzger, M.; Perle, N.; Ziemer, G.; Wendel, H.P. Pitfalls of cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX): Existing dead cells during in vitro selection anticipate the enrichment of specific aptamers. *Oligonucleotides* **2010**, *20*, 317–323. [CrossRef] [PubMed]
94. Wilner, S.E.; Wengert, B.; Maier, K.; de Lourdes Borba Magalhães, M.; Del Amo, D.S.; Pai, S.; Opazo, F.; Rizzoli, S.O.; Yan, A.; Levy, M. An RNA alternative to human transferrin: a new tool for targeting human cells. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2012**, *1*, e21. [CrossRef] [PubMed]
95. Yan, A.; Levy, M. Cell Internalization SELEX: in vitro selection for molecules that internalize into cells. In *Therapeutic Applications of Ribozymes and Riboswitches*; Lafontaine, D., Dubé, A., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: New York, NY, USA, 2014; pp. 241–265.
96. Gourronc, F.A.; Rockey, W.M.; Thiel, W.H.; Giangrande, P.H.; Klingelutz, A.J. Identification of RNA aptamers that internalize into HPV-16 E6/E7 transformed tonsillar epithelial cells. *Virology* **2013**, *446*, 325–333. [CrossRef] [PubMed]
97. Zhou, J.; Bobbin, M.L.; Burnett, J.C.; Rossi, J.J. Current progress of RNA aptamer-based therapeutics. *Front. Genet.* **2012**, *3*, 234. [CrossRef] [PubMed]
98. Thiel, W.H.; Bair, T.; Peek, A.S.; Liu, X.; Dassie, J.; Stockdale, K.R.; Behlke, M.A.; Miller, F.J.; Giangrande, P.H. Rapid identification of cell-specific, internalizing RNA aptamers with bioinformatics analyses of a cell-based aptamer selection. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43836. [CrossRef] [PubMed]
99. Camorani, S.; Esposito, C.L.; Rienzo, A.; Catuogno, S.; Iaboni, M.; Condorelli, G.; de Franciscis, V.; Cerchia, L. Inhibition of receptor signaling and of glioblastoma-derived tumor growth by a novel PDGFR β aptamer. *Mol. Ther.* **2014**, *22*, 828–841. [CrossRef] [PubMed]
100. Thiel, K.W.; Hernandez, L.I.; Dassie, J.P.; Thiel, W.H.; Liu, X.; Stockdale, K.R.; Rothman, A.M.; Hernandez, F.J.; McNamara, J.O.; Giangrande, P.H. Delivery of chemo-sensitizing siRNAs to HER2⁺-breast cancer cells using RNA aptamers. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 6319–6337. [CrossRef] [PubMed]

101. Souza, A.G.; Marangoni, K.; Fujimura, P.T.; Alves, P.T.; Silva, M.J.; Bastos, V.A.F.; Goulart, L.R.; Goulart, V.A. 3D cell-SELEX: Development of RNA aptamers as molecular probes for PC-3 tumor cell line. *Exp. Cell Res.* **2016**, *341*, 147–156. [CrossRef] [PubMed]
102. Ohuchi, S.P.; Ohtsu, T.; Nakamura, Y. Selection of RNA aptamers against recombinant transforming growth factor- β type III receptor displayed on cell surface. *Biochimie* **2006**, *88*, 897–904. [CrossRef] [PubMed]
103. Delač, M.; Motaln, H.; Ulrich, H.; Lah, T.T. Aptamer for imaging and therapeutic targeting of brain tumor glioblastoma. *Cytometry A* **2015**, *87*, 806–816. [CrossRef] [PubMed]
104. Wadajkar, A.S.; Dancy, J.G.; Hersh, D.S.; Anastasiadis, P.; Tran, N.L.; Woodworth, G.F.; Winkles, J.A.; Kim, A.J. Tumor-targeted nanotherapeutics: overcoming treatment barriers for glioblastoma. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2016**. [CrossRef] [PubMed]
105. Zumrut, H.E.; Ara, M.N.; Maio, G.E.; Van, N.A.; Batool, S.; Mallikaratchy, P.R. Ligand-guided selection of aptamers against T-cell receptor-cluster of differentiation 3 (TCR-CD3) expressed on Jurkat.E6 cells. *Anal. Biochem.* **2016**, *512*, 1–7. [CrossRef] [PubMed]
106. Zumrut, H.E.; Ara, M.N.; Fraile, M.; Maio, G.; Mallikaratchy, P. Ligand-guided selection of target-specific aptamers: A screening technology for identifying specific aptamers against cell-surface proteins. *Nucleic Acid Ther.* **2016**, *26*, 190–198. [CrossRef] [PubMed]
107. Chang, Y.-C.; Kao, W.-C.; Wang, W.-Y.; Wang, W.-Y.; Yang, R.-B.; Peck, K. Identification and characterization of oligonucleotides that inhibit Toll-like receptor 2-associated immune responses. *FASEB J.* **2009**, *23*, 3078–3088. [CrossRef] [PubMed]
108. Pestourie, C.; Cerchia, L.; Gombert, K.; Aissouni, Y.; Boulay, J.; Franciscis, V.D.; Libri, D.; Tavitian, B.; Ducongé, F. Comparison of different strategies to select aptamers against a transmembrane protein target. *Oligonucleotides* **2006**, *16*, 323–335. [CrossRef] [PubMed]
109. Zhu, G.; Zhang, H.; Jacobson, O.; Wang, Z.; Chen, H.; Yang, X.; Niu, G.; Chen, X. Combinatorial screening of DNA aptamers for molecular imaging of HER2 in cancer. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 1068–1075. [CrossRef] [PubMed]
110. Berg, K.; Lange, T.; Mittelberger, F.; Schumacher, U.; Hahn, U. Selection and characterization of an $\alpha 6\beta 4$ Integrin blocking DNA aptamer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2016**, *5*, e294. [CrossRef] [PubMed]
111. Soldevilla, M.M.; Villanueva, H.; Casares, N.; Lasarte, J.J.; Bendandi, M.; Inoges, S.; de Cerio, A.L.-D.; Pastor, F. MRP1-CD28 bi-specific oligonucleotide aptamers: Target costimulation to drug-resistant melanoma cancer stem cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 23182–23196. [CrossRef] [PubMed]
112. Takahashi, M.; Sakota, E.; Nakamura, Y. The efficient cell-SELEX strategy, Icell-SELEX, using isogenic cell lines for selection and counter-selection to generate RNA aptamers to cell surface proteins. *Biochimie* **2016**, *131*, 77–84. [CrossRef] [PubMed]
113. Kang, S.K.; Huh, Y.M.; Lee, D. Isolation of RNA aptamers targeting HER-2-overexpressing breast cancer cells using cell-SELEX. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2009**, *30*, 1827–1831.
114. Dastjerdi, K.; Tabar, G.H.; Dehghani, H.; Haghparast, A. Generation of an enriched pool of DNA aptamers for an HER2-overexpressing cell line selected by Cell SELEX. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2011**, *58*, 226–230. [CrossRef] [PubMed]
115. Parekh, P.; Kamble, S.; Zhao, N.; Zeng, Z.; Portier, B.P.; Zu, Y. Immunotherapy of CD30-expressing lymphoma using a highly stable ssDNA aptamer. *Biomaterials* **2013**, *34*, 8909–8917. [CrossRef] [PubMed]
116. Mahlknecht, G.; Maron, R.; Mancini, M.; Schechter, B.; Sela, M.; Yarden, Y. Aptamer to ErbB-2/HER2 enhances degradation of the target and inhibits tumorigenic growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 8170–8175. [CrossRef] [PubMed]
117. Tan, Y.; Shi, Y.; Wu, X.; Liang, H.; Gao, Y.; Li, S.; Zhang, X.; Wang, F.; Gao, T. DNA aptamers that target human glioblastoma multiforme cells overexpressing epidermal growth factor receptor variant III in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.* **2013**, *34*, 1491–1498. [CrossRef] [PubMed]
118. Wu, X.; Liang, H.; Tan, Y.; Yuan, C.; Li, S.; Li, X.; Li, G.; Shi, Y.; Zhang, X. Cell-SELEX aptamer for highly specific radionuclide molecular imaging of glioblastoma in vivo. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90752. [CrossRef] [PubMed]
119. Huang, Y.Z.; Hernandez, F.J.; Gu, B.; Stockdale, K.R.; Nanapaneni, K.; Scheetz, T.E.; Behlke, M.A.; Peek, A.S.; Bair, T.; Giangrande, P.H.; et al. RNA Aptamer-Based Functional Ligands of the Neurotrophin Receptor, TrkB. *Mol. Pharmacol.* **2012**, *82*, 623–635. [CrossRef] [PubMed]

120. Kim, J.W.; Kim, E.Y.; Kim, S.Y.; Byun, S.K.; Lee, D.; Oh, K.-J.; Kim, W.K.; Han, B.S.; Chi, S.-W.; Lee, S.C.; et al. Identification of DNA aptamers toward epithelial cell adhesion molecule via cell-SELEX. *Mol. Cells* **2014**, *37*, 742–746. [CrossRef] [PubMed]
121. Shigdar, S.; Qiao, L.; Zhou, S.-F.; Xiang, D.; Wang, T.; Li, Y.; Lim, L.Y.; Kong, L.; Li, L.; Duan, W. RNA aptamers targeting cancer stem cell marker CD133. *Cancer Lett.* **2013**, *330*, 84–95. [CrossRef] [PubMed]
122. Chen, M.; Yu, Y.; Jiang, F.; Zhou, J.; Li, Y.; Liang, C.; Dang, L.; Lu, A.; Zhang, G. Development of cell-SELEX technology and its application in cancer diagnosis and therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 2079. [CrossRef] [PubMed]
123. Chang, Y.M.; Donovan, M.J.; Tan, W. Using aptamers for cancer biomarker discovery. *J. Nucleic Acids* **2013**, *2013*. [CrossRef] [PubMed]
124. Jin, C.; Qiu, L.; Li, J.; Fu, T.; Zhang, X.; Tan, W. Cancer Biomarker Discovery Using DNA Aptamers. *Analyst* **2016**, *141*, 461–466. [CrossRef] [PubMed]
125. Daniels, D.A.; Chen, H.; Hicke, B.J.; Swiderek, K.M.; Gold, L. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell-SELEX: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15416–15421. [CrossRef] [PubMed]
126. Ireson, C.R.; Kelland, L.R. Discovery and development of anticancer aptamers. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 2957–2962. [CrossRef] [PubMed]
127. Soundararajan, S.; Chen, W.; Spicer, E.K.; Courtenay-Luck, N.; Fernandes, D.J. The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2358–2365. [CrossRef] [PubMed]
128. Soundararajan, S.; Wang, L.; Sridharan, V.; Chen, W.; Courtenay-Luck, N.; Jones, D.; Spicer, E.K.; Fernandes, D.J. Plasma membrane nucleolin is a receptor for the anticancer aptamer AS1411 in MV4-11 leukemia cells. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *76*, 984–991. [CrossRef] [PubMed]
129. Bates, P.J.; Reyes-Reyes, E.M.; Malik, M.T.; Murphy, E.M.; O'Toole, M.G.; Trent, J.O. G-quadruplex oligonucleotide AS1411 as a cancer-targeting agent: Uses and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1861*, 1414–1428. [CrossRef] [PubMed]
130. Esposito, C.L.; Passaro, D.; Longobardo, I.; Condorelli, G.; Marotta, P.; Affuso, A.; de Franciscis, V.; Cerchia, L. A neutralizing rna aptamer against egfr causes selective apoptotic cell death. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e24071. [CrossRef] [PubMed]
131. Dua, P.; Kang, H.S.; Hong, S.-M.; Tsao, M.-S.; Kim, S.; Lee, D. Alkaline phosphatase ALPPL-2 Is a novel pancreatic carcinoma-associated protein. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 1934–1945. [CrossRef] [PubMed]
132. Bing, T.; Shangquan, D.; Wang, Y. Facile discovery of cell-surface protein targets of cancer cell aptamers. *Mol. Cell. Proteom.* **2015**, *14*, 2692–2700. [CrossRef] [PubMed]
133. Lu, M.; Zhou, L.; Zheng, X.; Quan, Y.; Wang, X.; Zhou, X.; Ren, J. A novel molecular marker of breast cancer stem cells identified by cell-SELEX method. *Cancer Biomark.* **2015**, *15*, 163–170. [CrossRef] [PubMed]
134. Sefah, K.; Bae, K.-M.; Phillips, J.A.; Siemann, D.W.; Su, Z.; McClellan, S.; Vieweg, J.; Tan, W. Cell-based selection provides novel molecular probes for cancer stem cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **2013**, *132*, 2578–2588. [CrossRef] [PubMed]
135. Xiao, Z.; Shangquan, D.; Cao, Z.; Fang, X.; Tan, W. Cell-specific internalization study of an aptamer from whole cell selection. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2008**, *14*, 1769–1775. [CrossRef] [PubMed]
136. Iaboni, M.; Fontanella, R.; Rienzo, A.; Capuozzo, M.; Nuzzo, S.; Santamaria, G.; Catuogno, S.; Condorelli, G.; de Franciscis, V.; Esposito, C.L. Targeting insulin receptor with a novel internalizing aptamer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2016**, *5*, e365. [CrossRef] [PubMed]
137. Cerchia, L.; Esposito, C.L.; Camorani, S.; Rienzo, A.; Stasio, L.; Insabato, L.; Affuso, A.; de Franciscis, V. Targeting axl with an high-affinity inhibitory aptamer. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 2291–2303. [CrossRef] [PubMed]
138. Mallikaratchy, P.; Tang, Z.; Kwame, S.; Meng, L.; Shangquan, D.; Tan, W. Aptamer directly evolved from live cells recognizes membrane bound immunoglobulin heavy mu chain in burkitt's lymphoma cells. *Mol. Cell. Proteom.* **2007**, *6*, 2230–2238. [CrossRef] [PubMed]
139. Berezovski, M.V.; Lechmann, M.; Musheev, M.U.; Mak, T.W.; Krylov, S.N. Aptamer-facilitated biomarker discovery (AptaBiD). *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9137–9143. [CrossRef] [PubMed]
140. Zamay, G.S.; Kolovskaya, O.S.; Zamay, T.N.; Glazyrin, Y.E.; Krat, A.V.; Zubkova, O.; Spivak, E.; Wehbe, M.; Gargaun, A.; Muharemagic, D.; et al. Aptamers selected to postoperative lung adenocarcinoma detect circulating tumor cells in human blood. *Mol. Ther.* **2015**, *23*, 1486–1496. [CrossRef] [PubMed]

141. Zhang, K.; Tang, L.; Sefah, K.; Zhao, Z.; Zhu, G.; Sun, W.; Goodison, S.; Tan, W. Novel aptamer developed for breast cancer cell internalization. *Chem. Med. Chem.* **2012**, *7*, 79–84. [CrossRef] [PubMed]
142. Sefah, K.; Meng, L.; Lopez-Colon, D.; Jimenez, E.; Liu, C.; Tan, W. DNA aptamers as molecular probes for colorectal cancer study. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e14269. [CrossRef] [PubMed]
143. Chen, H.W.; Medley, C.D.; Smith, J.E.; Sefah, K.; Shangguan, D.; Tang, Z.; Meng, L.; Tan, W. Molecular recognition of small cell lung cancer cells using aptamers. *Chem. Med. Chem.* **2008**, *3*, 991–1001. [CrossRef] [PubMed]
144. Kunii, T.; Ogura, S.; Mie, M.; Kobatake, E. Selection of DNA aptamers recognizing small cell lung cancer using living cell-SELEX. *Analyst* **2011**, *136*, 1310–1312. [CrossRef] [PubMed]
145. Zhao, Z.; Xu, L.; Shi, X.; Tan, W.; Fang, X.; Shangguan, D. Recognition of subtype non-small cell lung cancer by DNA aptamers selected from living cells. *Analyst* **2009**, *134*, 1808–1814. [CrossRef] [PubMed]
146. Shangguan, D.; Meng, L.; Cao, Z.C.; Xiao, Z.; Fang, X.; Li, Y.; Cardona, D.; Witek, R.P.; Liu, C.; Tan, W. Identification of liver cancer-specific aptamers using whole live cells. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 721–728. [CrossRef] [PubMed]
147. Shangguan, D.; Li, Y.; Tang, Z.; Cao, Z.C.; Chen, H.W.; Mallikaratchy, P.; Sefah, K.; Yang, C.J.; Tan, W. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11838–11843. [CrossRef] [PubMed]
148. Sefah, K.; Tang, Z.; Shangguan, D.; Chen, H.; Lopez-Colon, D.; Li, Y.; Parekh, P.; Martin, J.; Meng, L.; Tan, W. Molecular recognition of acute myeloid leukemia using aptamers. *Leukemia* **2009**, *23*, 235–244. [CrossRef] [PubMed]
149. Zhang, X.; Zhang, J.; Ma, Y.; Pei, X.; Liu, Q.; Lu, B.; Jin, L.; Wang, J.; Liu, J. A cell-based single-stranded DNA aptamer specifically targets gastric cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2014**, *46*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
150. Wu, X.; Zhao, Z.; Bai, H.; Fu, T.; Yang, C.; Hu, X.; Liu, Q.; Champanhac, C.; Teng, I.-I.; Ye, M.; Tan, W. DNA aptamer selected against pancreatic ductal adenocarcinoma for in vivo imaging and clinical tissue recognition. *Theranostics* **2015**, *5*, 985–994. [CrossRef] [PubMed]
151. Rong, Y.; Chen, H.; Zhou, X.-F.; Yin, C.-Q.; Wang, B.-C.; Peng, C.-W.; Liu, S.-P.; Wang, F.-B. Identification of an aptamer through whole cell-SELEX for targeting high metastatic liver cancers. *Oncotarget* **2016**, *7*, 8282–8294. [PubMed]
152. Zueva, E.; Rubio, L.I.; Ducongé, F.; Tavittian, B. Metastasis-focused cell-based SELEX generates aptamers inhibiting cell migration and invasion. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 797–804. [CrossRef] [PubMed]
153. Kim, Y.; Wu, Q.; Hamerlik, P.; Hitomi, M.; Sloan, A.E.; Barnett, G.H.; Weil, R.J.; Leahy, P.; Hjelmeland, A.B.; Rich, J.N. Aptamer Identification of Brain Tumor Initiating Cells. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 4923–4936. [CrossRef] [PubMed]
154. Quang, N.; Miodek, A.; Cibiel, A.; Ducongé, F. Selection of aptamers against whole living cells: From cell-SELEX to identification of biomarkers. In *Synthetic Antibodies*; Tiller, T., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, USA, 2017; pp. 253–272.
155. Griffin, N.M.; Schnitzer, J.E. Overcoming key technological challenges in using mass spectrometry for mapping cell surfaces in tissues. *Mol. Cell. Proteom.* **2011**, *10*, R110.000935. [CrossRef] [PubMed]
156. Camorani, S.; Crescenzi, E.; Colecchia, D.; Carpentieri, A.; Amoresano, A.; Fedele, M.; Chiariello, M.; Cerchia, L. Aptamer targeting EGFRvIII mutant hampers its constitutive autophosphorylation and affects migration, invasion and proliferation of glioblastoma cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 37570–37587. [PubMed]
157. Cibiel, A.; Nguyen Quang, N.; Gombert, K.; Thézé, B.; Garofalakis, A.; Ducongé, F. From Ugly Duckling to Swan: Unexpected identification from Cell-SELEX of an anti-annexin A2 aptamer targeting tumors. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87002. [CrossRef] [PubMed]
158. Xu, L.; Zhang, Z.; Zhao, Z.; Liu, Q.; Tan, W.; Fang, X. Cellular internalization and cytotoxicity of aptamers selected from lung cancer cell. *Am. J. Biomed. Sci.* **2013**, *5*, 47–58.
159. Nimse, S.B.; Sonawane, M.D.; Song, K.-S.; Kim, T. Biomarker detection technologies and future directions. *Analyst* **2016**, *141*, 740–755. [CrossRef] [PubMed]
160. Jayanthi, V.S.P.K.S.A.; Das, A.B.; Saxena, U. Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *91*, 15–23. [CrossRef] [PubMed]
161. Ozalp, V.C.; Kavruk, M.; Dilek, O.; Tahir, A. Aptamers: Molecular Tools for Medical Diagnosis. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *15*, 1125–1137. [CrossRef]

162. Prakash, J.S.; Rajamanickam, K. Aptamers and Their Significant Role in Cancer Therapy and Diagnosis. *Biomedicines* **2015**, *3*, 248–269. [CrossRef] [PubMed]
163. Bukari, B.A.; Citartan, M.; Ch'ng, E.S.; Bilibana, M.P.; Rozhdestvensky, T.; Tang, T.-H. Aptahistochemistry in diagnostic pathology: technical scrutiny and feasibility. *Histochem. Cell Biol.* **2017**, *147*, 545–553. [CrossRef] [PubMed]
164. Sun, H.; Tan, W.; Zu, Y. Aptamers: versatile molecular recognition probes for cancer detection. *Analyst* **2016**, *141*, 403–415. [CrossRef] [PubMed]
165. Dickey, D.D.; Giangrande, P.H. Oligonucleotide Aptamers: a Next-Generation Technology for the Capture and Detection of Circulating Tumor Cells. *Methods* **2016**, *97*, 94–103. [CrossRef] [PubMed]
166. Zamay, A.S.; Zamay, G.S.; Kolovskaya, O.S.; Zamay, T.N.; Berezovski, M.V. Aptamer-Based Methods for Detection of Circulating Tumor Cells and Their Potential for Personalized Diagnostics. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *994*, 67–81. [PubMed]
167. Hong, P.; Li, W.; Li, J. Applications of Aptasensors in Clinical Diagnostics. *Sensors* **2012**, *12*, 1181–1193. [CrossRef] [PubMed]
168. Ravalli, A.; Voccia, D.; Palchetti, I.; Marrazza, G. Electrochemical, Electrochemiluminescence, and Photoelectrochemical Aptamer-Based Nanostructured Sensors for Biomarker Analysis. *Biosensors* **2016**, *6*. [CrossRef] [PubMed]
169. Zhou, Q.; Rahimian, A.; Son, K.; Shin, D.-S.; Patel, T.; Revzin, A. Development of an aptasensor for electrochemical detection of exosomes. *Methods* **2016**, *97*, 88–93. [CrossRef] [PubMed]
170. Jin, C.; Zheng, J.; Li, C.; Qiu, L.; Zhang, X.; Tan, W. Aptamers Selected by Cell-SELEX for Molecular Imaging. *J. Mol. Evol.* **2015**, *81*, 162–171. [CrossRef] [PubMed]
171. Dougherty, C.A.; Cai, W.; Hong, H. Applications of Aptamers in Targeted Imaging: State of the Art. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *15*, 1138–1152. [CrossRef] [PubMed]
172. Ku, T.-H.; Zhang, T.; Luo, H.; Yen, T.M.; Chen, P.-W.; Han, Y.; Lo, Y.-H. Nucleic acid aptamers: An emerging tool for biotechnology and biomedical sensing. *Sensors* **2015**, *15*, 16281–16313. [CrossRef] [PubMed]
173. Mankoff, D.A.; Link, J.M.; Linden, H.M.; Sundararajan, L.; Krohn, K.A. Tumor receptor imaging. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 149S–163S. [CrossRef] [PubMed]
174. Wiraja, C.; Yeo, D.; Lio, D.; Labanieh, L.; Lu, M.; Zhao, W.; Xu, C. Aptamer technology for tracking cells' status & function. *Mol. Cell. Ther.* **2014**, *2*. [CrossRef]
175. Zhou, J.; Rossi, J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 181–202. [CrossRef] [PubMed]
176. Xiang, D.; Shigdar, S.; Qiao, G.; Wang, T.; Kouzani, A.Z.; Zhou, S.-F.; Kong, L.; Li, Y.; Pu, C.; Duan, W. Nucleic acid aptamer-guided cancer therapeutics and diagnostics: the next generation of cancer medicine. *Theranostics* **2015**, *5*, 23–42. [CrossRef] [PubMed]
177. Pastor, F. Aptamers: A New Technological Platform in Cancer Immunotherapy. *Pharmaceuticals* **2016**, *9*, 64. [CrossRef] [PubMed]
178. Soldevilla, M.M.; Villanueva, H.; Pastor, F. Aptamers: A Feasible Technology in Cancer Immunotherapy. *J. Immunol. Res.* **2016**, *2016*. [CrossRef] [PubMed]
179. Khedri, M.; Rafatpanah, H.; Abnous, K.; Ramezani, P.; Ramezani, M. Cancer immunotherapy via nucleic acid aptamers. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *29*, 926–936. [CrossRef] [PubMed]
180. Wu, X.; Chen, J.; Wu, M.; Zhao, J.X. Aptamers: Active targeting ligands for cancer diagnosis and therapy. *Theranostics* **2015**, *5*, 322–344. [CrossRef] [PubMed]
181. Lee, J.W.; Kim, H.J.; Heo, K. Therapeutic aptamers: Developmental potential as anticancer drugs. *BMB Rep.* **2015**, *48*, 234–237. [CrossRef] [PubMed]
182. Zhu, H.; Li, J.; Zhang, X.-B.; Ye, M.; Tan, W. Nucleic acid aptamer-mediated drug delivery for targeted cancer therapy. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 39–45. [CrossRef] [PubMed]
183. Catuogno, S.; Esposito, C.L.; de Franciscis, V. Aptamer-mediated targeted delivery of therapeutics: An update. *Pharmaceuticals* **2016**, *9*, 69. [CrossRef] [PubMed]
184. Gopinath, S.C.B.; Lakshmi Priya, T.; Chen, Y.; Arshad, M.K.M.; Kerishnan, J.P.; Ruslinda, A.R.; Al-Douri, Y.; Voon, C.H.; Hashim, U. Cell-targeting aptamers act as intracellular delivery vehicles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 6955–6969. [CrossRef] [PubMed]
185. Xiang, D.; Shigdar, S.; Qiao, G.; Zhou, S.-F.; Li, Y.; Wei, M.Q.; Qiao, L.; Al. Shamaileh, H.; Zhu, Y.; Zheng, C.; et al. Aptamer-mediated cancer gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **2015**, *15*, 109–119. [CrossRef] [PubMed]

186. Parashar, A. Aptamers in Therapeutics. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **2016**, *10*, BE01–BE06. [CrossRef] [PubMed]
187. Zhu, G.; Niu, G.; Chen, X. Aptamer–Drug Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 2186–2197. [CrossRef] [PubMed]
188. Liu, B.; Zhang, J.; Liao, J.; Liu, J.; Chen, K.; Tong, G.; Yuan, P.; Liu, Z.; Pu, Y.; Liu, H. Aptamer-Functionalized Nanoparticles for Drug Delivery. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 3189–3203. [CrossRef] [PubMed]
189. Meng, H.-M.; Liu, H.; Kuai, H.; Peng, R.; Mo, L.; Zhang, X.-B. Aptamer-integrated DNA nanostructures for biosensing, bioimaging and cancer therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 2583–2602. [CrossRef] [PubMed]
190. Benedetto, G.; Vestal, C.G.; Richardson, C. Aptamer-Functionalized Nanoparticles as “Smart Bombs”: The Unrealized Potential for Personalized Medicine and Targeted Cancer Treatment. *Target. Oncol.* **2015**, *10*, 467–485. [CrossRef] [PubMed]
191. Zhu, J.; Huang, H.; Dong, S.; Ge, L.; Zhang, Y. Progress in Aptamer-Mediated Drug Delivery Vehicles for Cancer Targeting and Its Implications in Addressing Chemotherapeutic Challenges. *Theranostics* **2014**, *4*, 931–944. [CrossRef] [PubMed]
192. Cansiz, S.; Zhang, L.; Wu, C.; Wu, Y.; Teng, I.-T.; Hou, W.; Wang, Y.; Wan, S.; Cai, R.; Jin, C.; et al. DNA Aptamer Based Nanodrugs: Molecular engineering for efficiency. *Chem. Asian J.* **2015**, *10*, 2084–2094. [CrossRef] [PubMed]
193. Mathew, A.; Maekawa, T.; Sakthikumar, D. Aptamers in Targeted Nanotherapy. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *15*, 1102–1114. [CrossRef]
194. Wang, C.-C.; Wu, S.-M.; Li, H.-W.; Chang, H.-T. Biomedical Applications of DNA-Conjugated Gold Nanoparticles. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 1052–1062. [CrossRef] [PubMed]
195. Nimjee, S.M.; White, R.R.; Becker, R.C.; Sullenger, B.A. Aptamers as therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2017**, *57*, 61–79. [CrossRef] [PubMed]
196. Rusconi, C.P.; Scardino, E.; Layzer, J.; Pitoc, G.A.; Ortel, T.L.; Monroe, D.; Sullenger, B.A. RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature* **2002**, *419*, 90–94. [CrossRef] [PubMed]
197. Vavalle, J.P.; Rusconi, C.P.; Zelenkofske, S.; Wargin, W.A.; Ortel, T.L.; Alexander, J.H.; Povsic, T.J.; Becker, R.C. The effect of the REG2 Anticoagulation System on thrombin generation kinetics: a pharmacodynamic and pharmacokinetic first-in-human study. *J. Thromb. Thrombolysis* **2014**, *38*, 275–284. [CrossRef] [PubMed]
198. Woodruff, R.S.; Sullenger, B.A. Modulation of the coagulation cascade using aptamers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2015**, *35*, 2083–2091. [CrossRef] [PubMed]
199. Tan, L.; Neoh, K.G.; Kang, E.-T.; Choe, W.S.; Su, X. PEGylated Anti-MUC1 Aptamer-Doxorubicin Complex for Targeted Drug Delivery to MCF7 Breast Cancer Cells. *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 1331–1335. [CrossRef] [PubMed]
200. Taghdisi, S.M.; Danesh, N.M.; Emrani, A.S.; Tabrizian, K.; ZandKarimi, M.; Ramezani, M.; Abnous, K. Targeted delivery of Epirubicin to cancer cells by PEGylated A10 aptamer. *J. Drug Target.* **2013**, *21*, 739–744. [CrossRef] [PubMed]
201. Povsic, T.J.; Vavalle, J.P.; Aberle, L.H.; Kasprzak, J.D.; Cohen, M.G.; Mehran, R.; Bode, C.; Buller, C.E.; Montalescot, G.; Cornel, J.H.; et al. A Phase 2, randomized, partially blinded, active-controlled study assessing the efficacy and safety of variable anticoagulation reversal using the REG1 system in patients with acute coronary syndromes: results of the RADAR trial. *Eur. Heart J.* **2013**, *34*, 2481–2489. [CrossRef] [PubMed]
202. Povsic, T.J.; Lawrence, M.G.; Lincoff, A.M.; Mehran, R.; Rusconi, C.P.; Zelenkofske, S.L.; Huang, Z.; Sailstad, J.; Armstrong, P.W.; et al. Pre-existing anti-PEG antibodies are associated with severe immediate allergic reactions to pegnivacogin, a PEGylated aptamer. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *138*, 1712–1715. [CrossRef] [PubMed]
203. Lincoff, A.M.; Mehran, R.; Povsic, T.J.; Zelenkofske, S.L.; Huang, Z.; Armstrong, P.W.; Steg, P.G.; Bode, C.; Cohen, M.G.; Buller, C.; et al. Effect of the REG1 anticoagulation system versus bivalirudin on outcomes after percutaneous coronary intervention (REGULATE-PCI): A randomised clinical trial. *Lancet* **2016**, *387*, 349–356. [CrossRef]
204. Verheugt, F.W.A. An anticoagulant too good to be true for revascularisation. *Lancet* **2016**, *387*, 314–315. [CrossRef]

205. Ganson, N.J.; Povsic, T.J.; Sullenger, B.A.; Alexander, J.H.; Zelenkofske, S.L.; Sailstad, J.M.; Rusconi, C.P.; Hershfield, M.S. Pre-existing anti-polyethylene glycol antibody linked to first-exposure allergic reactions to pegnivacogin, a PEGylated RNA aptamer. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *137*, 1610–1613. [CrossRef] [PubMed]
206. Richter, A.W.; Akerblom, E. Antibodies against polyethylene glycol produced in animals by immunization with monomethoxy polyethylene glycol modified proteins. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **1983**, *70*, 124–131. [CrossRef] [PubMed]
207. Ganson, N.J.; Kelly, S.J.; Scarlett, E.; Sundry, J.S.; Hershfield, M.S. Control of hyperuricemia in subjects with refractory gout, and induction of antibody against poly(ethylene glycol) (PEG), in a phase I trial of subcutaneous PEGylated urate oxidase. *Arthritis Res. Ther.* **2006**, *8*, R12. [CrossRef] [PubMed]
208. Hershfield, M.S.; Ganson, N.J.; Kelly, S.J.; Scarlett, E.L.; Jaggars, D.A.; Sundry, J.S. Induced and pre-existing anti-polyethylene glycol antibody in a trial of every 3-week dosing of pegloticase for refractory gout, including in organ transplant recipients. *Arthritis Res. Ther.* **2014**, *16*, R63. [CrossRef] [PubMed]
209. Armstrong, J.K.; Hempel, G.; Koling, S.; Chan, L.S.; Fisher, T.; Meiselman, H.J.; Garratty, G. Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* **2007**, *110*, 103–111. [CrossRef] [PubMed]
210. Ruckman, J.; Green, L.S.; Beeson, J.; Waugh, S.; Gillette, W.L.; Henninger, D.D.; Claesson-Welsh, L.; Janjic, N. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based Aptamers to the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165) Inhibition of Receptor Binding and VEGF-induced Vascular Permeability through Interactions Requiring the Exon 7-encoded Domain. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20556–20567. [CrossRef] [PubMed]
211. Chen, W.; Sridharan, V.; Soundararajan, S.; Otake, Y.; Stuart, R.; Jones, D.; Fernandes, D. Activity and Mechanism of Action of AS1411 in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Blood* **2007**, *110*, 1604.
212. Xu, X.; Hamhouyia, F.; Thomas, S.D.; Burke, T.J.; Girvan, A.C.; McGregor, W.G.; Trent, J.O.; Miller, D.M.; Bates, P.J. Inhibition of DNA Replication and Induction of S Phase Cell Cycle Arrest by G-rich Oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 43221–43230. [CrossRef] [PubMed]
213. Abdelmohsen, K.; Gorospe, M. RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA Biol.* **2012**, *9*, 799–808. [CrossRef] [PubMed]
214. Xu, Z.; Joshi, N.; Agarwal, A.; Dahiya, S.; Bittner, P.; Smith, E.; Taylor, S.; Piwnica-Worms, D.; Weber, J.; Leonard, J.R. Knocking down nucleolin expression in gliomas inhibits tumor growth and induces cell cycle arrest. *J. Neurooncol.* **2012**, *108*, 59–67. [CrossRef] [PubMed]
215. Laber, D.A.; Sharma, V.R.; Bhupalam, L.; Taft, B.; Hendler, F.J.; Barnhart, K.M. Update on the first phase I study of AGRO100 in advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 3064. [CrossRef]
216. Laber, D.A.; Taft, B.S.; Kloecker, G.H.; Bates, P.J.; Trent, J.O.; Miller, D.M. Extended phase I study of AS1411 in renal and non-small cell lung cancers. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 13098.
217. Rosenberg, J.E.; Bambury, R.; Drabkin, H.A.; Lara, P.N.; Harzstark, A.L.; Figlin, R.A.; Smith, G.W.; Choueiri, T.; Erlandsson, F.; Laber, D.A. A phase II trial of the nucleolin-targeted DNA aptamer AS1411 in metastatic refractory renal cell carcinoma. *Investig. New Drugs* **2014**, *32*, 178–187. [CrossRef] [PubMed]
218. Stuart, R.K.; Stockerl-Goldstein, K.; Cooper, M.; Devetten, M.; Herzig, R.; Medeiros, B.; Schiller, G.; Wei, A.; Acton, G.; Rizzieri, D. Randomized phase II trial of the nucleolin targeting aptamer AS1411 combined with high-dose cytarabine in relapsed/refractory acute myeloid leukemia (AML). *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 15s.
219. Vater, A.; Sahlmann, J.; Kröger, N.; Zöllner, S.; Lioznov, M.; Maasch, C.; Buchner, K.; Vossmeier, D.; Schwoebel, F.; Purschke, W.G.; et al. Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Mobilization in Mice and Humans by a First-in-Class Mirror-Image Oligonucleotide Inhibitor of CXCL12. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2013**, *94*, 150–157. [CrossRef] [PubMed]
220. Liu, S.-C.; Alomran, R.; Chernikova, S.B.; Lartey, F.; Stafford, J.; Jang, T.; Merchant, M.; Zboralski, D.; Zöllner, S.; Kruschinski, A.; et al. Blockade of SDF-1 after irradiation inhibits tumor recurrences of autochthonous brain tumors in rats. *Neuro-Oncol.* **2014**, *16*, 21–28. [CrossRef] [PubMed]
221. Hoellenriegel, J.; Zboralski, D.; Maasch, C.; Rosin, N.Y.; Wierda, W.G.; Keating, M.J.; Kruschinski, A.; Burger, J.A. The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood* **2014**, *123*, 1032–1039. [CrossRef] [PubMed]

222. Steurer, M.; Montillo, M.; Scarfò, L.; Mauro, F.R.; Andel, J.; Wildner, S.; Trentin, L.; Janssens, A.; Burgstaller, S.; Kruschinski, A.; et al. Results from a Phase IIa Study of the Anti-CXCL12 Spiegelmer Olaptosed Pegol (NOX-A12) in Combination with Bendamustine/Rituximab in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* **2014**, *124*, 1996.
223. Ludwig, H.; Weisel, K.; Petrucci, M.T.; Leleu, X.; Cafro, A.M.; Garderet, L.; Leitgeb, C.; Foa, R.; Greil, R.; Yakoub-Agha, I.; et al. Olaptosed pegol, an anti-CXCL12/SDF-1 Spiegelmer, alone and with bortezomib-dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma: A Phase IIa Study. *Leukemia* **2017**, *31*, 997–1000. [CrossRef] [PubMed]
224. Li, S.; Xu, H.; Ding, H.; Huang, Y.; Cao, X.; Yang, G.; Li, J.; Xie, Z.; Meng, Y.; Li, X.; Zhao, Q.; Shen, B.; Shao, N. Identification of an aptamer targeting hnRNP A1 by tissue slide-based SELEX. *J. Pathol.* **2009**, *218*, 327–336. [CrossRef] [PubMed]
225. Zhang, J.; Li, S.; Liu, F.; Zhou, L.; Shao, N.; Zhao, X. SELEX aptamer used as a probe to detect circulating tumor cells in peripheral blood of pancreatic cancer patients. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121920. [CrossRef] [PubMed]
226. Wang, H.; Li, X.; Volk, D.E.; Lokesh, G.L.-R.; Elizondo-Riojas, M.-A.; Li, L.; Nick, A.M.; Sood, A.K.; Rosenblatt, K.P.; Gorenstein, D.G. Morph-X-Select: Morphology-based tissue aptamer selection for ovarian cancer biomarker discovery. *BioTechniques* **2016**, *61*, 249–259. [CrossRef] [PubMed]
227. Mi, J.; Liu, Y.; Rabbani, Z.N.; Yang, Z.; Urban, J.H.; Sullenger, B.A.; Clary, B.M. In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 22–24. [CrossRef] [PubMed]
228. Cheng, C.; Chen, Y.H.; Lennox, K.A.; Behlke, M.A.; Davidson, B.L. In vivo SELEX for Identification of Brain-penetrating Aptamers. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2013**, *2*, e67. [CrossRef] [PubMed]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Conclusion générale

L'hétérogénéité du GBM contribue à l'agressivité du GBM, à l'échec thérapeutique et à une faible survie. Plusieurs modèles pouvant expliquer l'origine de l'hétérogénéité ont été décrits. En ce qui concerne l'intégrine $\alpha 5$, nous avons mis en évidence que l'hétérogénéité de son expression peut être la conséquence de l'existence de différentes cellules souches de glioblastomes.

Nos résultats démontrent que l'intégrine $\alpha 5$ est rarement exprimée dans les cellules souches mais est exprimée dans certaines cellules différenciées, où son expression est associée à un caractère plus agressif. Cette expression protéique semble être régulée au sein de cellules souches au niveau transcriptomique. Les études actuelles démontrent l'expression des intégrines $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 3$ et $\beta 8$ dans les CSGs et leur rôle dans la régulation des CSGs seulement. Au contraire de l'intégrine $\alpha 5$, l'expression de ces intégrines est diminuée au cours de la différenciation. Les CSGs représentant une faible proportion au sein de la masse tumorale, nous pouvons nous demander la pertinence de cibler les intégrines exprimées uniquement dans les CSGs. En effet, l'analyse du taux d'ARNm de l'intégrine $\alpha 6$ ne montre pas de corrélation avec la survie des patients (553). En revanche, cette association est retrouvée avec l'intégrine $\alpha 5$. Ainsi, étant exprimée par une plus grande population cellulaire et étant associée à un phénotype plus agressif, l'intégrine $\alpha 5$ apparaît comme une cible intéressante.

Le Cilengitide est le premier antagoniste anti-intégrine à entrer en essais cliniques de phase III. Son échec a remis en cause l'intérêt des intégrines dans le traitement de patients atteints de GBM. L'hétérogénéité tumorale représente un frein pour un ensemble de thérapies ciblées dont le Cilengitide. Nos travaux apportent une meilleure compréhension de l'origine de l'expression hétérogène de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Les connaissances apportées par ce travail permettent de mieux comprendre la relation entre CSGs, l'expression tumorale de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et un phénotype plus agressif et ouvrent de nouvelles perspectives.

Au vu de nos résultats, le rôle de l'intégrine $\alpha 5$ dans la migration des cellules de GBM différenciées est indéniable, confirmant les travaux précédents du laboratoire (464,578,579). Les données de la littérature démontrent que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ semble être impliquée dans la migration de cellules issues de différents cancers. Nous avons notamment mis en évidence la migration de cellules issues de carcinomes utérins et la formation de métastases médiées par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Bien que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ soit impliquée dans l'évasion des deux types de tumeurs, sa régulation entre statut souche et différencié est opposée. En effet, l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est augmentée après différenciation dans le GBM et inversement, et semble plus élevée dans les cellules souches de carcinome utérin. Ces données reflètent la nécessité d'étudier une cible dans chaque contexte tumoral.

La relation entre les cellules souches et les cellules différenciées, l'expression hétérogène de l'intégrine et son implication dans l'agressivité tumorale sont largement étayées d'un point de vue préclinique dans ce travail. Les connaissances acquises au cours de cette étude permettent de mieux comprendre l'origine de

foyers ou de tumeurs plus agressifs, démontrant l'intérêt de l'intégrine $\alpha5\beta1$ comme cible thérapeutique dans le GBM et d'autres tumeurs solides.

Bibliographie

1. Amirian ES, Armstrong GN, Zhou R, Lau CC, Claus EB, Barnholtz-Sloan JS, et al. The Glioma International Case-Control Study: A Report From the Genetic Epidemiology of Glioma International Consortium. *Am J Epidemiol.* 15 janv 2016;183(2):85-91.
2. Gigineishvili D, Shengelia N, Shalashvili G, Rohrmann S, Tsiskaridze A, Shakarishvili R. Primary brain tumour epidemiology in Georgia: first-year results of a population-based study. *J Neurooncol.* avr 2013;112(2):241-6.
3. Zouaoui S, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Darlix A, Bessaoud F, Fabbro-Peray P, et al. [French brain tumor database: general results on 40,000 cases, main current applications and future prospects]. *Neurochirurgie.* févr 2012;58(1):4-13.
4. Rajaraman P, Melin BS, Wang Z, McKean-Cowdin R, Michaud DS, Wang SS, et al. Genome-wide association study of glioma and meta-analysis. *Hum Genet.* déc 2012;131(12):1877-88.
5. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin.* nov 2007;25(4):867-90, vii.
6. Hardell L, Carlberg M, Söderqvist F, Mild KH, Morgan LL. Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for > or =10 years. *Occup Environ Med.* sept 2007;64(9):626-32.
7. Al-Serori H, Kundi M, Ferk F, Mišić M, Nersesyan A, Murbach M, et al. Evaluation of the potential of mobile phone specific electromagnetic fields (UMTS) to produce micronuclei in human glioblastoma cell lines. *Toxicol In Vitro.* avr 2017;40:264-71.
8. Upadhyay N, Waldman AD. Conventional MRI evaluation of gliomas. *Br J Radiol.* déc 2011;84 Spec No 2:S107-111.
9. Khan MN, Sharma AM, Pitz M, Loewen SK, Quon H, Poulin A, et al. High-grade glioma management and response assessment-recent advances and current challenges. *Curr Oncol.* août 2016;23(4):e383-391.
10. Pallud J, Mandonnet E, Duffau H, Kujas M, Guillevin R, Galanaud D, et al. Prognostic value of initial magnetic resonance imaging growth rates for World Health Organization grade II gliomas. *Ann Neurol.* sept 2006;60(3):380-3.
11. Zonari P, Baraldi P, Crisi G. Multimodal MRI in the characterization of glial neoplasms: the combined role of single-voxel MR spectroscopy, diffusion imaging and echo-planar perfusion imaging. *Neuroradiology.* oct 2007;49(10):795-803.
12. Guillevin R, Menuel C, Taillibert S, Capelle L, Costalat R, Abud L, et al. Predicting the outcome of grade II glioma treated with temozolomide using proton magnetic resonance spectroscopy. *Br J Cancer.* 7 juin 2011;104(12):1854-61.
13. Colavolpe C, Metellus P, Mancini J, Barrie M, Béquet-Boucard C, Figarella-Branger D, et al. Independent prognostic value of pre-treatment 18-FDG-PET in high-grade gliomas. *J Neurooncol.* mai 2012;107(3):527-35.
14. Di Chiro G, Brooks RA. PET-FDG of untreated and treated cerebral gliomas. *J Nucl Med.* mars 1988;29(3):421-3.
15. Toyonaga T, Yamaguchi S, Hirata K, Kobayashi K, Manabe O, Watanabe S, et al. Hypoxic glucose metabolism in glioblastoma as a potential prognostic factor. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* avr 2017;44(4):611-9.
16. Bell C, Dowson N, Fay M, Thomas P, Puttick S, Gal Y, et al. Hypoxia imaging in gliomas with 18F-fluoromisonidazole PET: toward clinical translation. *Semin Nucl Med.* mars 2015;45(2):136-50.
17. Schmainda KM, Zhang Z, Prah M, Snyder BS, Gilbert MR, Sorensen AG, et al. Dynamic susceptibility contrast MRI measures of relative cerebral blood volume as a prognostic marker for overall survival in recurrent glioblastoma: results from the ACRIN 6677/RTOG 0625 multicenter trial. *Neuro-oncology.* août 2015;17(8):1148-56.
18. Essig M, Anzalone N, Combs SE, Dörfler À, Lee S-K, Picozzi P, et al. MR imaging of neoplastic central nervous system lesions: review and recommendations for current practice. *AJNR Am J Neuroradiol.* mai 2012;33(5):803-17.

19. Yamasaki F, Kurisu K, Aoki T, Yamanaka M, Kajiwaru Y, Watanabe Y, et al. Advantages of high b-value diffusion-weighted imaging to diagnose pseudo-responses in patients with recurrent glioma after bevacizumab treatment. *Eur J Radiol.* oct 2012;81(10):2805-10.
20. Shen N, Zhao L, Jiang J, Jiang R, Su C, Zhang S, et al. Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted imaging analysis of diffusion and microperfusion in grading gliomas and comparison with arterial spin labeling for evaluation of tumor perfusion. *J Magn Reson Imaging.* sept 2016;44(3):620-32.
21. Arevalo-Perez J, Peck KK, Young RJ, Holodny AI, Karimi S, Lyo JK. Dynamic Contrast-Enhanced Perfusion MRI and Diffusion-Weighted Imaging in Grading of Gliomas. *J Neuroimaging.* oct 2015;25(5):792-8.
22. Ragel BT, Ryken TC, Kalkanis SN, Ziu M, Cahill D, Olson JJ. The role of biopsy in the management of patients with presumed diffuse low grade glioma: A systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol.* déc 2015;125(3):481-501.
23. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-20.
24. Kernohan JW, Mabon RF. A simplified classification of the gliomas. *Proc Staff Meet Mayo Clin.* 2 févr 1949;24(3):71-5.
25. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol.* juill 1993;3(3):255-68.
26. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica.* 12 juill 2007;114(2):97-109.
27. Bailey P, Cushing H. A classification of tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlation study of prognosis (1926), J.B Lippincott Co.
28. Zülch KJ. Types histologiques des tumeurs du système nerveux central. Genève: Organisation mondiale de la santé; 1979
29. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* déc 2008;116(6):597-602.
30. Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, Quilichini B, Maues De Paula A, Fernandez C, et al. Classification histologique et moléculaire des gliomes. *Revue Neurologique.* juin 2008;164(6-7):505-15.
31. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncology.* 1999;1(1):44-51.
32. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* mai 2007;170(5):1445-53.
33. Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Di Patre PL, Franceschi S, et al. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* sept 2006;65(9):846-54.
34. van den Bent MJ. Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathologica.* sept 2010;120(3):297-304.
35. Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, et al. International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol.* sept 2014;24(5):429-35.
36. Kloosterhof NK, Bralten LBC, Dubbink HJ, French PJ, van den Bent MJ. Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of diffuse glioma? *Lancet Oncol.* janv 2011;12(1):83-91.
37. Cohen AL, Holmen SL, Colman H. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *Current Neurology and Neuroscience Reports [Internet].* mai 2013 [cité 26 juin 2018];13(5). Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s11910-013-0345-4>

38. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* avr 2009;174(4):1149-53.
39. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science.* 10 avr 2009;324(5924):261-5.
40. Juratli TA, Kirsch M, Robel K, Soucek S, Geiger K, von Kummer R, et al. IDH mutations as an early and consistent marker in low-grade astrocytomas WHO grade II and their consecutive secondary high-grade gliomas. *J Neurooncol.* juill 2012;108(3):403-10.
41. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 26 sept 2008;321(5897):1807-12.
42. Bleeker FE, Atai NA, Lamba S, Jonker A, Rijkeboer D, Bosch KS, et al. The prognostic IDH1(R132) mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma. *Acta Neuropathol.* avr 2010;119(4):487-94.
43. Yan H, Bigner DD, Velculescu V, Parsons DW. Mutant metabolic enzymes are at the origin of gliomas. *Cancer Res.* 15 déc 2009;69(24):9157-9.
44. Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Bäcklund LM, Chan R, Jones DTW, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro-oncology.* août 2009;11(4):341-7.
45. Birner P, Toumangelova-Uzeir K, Natchev S, Guentchev M. Expression of mutated isocitrate dehydrogenase-1 in gliomas is associated with p53 and EGFR expression. *Folia Neuropathol.* 2011;49(2):88-93.
46. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol.* 1 sept 2009;27(25):4150-4.
47. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* oct 2009;118(4):469-74.
48. Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RGW, Aldape KD, Yung WKA, Salama SR, et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med.* 25 juin 2015;372(26):2481-98.
49. Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res.* 15 oct 2006;66(20):9852-61.
50. Cairncross JG, Wang M, Jenkins RB, Shaw EG, Giannini C, Brachman DG, et al. Benefit from procarbazine, lomustine, and vincristine in oligodendroglial tumors is associated with mutation of IDH. *J Clin Oncol.* 10 mars 2014;32(8):783-90.
51. van den Bent MJ, Looijenga LHJ, Langenberg K, Dinjens W, Graveland W, Uytendwilligen L, et al. Chromosomal anomalies in oligodendroglial tumors are correlated with clinical features. *Cancer.* 1 mars 2003;97(5):1276-84.
52. Felsberg J, Erkwow A, Sabel MC, Kirsch L, Fimmers R, Blaschke B, et al. Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. *Brain Pathol.* avr 2004;14(2):121-30.
53. Lavon I, Zrihan D, Zelikovitch B, Fellig Y, Fuchs D, Soffer D, et al. Longitudinal assessment of genetic and epigenetic markers in oligodendrogliomas. *Clin Cancer Res.* 1 mars 2007;13(5):1429-37.
54. Eustermann S, Yang J-C, Law MJ, Amos R, Chapman LM, Jelinska C, et al. Combinatorial readout of histone H3 modifications specifies localization of ATRX to heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol.* 12 juin 2011;18(7):777-82.
55. Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh K-M, Stadler SC, Allis CD. Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc Natl Acad Sci USA.* 10 août 2010;107(32):14075-80.

56. Clynes D, Higgs DR, Gibbons RJ. The chromatin remodeller ATRX: a repeat offender in human disease. *Trends Biochem Sci.* sept 2013;38(9):461-6.
57. Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, Klein AP, Edil BH, Shi C, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science.* 22 juill 2011;333(6041):425.
58. Liu X-Y, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang D-A, Fontebasso AM, et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol.* nov 2012;124(5):615-25.
59. Clynes D, Gibbons RJ. ATRX and the replication of structured DNA. *Curr Opin Genet Dev.* juin 2013;23(3):289-94.
60. Takano S, Ishikawa E, Sakamoto N, Matsuda M, Akutsu H, Noguchi M, et al. Immunohistochemistry on IDH 1/2, ATRX, p53 and Ki-67 substitute molecular genetic testing and predict patient prognosis in grade III adult diffuse gliomas. *Brain Tumor Pathol.* avr 2016;33(2):107-16.
61. Xu H, Zong H, Ma C, Ming X, Shang M, Li K, et al. Epidermal growth factor receptor in glioblastoma. *Oncology Letters.* juill 2017;14(1):512-6.
62. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell.* 10 oct 2013;155(2):462-77.
63. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P-L, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 1 oct 2004;64(19):6892-9.
64. Zadeh G, Bhat KPL, Aldape K. EGFR and EGFRvIII in glioblastoma: partners in crime. *Cancer Cell.* 14 oct 2013;24(4):403-4.
65. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2 août 1994;91(16):7727-31.
66. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* nov 1990;87(21):8602-6.
67. Nagane M, Coufal F, Lin H, Bögl O, Cavenee WK, Huang HJ. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res.* 1 nov 1996;56(21):5079-86.
68. Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 15 oct 2003;63(20):6962-70.
69. Weppeler SA, Li Y, Dubois L, Lieuwes N, Jutten B, Lambin P, et al. Expression of EGFR variant VIII promotes both radiation resistance and hypoxia tolerance. *Radiother Oncol.* juin 2007;83(3):333-9.
70. von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol.* janv 2011;21(1):74-87.
71. Chen C, Wang F, Cheng Y, Cheng Y, Ren X, Huai H. Predictive value of MGMT promoter methylation status in Asian and Caucasian patients with malignant gliomas: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(4):6553-62.
72. Minniti G, Salvati M, Arcella A, Buttarelli F, D'Elia A, Lanzetta G, et al. Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in elderly patients with glioblastoma treated with radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide. *J Neurooncol.* avr 2011;102(2):311-6.
73. Boots-Sprenger SHE, Sijben A, Rijntjes J, Tops BBJ, Idema AJ, Rivera AL, et al. Significance of complete 1p/19q co-deletion, IDH1 mutation and MGMT promoter methylation in gliomas: use with caution. *Mod Pathol.* juill 2013;26(7):922-9.
74. Hu X, Miao W, Zou Y, Zhang W, Zhang Y, Liu H. Expression of p53, epidermal growth factor receptor, Ki-67 and O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human gliomas. *Oncology Letters.* juill 2013;6(1):130-4.
75. Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, et al. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science.* 4 mars 2011;331(6021):1199-203.

76. Reuss DE, Sahm F, Schrimpf D, Wiestler B, Capper D, Koelsche C, et al. ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an « integrated » diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol.* janv 2015;129(1):133-46.
77. Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, et al. Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J Clin Oncol.* 1 déc 2011;29(34):4482-90.
78. Chen L, Voronovich Z, Clark K, Hands I, Mannas J, Walsh M, et al. Predicting the likelihood of an isocitrate dehydrogenase 1 or 2 mutation in diagnoses of infiltrative glioma. *Neuro-oncology.* nov 2014;16(11):1478-83.
79. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* mai 2009;10(5):459-66.
80. Zhang J, Stevens MFG, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol.* janv 2012;5(1):102-14.
81. Prados MD, Byron SA, Tran NL, Phillips JJ, Molinaro AM, Ligon KL, et al. Toward precision medicine in glioblastoma: the promise and the challenges. *Neuro-Oncology.* août 2015;17(8):1051-63.
82. Franceschi E, Tosoni A, Bartolini S, Mazzocchi V, Fioravanti A, Brandes AA. Treatment options for recurrent glioblastoma: pitfalls and future trends. *Expert Rev Anticancer Ther.* mai 2009;9(5):613-9.
83. Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, Tonn J-C, Pentheroudakis G, ESMO Guidelines Working Group. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* sept 2014;25 Suppl 3:iii93-101.
84. Barani IJ, Larson DA. Radiation therapy of glioblastoma. *Cancer Treat Res.* 2015;163:49-73.
85. Sun H, Du S, Liao G, Xie X, Ren C, Yuan YW. Do glioma patients derive any therapeutic benefit from taking a higher cumulative dose of temozolomide regimens?: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* mai 2015;94(20):e827.
86. Bloch O, Han SJ, Cha S, Sun MZ, Aghi MK, McDermott MW, et al. Impact of extent of resection for recurrent glioblastoma on overall survival: clinical article. *J Neurosurg.* déc 2012;117(6):1032-8.
87. Franceschi E, Bartolotti M, Tosoni A, Bartolini S, Sturiale C, Fioravanti A, et al. The effect of re-operation on survival in patients with recurrent glioblastoma. *Anticancer Res.* mars 2015;35(3):1743-8.
88. Brada M, Stenning S, Gabe R, Thompson LC, Levy D, Rampling R, et al. Temozolomide versus procarbazine, lomustine, and vincristine in recurrent high-grade glioma. *J Clin Oncol.* 20 oct 2010;28(30):4601-8.
89. Wolbers JG. Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies. *Chin J Cancer.* janv 2014;33(1):8-15.
90. Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, Morrison PF, Dedrick RL, Oldfield EH. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15 mars 1994;91(6):2076-80.
91. Jahangiri A, Chin AT, Flanigan PM, Chen R, Bankiewicz K, Aghi MK. Convection-enhanced delivery in glioblastoma: a review of preclinical and clinical studies. *J Neurosurg.* janv 2017;126(1):191-200.
92. Wolinsky JB, Colson YL, Grinstaff MW. Local drug delivery strategies for cancer treatment: gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. *J Control Release.* 10 avr 2012;159(1):14-26.
93. Vellimana AK, Recinos VR, Hwang L, Fowers KD, Li KW, Zhang Y, et al. Combination of paclitaxel thermal gel depot with temozolomide and radiotherapy significantly prolongs survival in an experimental rodent glioma model. *J Neurooncol.* févr 2013;111(3):229-36.
94. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncology.* 2003;5(2):79-88.

95. Zhang Y-D, Dai R-Y, Chen Z, Zhang Y-H, He X-Z, Zhou J. Efficacy and safety of carmustine wafers in the treatment of glioblastoma multiforme: a systematic review. *Turk Neurosurg.* 2014;24(5):639-45.
96. Xing W, Shao C, Qi Z, Yang C, Wang Z. The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3341-8.
97. Akiyama Y, Kimura Y, Enatsu R, Mikami T, Wanibuchi M, Mikuni N. Advantages and Disadvantages of Combined Chemotherapy with Carmustine Wafer and Bevacizumab in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma: A Single-Institutional Experience. *World Neurosurg.* mai 2018;113:e508-14.
98. Nørøxe DS, Poulsen HS, Lassen U. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO Open.* 2016;1(6):e000144.
99. Majewska E, Szeliga M. AKT/GSK3 β Signaling in Glioblastoma. *Neurochem Res.* mars 2017;42(3):918-24.
100. Westphal M, Heese O, Steinbach JP, Schnell O, Schackert G, Mehdorn M, et al. A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. *Eur J Cancer.* mars 2015;51(4):522-32.
101. Clarke JL, Molinaro AM, Phillips JJ, Butowski NA, Chang SM, Perry A, et al. A single-institution phase II trial of radiation, temozolomide, erlotinib, and bevacizumab for initial treatment of glioblastoma. *Neuro-oncology.* juill 2014;16(7):984-90.
102. Raizer JJ, Giglio P, Hu J, Groves M, Merrell R, Conrad C, et al. A phase II study of bevacizumab and erlotinib after radiation and temozolomide in MGMT unmethylated GBM patients. *J Neurooncol.* janv 2016;126(1):185-92.
103. Peereboom DM, Ahluwalia MS, Ye X, Supko JG, Hilderbrand SL, Phuphanich S, et al. NABTT 0502: a phase II and pharmacokinetic study of erlotinib and sorafenib for patients with progressive or recurrent glioblastoma multiforme. *Neuro-oncology.* avr 2013;15(4):490-6.
104. Chakravarti A, Wang M, Robins HI, Lautenschlaeger T, Curran WJ, Brachman DG, et al. RTOG 0211: a phase 1/2 study of radiation therapy with concurrent gefitinib for newly diagnosed glioblastoma patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 avr 2013;85(5):1206-11.
105. Uhm JH, Ballman KV, Wu W, Giannini C, Krauss JC, Buckner JC, et al. Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed Grade 4 astrocytoma: Mayo/North Central Cancer Treatment Group Study N0074. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 juin 2011;80(2):347-53.
106. Reardon DA, Nabors LB, Mason WP, Perry JR, Shapiro W, Kavan P, et al. Phase I/randomized phase II study of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, with or without protracted temozolomide in adults with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology.* mars 2015;17(3):430-9.
107. Thiessen B, Stewart C, Tsao M, Kamel-Reid S, Schaiquevich P, Mason W, et al. A phase I/II trial of GW572016 (lapatinib) in recurrent glioblastoma multiforme: clinical outcomes, pharmacokinetics and molecular correlation. *Cancer Chemother Pharmacol.* janv 2010;65(2):353-61.
108. Yu A, Faiq N, Green S, Lai A, Green R, Hu J, et al. Report of safety of pulse dosing of lapatinib with temozolomide and radiation therapy for newly-diagnosed glioblastoma in a pilot phase II study. *J Neurooncol.* sept 2017;134(2):357-62.
109. Jo M-Y, Kim YG, Kim Y, Lee SJ, Kim MH, Joo KM, et al. Combined therapy of temozolomide and ZD6474 (vandetanib) effectively reduces glioblastoma tumor volume through anti-angiogenic and anti-proliferative mechanisms. *Mol Med Rep.* juill 2012;6(1):88-92.
110. Lee EQ, Kaley TJ, Duda DG, Schiff D, Lassman AB, Wong ET, et al. A Multicenter, Phase II, Randomized, Noncomparative Clinical Trial of Radiation and Temozolomide with or without Vandetanib in Newly Diagnosed Glioblastoma Patients. *Clin Cancer Res.* 15 août 2015;21(16):3610-8.
111. Tivnan A, Heilinger T, Lavelle EC, Prehn JHM. Advances in immunotherapy for the treatment of glioblastoma. *J Neurooncol.* 2017;131(1):1-9.

112. Schuster J, Lai RK, Recht LD, Reardon DA, Paleologos NA, Groves MD, et al. A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study. *Neuro-oncology*. juin 2015;17(6):854-61.
113. Weller M, Butowski N, Tran DD, Recht LD, Lim M, Hirte H, et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol*. oct 2017;18(10):1373-85.
114. Genßler S, Burger MC, Zhang C, Oelsner S, Mildenerger I, Wagner M, et al. Dual targeting of glioblastoma with chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells overcomes heterogeneity of target antigen expression and enhances antitumor activity and survival. *Oncoimmunology*. avr 2016;5(4):e1119354.
115. Reardon DA, Dresemann G, Taillibert S, Campone M, van den Bent M, Clement P, et al. Multicentre phase II studies evaluating imatinib plus hydroxyurea in patients with progressive glioblastoma. *Br J Cancer*. 15 déc 2009;101(12):1995-2004.
116. Lassman AB, Pugh SL, Gilbert MR, Aldape KD, Geinoz S, Beumer JH, et al. Phase 2 trial of dasatinib in target-selected patients with recurrent glioblastoma (RTOG 0627). *Neuro-oncology*. juill 2015;17(7):992-8.
117. Odia Y, Sul J, Shih JH, Kreisl TN, Butman JA, Iwamoto FM, et al. A Phase II trial of tandutinib (MLN 518) in combination with bevacizumab for patients with recurrent glioblastoma. *CNS Oncol*. 2016;5(2):59-67.
118. Batchelor TT, Gerstner ER, Ye X, Desideri S, Duda DG, Peereboom D, et al. Feasibility, phase I, and phase II studies of tandutinib, an oral platelet-derived growth factor receptor- β tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology*. 01 2017;19(4):567-75.
119. Grisanti S, Ferrari VD, Buglione M, Agazzi GM, Liserre R, Poliani L, et al. Second line treatment of recurrent glioblastoma with sunitinib: results of a phase II study and systematic review of literature. *J Neurosurg Sci*. 28 sept 2016;
120. Balaña C, Gil MJ, Perez P, Reynes G, Gallego O, Ribalta T, et al. Sunitinib administered prior to radiotherapy in patients with non-resectable glioblastoma: results of a phase II study. *Target Oncol*. déc 2014;9(4):321-9.
121. Lassen U, Sorensen M, Gaziel TB, Hasselbalch B, Poulsen HS. Phase II study of bevacizumab and temsirolimus combination therapy for recurrent glioblastoma multiforme. *Anticancer Res*. avr 2013;33(4):1657-60.
122. Lee EQ, Kuhn J, Lamborn KR, Abrey L, DeAngelis LM, Lieberman F, et al. Phase I/II study of sorafenib in combination with temsirolimus for recurrent glioblastoma or gliosarcoma: North American Brain Tumor Consortium study 05-02. *Neuro-oncology*. déc 2012;14(12):1511-8.
123. Wick W, Gorlia T, Bady P, Platten M, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, et al. Phase II Study of Radiotherapy and Temsirolimus versus Radiochemotherapy with Temozolomide in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma without MGMT Promoter Hypermethylation (EORTC 26082). *Clin Cancer Res*. 1 oct 2016;22(19):4797-806.
124. Arcella A, Biagioni F, Antonietta Oliva M, Bucci D, Frati A, Esposito V, et al. Rapamycin inhibits the growth of glioblastoma. *Brain Res*. 7 févr 2013;1495:37-51.
125. Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Gururangan S, Friedman AH, Herndon JE, et al. Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol*. janv 2010;96(2):219-30.
126. Ma DJ, Galanis E, Anderson SK, Schiff D, Kaufmann TJ, Peller PJ, et al. A phase II trial of everolimus, temozolomide, and radiotherapy in patients with newly diagnosed glioblastoma: NCCTG N057K. *Neuro-oncology*. sept 2015;17(9):1261-9.
127. Kahn J, Hayman TJ, Jamal M, Rath BH, Kramp T, Camphausen K, et al. The mTORC1/mTORC2 inhibitor AZD2014 enhances the radiosensitivity of glioblastoma stem-like cells. *Neuro-oncology*. janv 2014;16(1):29-37.
128. Shi F, Guo H, Zhang R, Liu H, Wu L, Wu Q, et al. The PI3K inhibitor GDC-0941 enhances radiosensitization and reduces chemoresistance to temozolomide in GBM cell lines. *Neuroscience*. 27 mars 2017;346:298-308.
129. Speranza M-C, Nowicki MO, Behera P, Cho C-F, Chiocca EA, Lawler SE. BKM-120 (Buparlisib): A Phosphatidylinositol-3 Kinase Inhibitor with Anti-Invasive Properties in Glioblastoma. *Sci Rep*. 5 févr 2016;6:20189.

130. Netland IA, Førde HE, Sleire L, Leiss L, Rahman MA, Skeie BS, et al. Treatment with the PI3K inhibitor buparlisib (NVP-BKM120) suppresses the growth of established patient-derived GBM xenografts and prolongs survival in nude rats. *J Neurooncol.* 2016;129(1):57-66.
131. Koul D, Shen R, Kim Y-W, Kondo Y, Lu Y, Bankson J, et al. Cellular and in vivo activity of a novel PI3K inhibitor, PX-866, against human glioblastoma. *Neuro-oncology.* juin 2010;12(6):559-69.
132. Pitz MW, Eisenhauer EA, MacNeil MV, Thiessen B, Easaw JC, Macdonald DR, et al. Phase II study of PX-866 in recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology.* sept 2015;17(9):1270-4.
133. Wen PY, Omuro A, Ahluwalia MS, Fathallah-Shaykh HM, Mohile N, Lager JJ, et al. Phase I dose-escalation study of the PI3K/mTOR inhibitor voxtalisib (SAR245409, XL765) plus temozolomide with or without radiotherapy in patients with high-grade glioma. *Neuro-oncology.* sept 2015;17(9):1275-83.
134. Mason WP, Belanger K, Nicholas G, Vallières I, Mathieu D, Kavan P, et al. A phase II study of the Ras-MAPK signaling pathway inhibitor TLN-4601 in patients with glioblastoma at first progression. *J Neurooncol.* avr 2012;107(2):343-9.
135. Jakubowicz-Gil J, Bądziul D, Langner E, Wertel I, Zając A, Rzeski W. Temozolomide and sorafenib as programmed cell death inducers of human glioma cells. *Pharmacol Rep.* août 2017;69(4):779-87.
136. Zustovich F, Landi L, Lombardi G, Porta C, Galli L, Fontana A, et al. Sorafenib plus daily low-dose temozolomide for relapsed glioblastoma: a phase II study. *Anticancer Res.* août 2013;33(8):3487-94.
137. Galanis E, Anderson SK, Lafky JM, Uhm JH, Giannini C, Kumar SK, et al. Phase II study of bevacizumab in combination with sorafenib in recurrent glioblastoma (N0776): a north central cancer treatment group trial. *Clin Cancer Res.* 1 sept 2013;19(17):4816-23.
138. Hainsworth JD, Ervin T, Friedman E, Priego V, Murphy PB, Clark BL, et al. Concurrent radiotherapy and temozolomide followed by temozolomide and sorafenib in the first-line treatment of patients with glioblastoma multiforme. *Cancer.* 1 août 2010;116(15):3663-9.
139. Peng P, Wei W, Long C, Li J. Atorvastatin augments temozolomide's efficacy in glioblastoma via prenylation-dependent inhibition of Ras signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 29 2017;489(3):293-8.
140. Onishi M, Kurozumi K, Ichikawa T, Date I. Mechanisms of tumor development and anti-angiogenic therapy in glioblastoma multiforme. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2013;53(11):755-63.
141. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol.* 20 oct 2007;25(30):4722-9.
142. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 1 oct 2009;27(28):4733-40.
143. Desjardins A, Reardon DA, Coan A, Marcello J, Herndon JE, Bailey L, et al. Bevacizumab and daily temozolomide for recurrent glioblastoma. *Cancer.* 1 mars 2012;118(5):1302-12.
144. Reardon DA, Desjardins A, Peters KB, Gururangan S, Sampson JH, McLendon RE, et al. Phase II study of carboplatin, irinotecan, and bevacizumab for bevacizumab naïve, recurrent glioblastoma. *J Neurooncol.* mars 2012;107(1):155-64.
145. Taal W, Oosterkamp HM, Walenkamp AME, Dubbink HJ, Beerepoot LV, Hanse MCJ, et al. Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial): a randomised controlled phase 2 trial. *The Lancet Oncology.* août 2014;15(9):943-53.
146. Dirven L, van den Bent MJ, Bottomley A, van der Meer N, van der Holt B, Vos MJ, et al. The impact of bevacizumab on health-related quality of life in patients treated for recurrent glioblastoma: results of the randomised controlled phase 2 BELOB trial. *Eur J Cancer.* juill 2015;51(10):1321-30.
147. Schnell O, Thorsteinsdottir J, Fleischmann DF, Lenski M, Abenhardt W, Giese A, et al. Re-irradiation strategies in combination with bevacizumab for recurrent malignant glioma. *J Neurooncol.* 2016;130(3):591-9.

148. van Linde ME, Verhoeff JJC, Richel DJ, van Furth WR, Reijneveld JC, Verheul HMW, et al. Bevacizumab in combination with radiotherapy and temozolomide for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Oncologist*. févr 2015;20(2):107-8.
149. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 20 févr 2014;370(8):709-22.
150. Ney DE, Carlson JA, Damek DM, Gaspar LE, Kavanagh BD, Kleinschmidt-DeMasters BK, et al. Phase II trial of hypofractionated intensity-modulated radiation therapy combined with temozolomide and bevacizumab for patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Neurooncol*. mars 2015;122(1):135-43.
151. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 20 févr 2014;370(8):699-708.
152. Herrlinger U, Schäfer N, Steinbach JP, Weyerbrock A, Hau P, Goldbrunner R, et al. Bevacizumab Plus Irinotecan Versus Temozolomide in Newly Diagnosed O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Nonmethylated Glioblastoma: The Randomized GLARIUS Trial. *J Clin Oncol*. 10 2016;34(14):1611-9.
153. Balana C, De Las Penas R, Sepúlveda JM, Gil-Gil MJ, Luque R, Gallego O, et al. Bevacizumab and temozolomide versus temozolomide alone as neoadjuvant treatment in unresected glioblastoma: the GENOM 009 randomized phase II trial. *J Neurooncol*. mai 2016;127(3):569-79.
154. Iwamoto FM, Lamborn KR, Robins HI, Mehta MP, Chang SM, Butowski NA, et al. Phase II trial of pazopanib (GW786034), an oral multi-targeted angiogenesis inhibitor, for adults with recurrent glioblastoma (North American Brain Tumor Consortium Study 06-02). *Neuro-oncology*. août 2010;12(8):855-61.
155. Muhic A, Poulsen HS, Sorensen M, Grunnet K, Lassen U. Phase II open-label study of nintedanib in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. janv 2013;111(2):205-12.
156. Batchelor TT, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Plotkin SR, Gerstner E, et al. Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*. 10 juin 2010;28(17):2817-23.
157. Brown N, McBain C, Nash S, Hopkins K, Sanghera P, Saran F, et al. Multi-Center Randomized Phase II Study Comparing Cediranib plus Gefitinib with Cediranib plus Placebo in Subjects with Recurrent/Progressive Glioblastoma. *PLoS ONE*. 2016;11(5):e0156369.
158. Schäfer N, Gielen GH, Kebir S, Wieland A, Till A, Mack F, et al. Phase I trial of dovitinib (TKI258) in recurrent glioblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. juill 2016;142(7):1581-9.
159. Thanasupawat T, Natarajan S, Rommel A, Glogowska A, Bergen H, Krcek J, et al. Dovitinib enhances temozolomide efficacy in glioblastoma cells. *Mol Oncol*. août 2017;11(8):1078-98.
160. Cloughesy T, Finocchiaro G, Belda-Iniesta C, Recht L, Brandes AA, Pineda E, et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Phase II Study of Onartuzumab Plus Bevacizumab Versus Placebo Plus Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: Efficacy, Safety, and Hepatocyte Growth Factor and O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Biomarker Analyses. *J Clin Oncol*. 20 janv 2017;35(3):343-51.
161. Wen PY, Schiff D, Cloughesy TF, Raizer JJ, Lattera J, Smitt M, et al. A phase II study evaluating the efficacy and safety of AMG 102 (rilotumumab) in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology*. avr 2011;13(4):437-46.
162. de Groot JF. High-Dose Antiangiogenic Therapy for Glioblastoma: Less May Be More? *Clinical Cancer Research*. 1 oct 2011;17(19):6109-11.
163. Lassen U, Chinot OL, McBain C, Mau-Sørensen M, Larsen VA, Barrie M, et al. Phase 1 dose-escalation study of the antiplacental growth factor monoclonal antibody RO5323441 combined with bevacizumab in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology*. juill 2015;17(7):1007-15.

164. Gordon MS, Robert F, Matei D, Mendelson DS, Goldman JW, Chiorean EG, et al. An open-label phase Ib dose-escalation study of TRC105 (anti-endoglin antibody) with bevacizumab in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 1 déc 2014;20(23):5918-26.
165. Stupp R, Hegi ME, Neyns B, Goldbrunner R, Schlegel U, Clement PMJ, et al. Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol.* 1 juin 2010;28(16):2712-8.
166. Nabors LB, Mikkelsen T, Hegi ME, Ye X, Batchelor T, Lesser G, et al. A safety run-in and randomized phase 2 study of cilengitide combined with chemoradiation for newly diagnosed glioblastoma (NABTT 0306). *Cancer.* 15 nov 2012;118(22):5601-7.
167. Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong Y-K, et al. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* sept 2014;15(10):1100-8.
168. Nabors LB, Fink KL, Mikkelsen T, Grujicic D, Tarnawski R, Nam DH, et al. Two cilengitide regimens in combination with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma and unmethylated MGMT gene promoter: results of the open-label, controlled, randomized phase II CORE study. *Neuro-oncology.* mai 2015;17(5):708-17.
169. Arko L, Katsyv I, Park GE, Luan WP, Park JK. Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. *Pharmacol Ther.* oct 2010;128(1):1-36.
170. Stieber D, Golebiewska A, Evers L, Lenkiewicz E, Brons NHC, Nicot N, et al. Glioblastomas are composed of genetically divergent clones with distinct tumourigenic potential and variable stem cell-associated phenotypes. *Acta Neuropathol.* févr 2014;127(2):203-19.
171. Aum DJ, Kim DH, Beaumont TL, Leuthardt EC, Dunn GP, Kim AH. Molecular and cellular heterogeneity: the hallmark of glioblastoma. *Neurosurg Focus.* déc 2014;37(6):E11.
172. Bonavia R, Inda M-M, Cavenee WK, Furnari FB. Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network. *Cancer Res.* 15 juin 2011;71(12):4055-60.
173. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* mars 2006;9(3):157-73.
174. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 19 janv 2010;17(1):98-110.
175. Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell.* juill 2017;32(1):42-56.e6.
176. Gabrusiewicz K, Rodriguez B, Wei J, Hashimoto Y, Healy LM, Maiti SN, et al. Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype. *JCI Insight.* 2016;1(2).
177. Ozawa T, Riester M, Cheng Y-K, Huse JT, Squatrito M, Helmy K, et al. Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. *Cancer Cell.* 11 août 2014;26(2):288-300.
178. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 15 févr 2013;19(4):764-72.
179. Ranjit M, Motomura K, Ohka F, Wakabayashi T, Natsume A. Applicable advances in the molecular pathology of glioblastoma. *Brain Tumor Pathol.* juill 2015;32(3):153-62.
180. Qazi MA, Vora P, Venugopal C, Sidhu SS, Moffat J, Swanton C, et al. Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Ann Oncol.* 1 juill 2017;28(7):1448-56.

181. Abou-El-Ardat K, Seifert M, Becker K, Eisenreich S, Lehmann M, Hackmann K, et al. Comprehensive molecular characterization of multifocal glioblastoma proves its monoclonal origin and reveals novel insights into clonal evolution and heterogeneity of glioblastomas. *Neuro-oncology*. 01 2017;19(4):546-57.
182. Aubry M, de Tayrac M, Etcheverry A, Clavreul A, Saikali S, Menei P, et al. From the core to beyond the margin: a genomic picture of glioblastoma intratumor heterogeneity. *Oncotarget*. 20 mai 2015;6(14):12094-109.
183. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 5 mars 2013;110(10):4009-14.
184. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 20 juin 2014;344(6190):1396-401.
185. Lemée J-M, Clavreul A, Menei P. Intratumoral heterogeneity in glioblastoma: don't forget the peritumoral brain zone. *Neuro-oncology*. oct 2015;17(10):1322-32.
186. Roos A, Ding Z, Loftus JC, Tran NL. Molecular and Microenvironmental Determinants of Glioma Stem-Like Cell Survival and Invasion. *Front Oncol*. 2017;7:120.
187. Piccirillo SGM, Dietz S, Madhu B, Griffiths J, Price SJ, Collins VP, et al. Fluorescence-guided surgical sampling of glioblastoma identifies phenotypically distinct tumour-initiating cell populations in the tumour mass and margin. *Br J Cancer*. 24 juill 2012;107(3):462-8.
188. Gill BJ, Pisapia DJ, Malone HR, Goldstein H, Lei L, Sonabend A, et al. MRI-localized biopsies reveal subtype-specific differences in molecular and cellular composition at the margins of glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 26 août 2014;111(34):12550-5.
189. Ellis HP, Greenslade M, Powell B, Spiteri I, Sottoriva A, Kurian KM. Current Challenges in Glioblastoma: Intratumour Heterogeneity, Residual Disease, and Models to Predict Disease Recurrence. *Front Oncol*. 2015;5:251.
190. Piccirillo SG, Spiteri I, Sottoriva A, Touloumis A, Ber S, Price SJ, et al. Contributions to drug resistance in glioblastoma derived from malignant cells in the sub-ependymal zone. *Cancer Res*. 1 janv 2015;75(1):194-202.
191. Nickel GC, Barnholtz-Sloan J, Gould MP, McMahon S, Cohen A, Adams MD, et al. Characterizing mutational heterogeneity in a glioblastoma patient with double recurrence. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e35262.
192. Kim J, Lee I-H, Cho HJ, Park C-K, Jung Y-S, Kim Y, et al. Spatiotemporal Evolution of the Primary Glioblastoma Genome. *Cancer Cell*. 14 sept 2015;28(3):318-28.
193. Lee J-K, Wang J, Sa JK, Ladewig E, Lee H-O, Lee I-H, et al. Spatiotemporal genomic architecture informs precision oncology in glioblastoma. *Nat Genet*. avr 2017;49(4):594-9.
194. Wang J, Cazzato E, Ladewig E, Frattini V, Rosenbloom DIS, Zairis S, et al. Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nat Genet*. 2016;48(7):768-76.
195. Zhang RR, Pointer KB, Kuo JS, Dempsey RJ. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Neurosurgery*. déc 2014;75(6):N9-10.
196. Meyer M, Reimand J, Lan X, Head R, Zhu X, Kushida M, et al. Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 20 janv 2015;112(3):851-6.
197. Gerstung M, Eriksson N, Lin J, Vogelstein B, Beerwinkler N. The Temporal Order of Genetic and Pathway Alterations in Tumorigenesis. *Toland AE, éditeur. PLoS ONE*. 1 nov 2011;6(11):e27136.
198. Inda M-D-M, Bonavia R, Seoane J. Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature. *Cancers (Basel)*. 27 janv 2014;6(1):226-39.
199. Kim H, Zheng S, Amini SS, Virk SM, Mikkelsen T, Brat DJ, et al. Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. *Genome Res*. mars 2015;25(3):316-27.

200. Parker NR, Khong P, Parkinson JF, Howell VM, Wheeler HR. Molecular Heterogeneity in Glioblastoma: Potential Clinical Implications. *Frontiers in Oncology* [Internet]. 3 mars 2015 [cité 17 août 2018];5. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2015.00055/abstract>
201. Sin WC, Aftab Q, Bechberger JF, Leung JH, Chen H, Naus CC. Astrocytes promote glioma invasion via the gap junction protein connexin43. *Oncogene*. 24 mars 2016;35(12):1504-16.
202. Bhat KPL, Balasubramaniyan V, Vaillant B, Ezhilarasan R, Hummelink K, Hollingsworth F, et al. Mesenchymal differentiation mediated by NF- κ B promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell*. 9 sept 2013;24(3):331-46.
203. Brown DV, Filiz G, Daniel PM, Hollande F, Dworkin S, Amiridis S, et al. Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intra-tumor heterogeneity. *PLoS ONE*. 2017;12(2):e0172791.
204. Little SE, Popov S, Jury A, Bax DA, Doey L, Al-Sarraj S, et al. Receptor tyrosine kinase genes amplified in glioblastoma exhibit a mutual exclusivity in variable proportions reflective of individual tumor heterogeneity. *Cancer Res*. 1 avr 2012;72(7):1614-20.
205. Nishikawa R, Sugiyama T, Narita Y, Furnari F, Cavenee WK, Matsutani M. Immunohistochemical analysis of the mutant epidermal growth factor, deltaEGFR, in glioblastoma. *Brain Tumor Pathol*. 2004;21(2):53-6.
206. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol*. 1 sept 2008;26(25):4189-99.
207. Szerlip NJ, Pedraza A, Chakravarty D, Azim M, McGuire J, Fang Y, et al. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 21 févr 2012;109(8):3041-6.
208. Scribner E, Saut O, Province P, Bag A, Colin T, Fathallah-Shaykh HM. Effects of anti-angiogenesis on glioblastoma growth and migration: model to clinical predictions. *PLoS ONE*. 2014;9(12):e115018.
209. Reinartz R, Wang S, Kebir S, Silver DJ, Wieland A, Zheng T, et al. Functional Subclone Profiling for Prediction of Treatment-Induced Intratumor Population Shifts and Discovery of Rational Drug Combinations in Human Glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 15 janv 2017;23(2):562-74.
210. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 19 févr 2014;6(224):224ra24.
211. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. déc 2008;10(12):1470-6.
212. Macarthur KM, Kao GD, Chandrasekaran S, Alonso-Basanta M, Chapman C, Lustig RA, et al. Detection of brain tumor cells in the peripheral blood by a telomerase promoter-based assay. *Cancer Res*. 15 avr 2014;74(8):2152-9.
213. Cruceru ML, Neagu M, Demoulin J-B, Constantinescu SN. Therapy targets in glioblastoma and cancer stem cells: lessons from haematopoietic neoplasms. *J Cell Mol Med*. oct 2013;17(10):1218-35.
214. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*. sept 2002;39(3):193-206.
215. Morokoff A, Ng W, Gogos A, Kaye AH. Molecular subtypes, stem cells and heterogeneity: Implications for personalised therapy in glioma. *J Clin Neurosci*. août 2015;22(8):1219-26.
216. Thon N, Damianoff K, Hegermann J, Grau S, Krebs B, Schnell O, et al. Presence of pluripotent CD133+ cells correlates with malignancy of gliomas. *Mol Cell Neurosci*. janv 2010;43(1):51-9.
217. Raysi Dehcordi S, Ricci A, Di Vitantonio H, De Paulis D, Luzzi S, Palumbo P, et al. Stemness Marker Detection in the Periphery of Glioblastoma and Ability of Glioblastoma to Generate Glioma Stem Cells: Clinical Correlations. *World Neurosurg*. sept 2017;105:895-905.

218. Koso H, Takeda H, Yew CCK, Ward JM, Nariai N, Ueno K, et al. Transposon mutagenesis identifies genes that transform neural stem cells into glioma-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 30 oct 2012;109(44):E2998-3007.
219. Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon C-H, Jackson EL, Li Y, Burns DK, et al. Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell*. 6 janv 2009;15(1):45-56.
220. Fidoamore A, Cristiano L, Antonosante A, d'Angelo M, Di Giacomo E, Astarita C, et al. Glioblastoma Stem Cells Microenvironment: The Paracrine Roles of the Niche in Drug and Radioresistance. *Stem Cells Int*. 2016;2016:6809105.
221. Sandberg CJ, Altschuler G, Jeong J, Strømme KK, Stangeland B, Murrell W, et al. Comparison of glioma stem cells to neural stem cells from the adult human brain identifies dysregulated Wnt- signaling and a fingerprint associated with clinical outcome. *Exp Cell Res*. 15 août 2013;319(14):2230-43.
222. Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res*. 15 juill 2007;13(14):4042-5.
223. Ju B, Chen W, Spitsbergen JM, Lu J, Vogel P, Peters JL, et al. Activation of Sonic hedgehog signaling in neural progenitor cells promotes glioma development in the zebrafish optic pathway. *Oncogenesis*. 31 mars 2014;3:e96.
224. Mao X, Hütt-Cabezas M, Orr BA, Weingart M, Taylor I, Rajan AKD, et al. LIN28A facilitates the transformation of human neural stem cells and promotes glioblastoma tumorigenesis through a pro-invasive genetic program. *Oncotarget*. juill 2013;4(7):1050-64.
225. Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL, Sharpless NE, Chan SS, You MJ, et al. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell*. avr 2002;1(3):269-77.
226. Sancho-Martinez I, Nivet E, Xia Y, Hishida T, Aguirre A, Ocampo A, et al. Establishment of human iPSC-based models for the study and targeting of glioma initiating cells. *Nat Commun*. 22 févr 2016;7:10743.
227. Wang P, Wan W-W, Xiong S-L, Feng H, Wu N. Cancer stem-like cells can be induced through dedifferentiation under hypoxic conditions in glioma, hepatoma and lung cancer. *Cell Death Discov*. 2017;3:16105.
228. Schmid RS, Simon JM, Vitucci M, McNeill RS, Bash RE, Werneke AM, et al. Core pathway mutations induce dedifferentiation of murine astrocytes into glioblastoma stem cells that are sensitive to radiation but resistant to temozolomide. *Neuro-oncology*. 2016;18(7):962-73.
229. Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, et al. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science*. 23 nov 2012;338(6110):1080-4.
230. Li P, Zhou C, Xu L, Xiao H. Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an in vitro study. *Int J Med Sci*. 2013;10(4):399-407.
231. Iwadata Y. Plasticity in Glioma Stem Cell Phenotype and Its Therapeutic Implication. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 15 févr 2018;58(2):61-70.
232. Dahan P, Martinez Gala J, Delmas C, Monferran S, Malric L, Zentkowski D, et al. Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death & Disease*. nov 2014;5(11):e1543-e1543.
233. Kawamura Y, Takouda J, Yoshimoto K, Nakashima K. New aspects of glioblastoma multiforme revealed by similarities between neural and glioblastoma stem cells. *Cell Biol Toxicol*. 31 janv 2018;
234. Pierfelice TJ, Schreck KC, Eberhart CG, Gaiano N. Notch, Neural Stem Cells, and Brain Tumors. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1 janv 2008;73(0):367-75.
235. Yu J-B, Jiang H, Zhan R-Y. Aberrant Notch signaling in glioblastoma stem cells contributes to tumor recurrence and invasion. *Mol Med Rep*. août 2016;14(2):1263-8.
236. Bayin NS, Frenster JD, Sen R, Si S, Modrek AS, Galifianakis N, et al. Notch signaling regulates metabolic heterogeneity in glioblastoma stem cells. *Oncotarget* [Internet]. 12 sept 2017 [cité 19 août 2018];8(39). Disponible sur: <http://www.oncotarget.com/fulltext/18117>

237. Kopan R. Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci.* 15 mars 2002;115(Pt 6):1095-7.
238. Yahyanejad S, King H, Iglesias VS, Granton PV, Barbeau LMO, van Hoof SJ, et al. NOTCH blockade combined with radiation therapy and temozolomide prolongs survival of orthotopic glioblastoma. *Oncotarget.* 5 juill 2016;7(27):41251-64.
239. Li J-L, Sainson RCA, Oon CE, Turley H, Leek R, Sheldon H, et al. DLL4-Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy in vivo. *Cancer Res.* 15 sept 2011;71(18):6073-83.
240. Staberg M, Michaelsen SR, Olsen LS, Nedergaard MK, Villingshøj M, Stockhausen M-T, et al. Combined EGFR- and notch inhibition display additive inhibitory effect on glioblastoma cell viability and glioblastoma-induced endothelial cell sprouting in vitro. *Cancer Cell International [Internet].* déc 2016 [cité 19 août 2018];16(1). Disponible sur: <http://cancer.cbiomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-016-0309-2>
241. Purow BW, Sundaresan TK, Burdick MJ, Kefas BA, Comeau LD, Hawkinson MP, et al. Notch-1 regulates transcription of the epidermal growth factor receptor through p53. *Carcinogenesis.* mai 2008;29(5):918-25.
242. Saito N, Aoki K, Hirai N, Fujita S, Iwama J, Hiramoto Y, et al. Effect of Notch expression in glioma stem cells on therapeutic response to chemo-radiotherapy in recurrent glioblastoma. *Brain Tumor Pathol.* juill 2015;32(3):176-83.
243. Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci.* janv 2003;6(1):21-7.
244. Yan G-N, Yang L, Lv Y-F, Shi Y, Shen L-L, Yao X-H, et al. Endothelial cells promote stem-like phenotype of glioma cells through activating the Hedgehog pathway. *J Pathol.* sept 2014;234(1):11-22.
245. Auffinger B, Spencer D, Pytel P, Ahmed AU, Lesniak MS. The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. *Expert Rev Neurother.* 2015;15(7):741-52.
246. Tu Y, Niu M, Xie P, Yue C, Liu N, Qi Z, et al. Smoothed is a poor prognosis factor and a potential therapeutic target in glioma. *Sci Rep.* 14 févr 2017;7:42630.
247. Shahi MH, Farheen S, Mariyath MPM, Castresana JS. Potential role of Shh-Gli1-BMI1 signaling pathway nexus in glioma chemoresistance. *Tumour Biol.* nov 2016;37(11):15107-14.
248. Li J, Cai J, Zhao S, Yao K, Sun Y, Li Y, et al. GANT61, a GLI inhibitor, sensitizes glioma cells to the temozolomide treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 28 2016;35(1):184.
249. Nusse R. Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res.* mai 2008;18(5):523-7.
250. Piccin D, Morshead CM. Wnt signaling regulates symmetry of division of neural stem cells in the adult brain and in response to injury. *Stem Cells.* mars 2011;29(3):528-38.
251. Lee Y, Lee J-K, Ahn SH, Lee J, Nam D-H. WNT signaling in glioblastoma and therapeutic opportunities. *Lab Invest.* févr 2016;96(2):137-50.
252. McCord M, Mukoyama Y-S, Gilbert MR, Jackson S. Targeting WNT Signaling for Multifaceted Glioblastoma Therapy. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:318.
253. Yu C-Y, Liang G-B, Du P, Liu Y-H. Lgr4 promotes glioma cell proliferation through activation of Wnt signaling. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(8):4907-11.
254. Zuccarini M, Giuliani P, Ziberi S, Carluccio M, Iorio PD, Caciagli F, et al. The Role of Wnt Signal in Glioblastoma Development and Progression: A Possible New Pharmacological Target for the Therapy of This Tumor. *Genes (Basel).* 17 févr 2018;9(2).
255. Wu M, Guan J, Li C, Gunter S, Nusrat L, Ng S, et al. Aberrantly activated Cox-2 and Wnt signaling interact to maintain cancer stem cells in glioblastoma. *Oncotarget.* 10 oct 2017;8(47):82217-30.
256. Hu B, Emdad L, Kegelman TP, Shen X-N, Das SK, Sarkar D, et al. Astrocyte Elevated Gene-1 Regulates β -Catenin Signaling to Maintain Glioma Stem-like Stemness and Self-Renewal. *Mol Cancer Res.* 2017;15(2):225-33.
257. Kaur N, Chettiar S, Rathod S, Rath P, Muzumdar D, Shaikh ML, et al. Wnt3a mediated activation of Wnt/ β -catenin signaling promotes tumor progression in glioblastoma. *Mol Cell Neurosci.* mai 2013;54:44-57.

258. Stopschinski BE, Beier CP, Beier D. Glioblastoma cancer stem cells--from concept to clinical application. *Cancer Lett.* 10 sept 2013;338(1):32-40.
259. Caja L, Tzavlaki K, Dadras MS, Tan E-J, Hatem G, Maturi NP, et al. Snail regulates BMP and TGF β pathways to control the differentiation status of glioma-initiating cells. *Oncogene.* mai 2018;37(19):2515-31.
260. Audia A, Conroy S, Glass R, Bhat KPL. The Impact of the Tumor Microenvironment on the Properties of Glioma Stem-Like Cells. *Front Oncol.* 2017;7:143.
261. Yi Y, Hsieh I-Y, Huang X, Li J, Zhao W. Glioblastoma Stem-Like Cells: Characteristics, Microenvironment, and Therapy. *Frontiers in Pharmacology* [Internet]. 7 déc 2016 [cité 27 juin 2018];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2016.00477/full>
262. Lathia JD, Gallagher J, Myers JT, Li M, Vasanji A, McLendon RE, et al. Direct In Vivo Evidence for Tumor Propagation by Glioblastoma Cancer Stem Cells. Ulasov I, éditeur. *PLoS ONE.* 22 sept 2011;6(9):e24807.
263. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 15 sept 2003;63(18):5821-8.
264. Ahmed AU, Auffinger B, Lesniak MS. Understanding glioma stem cells: rationale, clinical relevance and therapeutic strategies. *Expert Rev Neurother.* mai 2013;13(5):545-55.
265. Wee B, Pietras A, Ozawa T, Bazzoli E, Podlaha O, Antczak C, et al. ABCG2 regulates self-renewal and stem cell marker expression but not tumorigenicity or radiation resistance of glioma cells. *Sci Rep.* 26 2016;6:25956.
266. Bien-Möller S, Balz E, Herzog S, Plantera L, Vogelgesang S, Weitmann K, et al. Association of Glioblastoma Multiforme Stem Cell Characteristics, Differentiation, and Microglia Marker Genes with Patient Survival. *Stem Cells International.* 2018;2018:1-19.
267. Sørensen MD, Fosmark S, Hellwege S, Beier D, Kristensen BW, Beier CP. Chemoresistance and chemotherapy targeting stem-like cells in malignant glioma. *Adv Exp Med Biol.* 2015;853:111-38.
268. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell.* janv 2007;11(1):69-82.
269. Zhu TS, Costello MA, Talsma CE, Flack CG, Crowley JG, Hamm LL, et al. Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells. *Cancer Res.* 15 sept 2011;71(18):6061-72.
270. Würth R, Bajetto A, Harrison JK, Barbieri F, Florio T. CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:144.
271. Rabenstein M, Hucklenbroich J, Willuweit A, Ladwig A, Fink GR, Schroeter M, et al. Osteopontin mediates survival, proliferation and migration of neural stem cells through the chemokine receptor CXCR4. *Stem Cell Res Ther.* 22 mai 2015;6:99.
272. Lathia JD, Gallagher J, Heddleston JM, Wang J, Eyler CE, Macswords J, et al. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell.* 7 mai 2010;6(5):421-32.
273. Codrici E, Enciu A-M, Popescu I-D, Mihai S, Tanase C. Glioma Stem Cells and Their Microenvironments: Providers of Challenging Therapeutic Targets. *Stem Cells International.* 2016;2016:1-20.
274. Becher OJ, Hambardzumyan D, Fomchenko EI, Momota H, Mainwaring L, Bleau A-M, et al. Gli activity correlates with tumor grade in platelet-derived growth factor-induced gliomas. *Cancer Res.* 1 avr 2008;68(7):2241-9.
275. Charles N, Ozawa T, Squatrito M, Bleau A-M, Brennan CW, Hambardzumyan D, et al. Perivascular nitric oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells. *Cell Stem Cell.* 5 févr 2010;6(2):141-52.
276. Thirant C, Galan-Moya E-M, Dubois LG, Pinte S, Chafey P, Broussard C, et al. Differential proteomic analysis of human glioblastoma and neural stem cells reveals HDGF as a novel angiogenic secreted factor. *Stem Cells.* mai 2012;30(5):845-53.

277. Hira VVV, Ploegmakers KJ, Grevers F, Verbovšek U, Silvestre-Roig C, Aronica E, et al. CD133+ and Nestin+ Glioma Stem-Like Cells Reside Around CD31+ Arterioles in Niches that Express SDF-1 α , CXCR4, Osteopontin and Cathepsin K. *J Histochem Cytochem*. 2015;63(7):481-93.
278. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*. 9 déc 2010;468(7325):829-33.
279. El Hallani S, Colin C, El Houfi Y, Idbaih A, Boisselier B, Marie Y, et al. Tumor and endothelial cell hybrids participate in glioblastoma vasculature. *Biomed Res Int*. 2014;2014:827327.
280. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncology*. 1 oct 2005;7(4):452-64.
281. Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, et al. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*. 28 mars 2013;153(1):139-52.
282. Svensson A, Özen I, Genové G, Paul G, Bengzon J. Endogenous Brain Pericytes Are Widely Activated and Contribute to Mouse Glioma Microvasculature. *Castro MG, éditeur. PLOS ONE*. 13 avr 2015;10(4):e0123553.
283. Yi D, Xiang W, Zhang Q, Cen Y, Su Q, Zhang F, et al. Human Glioblastoma-Derived Mesenchymal Stem Cell to Pericytes Transition and Angiogenic Capacity in Glioblastoma Microenvironment. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(1):279-90.
284. Zhao Y, Chen J, Dai X, Cai H, Ji X, Sheng Y, et al. Human glioma stem-like cells induce malignant transformation of bone marrow mesenchymal stem cells by activating TERT expression. *Oncotarget*. 28 nov 2017;8(61):104418-29.
285. Silver DJ, Lathia JD. Revealing the glioma cancer stem cell interactome, one niche at a time. *J Pathol*. mars 2018;244(3):260-4.
286. Brooks LJ, Parrinello S. Vascular regulation of glioma stem-like cells: a balancing act. *Curr Opin Neurobiol*. déc 2017;47:8-15.
287. Piccirillo SGM, Combi R, Cajola L, Patrizi A, Redaelli S, Bentivegna A, et al. Distinct pools of cancer stem-like cells coexist within human glioblastomas and display different tumorigenicity and independent genomic evolution. *Oncogene*. 16 avr 2009;28(15):1807-11.
288. Rubenstein JL, Kim J, Ozawa T, Zhang M, Westphal M, Deen DF, et al. Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. *Neoplasia*. août 2000;2(4):306-14.
289. Keunen O, Johansson M, Oudin A, Sanzey M, Rahim SAA, Fack F, et al. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1 mars 2011;108(9):3749-54.
290. Ahmed EM, Bandopadhyay G, Coyle B, Grabowska A. A HIF-independent, CD133-mediated mechanism of cisplatin resistance in glioblastoma cells. *Cell Oncol (Dordr)*. juin 2018;41(3):319-28.
291. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*. 5 mars 1999;274(10):6519-25.
292. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*. 4 févr 2010;29(5):625-34.
293. Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-oncology*. avr 2005;7(2):134-53.
294. Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle*. 15 oct 2009;8(20):3274-84.
295. Thomas TM, Yu JS. Metabolic regulation of glioma stem-like cells in the tumor micro-environment. *Cancer Lett*. 01 2017;408:174-81.
296. Liu Q, Cao P. Clinical and prognostic significance of HIF-1 α in glioma patients: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(12):22073-83.

297. Qiang L, Wu T, Zhang H-W, Lu N, Hu R, Wang Y-J, et al. HIF-1 α is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway. *Cell Death Differ.* févr 2012;19(2):284-94.
298. Pistollato F, Abbadi S, Rampazzo E, Persano L, Della Puppa A, Frasson C, et al. Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem Cells.* mai 2010;28(5):851-62.
299. Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD, et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 α . *Oncogene.* 12 nov 2009;28(45):3949-59.
300. Wang P, Lan C, Xiong S, Zhao X, Shan Y, Hu R, et al. HIF1 α regulates single differentiated glioma cell dedifferentiation to stem-like cell phenotypes with high tumorigenic potential under hypoxia. *Oncotarget.* 25 avr 2017;8(17):28074-92.
301. Lu X, Kang Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis. *Clin Cancer Res.* 15 déc 2010;16(24):5928-35.
302. Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schänzer A, Meletis K, et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain.* avr 2010;133(Pt 4):983-95.
303. Bhagat M, Palanichamy JK, Ramalingam P, Mudassir M, Irshad K, Chosdol K, et al. HIF-2 α mediates a marked increase in migration and stemness characteristics in a subset of glioma cells under hypoxia by activating an Oct-4/Sox-2-Mena (INV) axis. *Int J Biochem Cell Biol.* mai 2016;74:60-71.
304. Covelto KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu C-J, et al. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* 1 mars 2006;20(5):557-70.
305. Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell.* 2 juin 2009;15(6):501-13.
306. Richardson PJ. CXCR4 and Glioblastoma. *Anticancer Agents Med Chem.* 2016;16(1):59-74.
307. Wang S-C, Hong J-H, Hsueh C, Chiang C-S. Tumor-secreted SDF-1 promotes glioma invasiveness and TAM tropism toward hypoxia in a murine astrocytoma model. *Lab Invest.* janv 2012;92(1):151-62.
308. Wu A, Wei J, Kong L-Y, Wang Y, Priebe W, Qiao W, et al. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro-oncology.* nov 2010;12(11):1113-25.
309. Wei J, Barr J, Kong L-Y, Wang Y, Wu A, Sharma AK, et al. Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T-cell proliferation and effector responses by the signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Mol Cancer Ther.* janv 2010;9(1):67-78.
310. Otvos B, Silver DJ, Mulkearns-Hubert EE, Alvarado AG, Turaga SM, Sorensen MD, et al. Cancer Stem Cell-Secreted Macrophage Migration Inhibitory Factor Stimulates Myeloid Derived Suppressor Cell Function and Facilitates Glioblastoma Immune Evasion. *Stem Cells.* 2016;34(8):2026-39.
311. Alvarado AG, Thiagarajan PS, Mulkearns-Hubert EE, Silver DJ, Hale JS, Alban TJ, et al. Glioblastoma Cancer Stem Cells Evade Innate Immune Suppression of Self-Renewal through Reduced TLR4 Expression. *Cell Stem Cell.* 06 2017;20(4):450-461.e4.
312. Brescia P, Ortensi B, Fornasari L, Levi D, Broggi G, Pelicci G. CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance. *Stem Cells.* mai 2013;31(5):857-69.
313. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene.* 20 sept 2004;23(43):7267-73.
314. Barrantes-Freer A, Renovanz M, Eich M, Braukmann A, Sprang B, Spirin P, et al. CD133 Expression Is Not Synonymous to Immunoreactivity for AC133 and Fluctuates throughout the Cell Cycle in Glioma Stem-Like Cells. Harrison JK, éditeur. *PLOS ONE.* 18 juin 2015;10(6):e0130519.
315. Gambelli F, Sasdelli F, Manini I, Gambarana C, Oliveri G, Miracco C, et al. Identification of cancer stem cells from human glioblastomas: growth and differentiation capabilities and CD133/prominin-1 expression. *Cell Biol Int.* janv 2012;36(1):29-38.

316. Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, et al. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell*. 13 avr 2010;17(4):362-75.
317. Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*. 1 mai 2007;67(9):4010-5.
318. Lottaz C, Beier D, Meyer K, Kumar P, Hermann A, Schwarz J, et al. Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer Res*. 1 mars 2010;70(5):2030-40.
319. Yang T, Rycaj K. Targeted therapy against cancer stem cells. *Oncol Lett*. juill 2015;10(1):27-33.
320. Mao P, Joshi K, Li J, Kim S-H, Li P, Santana-Santos L, et al. Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc Natl Acad Sci USA*. 21 mai 2013;110(21):8644-9.
321. Brown DV, Daniel PM, D'Abaco GM, Gogos A, Ng W, Morokoff AP, et al. Coexpression analysis of CD133 and CD44 identifies proneural and mesenchymal subtypes of glioblastoma multiforme. *Oncotarget*. 20 mars 2015;6(8):6267-80.
322. Chandran UR, Luthra S, Santana-Santos L, Mao P, Kim S-H, Minata M, et al. Gene expression profiling distinguishes proneural glioma stem cells from mesenchymal glioma stem cells. *Genom Data*. 1 sept 2015;5:333-6.
323. Guadagno E, Vitiello M, Francesca P, Cali G, Caponnetto F, Cesselli D, et al. PATZ1 is a new prognostic marker of glioblastoma associated with the stem-like phenotype and enriched in the proneural subtype. *Oncotarget*. 29 août 2017;8(35):59282-300.
324. Sullivan KE, Rojas K, Cerione RA, Nakano I, Wilson KF. The stem cell/cancer stem cell marker ALDH1A3 regulates the expression of the survival factor tissue transglutaminase, in mesenchymal glioma stem cells. *Oncotarget*. 4 avr 2017;8(14):22325-43.
325. Marziali G, Signore M, Buccarelli M, Grande S, Palma A, Biffoni M, et al. Metabolic/Proteomic Signature Defines Two Glioblastoma Subtypes With Different Clinical Outcome. *Sci Rep*. 9 févr 2016;6:21557.
326. Pietras A, Katz AM, Ekström EJ, Wee B, Halliday JJ, Pitter KL, et al. Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell*. 6 mars 2014;14(3):357-69.
327. Shiraki Y, Mii S, Enomoto A, Momota H, Han Y-P, Kato T, et al. Significance of perivascular tumour cells defined by CD109 expression in progression of glioma. *J Pathol*. déc 2017;243(4):468-80.
328. Klank RL, Decker Grunke SA, Bangasser BL, Forster CL, Price MA, Odde TJ, et al. Biphasic Dependence of Glioma Survival and Cell Migration on CD44 Expression Level. *Cell Rep*. 03 2017;18(1):23-31.
329. Singh SK, Fiorelli R, Kupp R, Rajan S, Szeto E, Lo Cascio C, et al. Post-translational Modifications of OLIG2 Regulate Glioma Invasion through the TGF- β Pathway. *Cell Rep*. 26 2016;16(4):950-66.
330. Xing F, Luan Y, Cai J, Wu S, Mai J, Gu J, et al. The Anti-Warburg Effect Elicited by the cAMP-PGC1 α Pathway Drives Differentiation of Glioblastoma Cells into Astrocytes. *Cell Rep*. 10 2017;18(2):468-81.
331. Fidoamore A, Cristiano L, Laezza C, Galzio R, Benedetti E, Cinque B, et al. Energy metabolism in glioblastoma stem cells: PPAR α a metabolic adaptor to intratumoral microenvironment. *Oncotarget*. 12 déc 2017;8(65):108430-50.
332. Flavahan WA, Wu Q, Hitomi M, Rahim N, Kim Y, Sloan AE, et al. Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake. *Nature Neuroscience*. oct 2013;16(10):1373-82.
333. Chen J, Li Y, Yu T-S, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*. août 2012;488(7412):522-6.
334. Staberg M, Rasmussen RD, Michaelsen SR, Pedersen H, Jensen KE, Villingshøj M, et al. Targeting glioma stem-like cell survival and chemoresistance through inhibition of lysine-specific histone demethylase KDM2B. *Mol Oncol*. mars 2018;12(3):406-20.

335. Meng E, Hanna A, Samant RS, Shevde LA. The Impact of Hedgehog Signaling Pathway on DNA Repair Mechanisms in Human Cancer. *Cancers (Basel)*. 21 juill 2015;7(3):1333-48.
336. Xu Z-Y, Wang K, Li X-Q, Chen S, Deng J-M, Cheng Y, et al. The ABCG2 transporter is a key molecular determinant of the efficacy of sonodynamic therapy with Photofrin in glioma stem-like cells. *Ultrasonics*. janv 2013;53(1):232-8.
337. Liu Y, Guo Q, Zhang H, Li G-H, Feng S, Yu X-Z, et al. Effect of siRNA-Livin on drug resistance to chemotherapy in glioma U251 cells and CD133+ stem cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. oct 2015;10(4):1317-23.
338. Jin F, Zhao L, Guo Y-J, Zhao W-J, Zhang H, Wang H-T, et al. Influence of Etoposide on anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes in CD133 positive U251 glioblastoma stem-like cells. *Brain Res*. 8 juin 2010;1336:103-11.
339. Gong W, Wang Z, Wan Y, Shi L, Zhou Y. Downregulation of ABCG2 protein inhibits migration and invasion in U251 glioma stem cells. *Neuroreport*. 28 mai 2014;25(8):625-32.
340. Chen W, Dong J, Haiech J, Kilhoffer M-C, Zeniou M. Cancer Stem Cell Quiescence and Plasticity as Major Challenges in Cancer Therapy. *Stem Cells International*. 2016;2016:1-16.
341. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, et al. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res*. 1 janv 2008;14(1):123-9.
342. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 7 déc 2006;444(7120):756-60.
343. Liu J, Liu Y, Xie T, Luo L, Xu C, Gao Q, et al. Radiation-induced G2/M arrest rarely occurred in glioblastoma stem-like cells. *Int J Radiat Biol*. avr 2018;94(4):394-402.
344. Bo S, Hui H, Li W, Hui L, Hong X, Lin D, et al. Chk1, but not Chk2, is responsible for G2/M phase arrest induced by diallyl disulfide in human gastric cancer BGC823 cells. *Food Chem Toxicol*. juin 2014;68:61-70.
345. Yahyanejad S, Theys J, Vooijs M. Targeting Notch to overcome radiation resistance. *Oncotarget*. 16 févr 2016;7(7):7610-28.
346. Auffinger B, Tobias AL, Han Y, Lee G, Guo D, Dey M, et al. Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death Differ*. juill 2014;21(7):1119-31.
347. Lee G, Auffinger B, Guo D, Hasan T, Deheeger M, Tobias AL, et al. Dedifferentiation of Glioma Cells to Glioma Stem-like Cells By Therapeutic Stress-induced HIF Signaling in the Recurrent GBM Model. *Mol Cancer Ther*. 2016;15(12):3064-76.
348. Adamski V, Hempelmann A, Flüh C, Lucius R, Synowitz M, Hattermann K, et al. Dormant glioblastoma cells acquire stem cell characteristics and are differentially affected by Temozolomide and AT101 treatment. *Oncotarget*. 8 déc 2017;8(64):108064-78.
349. Almog N. Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. *Cancer Lett*. 28 août 2010;294(2):139-46.
350. Kangwan N, Park J-M, Kim E-H, Hahm KB. Chemoquiescence for ideal cancer treatment and prevention: where are we now? *J Cancer Prev*. juin 2014;19(2):89-86.
351. Huang Q, Zhang Q-B, Dong J, Wu Y-Y, Shen Y-T, Zhao Y-D, et al. Glioma stem cells are more aggressive in recurrent tumors with malignant progression than in the primary tumor, and both can be maintained long-term in vitro. *BMC Cancer*. 22 oct 2008;8:304.
352. Bhuvanlakshmi G, Arfuso F, Millward M, Dharmarajan A, Warriar S. Secreted frizzled-related protein 4 inhibits glioma stem-like cells by reversing epithelial to mesenchymal transition, inducing apoptosis and decreasing cancer stem cell properties. *PLoS ONE*. 2015;10(6):e0127517.
353. Sareddy GR, Kesanakurti D, Kirti PB, Babu PP. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and celecoxib attenuates Wnt/ β -catenin/Tcf signaling pathway in human glioblastoma cells. *Neurochem Res*. nov 2013;38(11):2313-22.

354. Penas-Prado M, Hess KR, Fisch MJ, Lagrone LW, Groves MD, Levin VA, et al. Randomized phase II adjuvant factorial study of dose-dense temozolomide alone and in combination with isotretinoin, celecoxib, and/or thalidomide for glioblastoma. *Neuro-oncology*. févr 2015;17(2):266-73.
355. Korur S, Huber RM, Sivasankaran B, Petrich M, Morin P, Hemmings BA, et al. GSK3beta regulates differentiation and growth arrest in glioblastoma. *PLoS ONE*. 13 oct 2009;4(10):e7443.
356. Ramachandran I, Ganapathy V, Gillies E, Fonseca I, Sureban SM, Houchen CW, et al. Wnt inhibitory factor 1 suppresses cancer stemness and induces cellular senescence. *Cell Death Dis*. 22 mai 2014;5:e1246.
357. Adamo A, Fiore D, De Martino F, Roscigno G, Affinito A, Donnarumma E, et al. RYK promotes the stemness of glioblastoma cells via the WNT/ β -catenin pathway. *Oncotarget*. 21 févr 2017;8(8):13476-87.
358. Kanabur P, Guo S, Simonds GR, Kelly DF, Gourdie RG, Verbridge SS, et al. Patient-derived glioblastoma stem cells respond differentially to targeted therapies. *Oncotarget*. 27 déc 2016;7(52):86406-19.
359. Shih I-M, Wang T-L. Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer Res*. 1 mars 2007;67(5):1879-82.
360. Saito N, Fu J, Zheng S, Yao J, Wang S, Liu DD, et al. A High Notch Pathway Activation Predicts Response to γ Secretase Inhibitors in Proneural Subtype of Glioma Tumor-Initiating Cells: Targeting Proneural GBM with Notch Inhibition. *STEM CELLS*. janv 2014;32(1):301-12.
361. Hovinga KE, Shimizu F, Wang R, Panagiotakos G, Van Der Heijden M, Moayedpardazi H, et al. Inhibition of notch signaling in glioblastoma targets cancer stem cells via an endothelial cell intermediate. *Stem Cells*. juin 2010;28(6):1019-29.
362. Tanaka S, Nakada M, Yamada D, Nakano I, Todo T, Ino Y, et al. Strong therapeutic potential of γ -secretase inhibitor MRK003 for CD44-high and CD133-low glioblastoma initiating cells. *J Neurooncol*. janv 2015;121(2):239-50.
363. Opačak-Bernardi T, Ryu JS, Raucher D. Effects of cell penetrating Notch inhibitory peptide conjugated to elastin-like polypeptide on glioblastoma cells. *J Drug Target*. juill 2017;25(6):523-31.
364. Ma Y, Cheng Z, Liu J, Torre-Healy L, Lathia JD, Nakano I, et al. Inhibition of Farnesyltransferase Potentiates NOTCH-Targeted Therapy against Glioblastoma Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 12 2017;9(6):1948-60.
365. Pan E, Supko JG, Kaley TJ, Butowski NA, Cloughesy T, Jung J, et al. Phase I study of RO4929097 with bevacizumab in patients with recurrent malignant glioma. *J Neurooncol*. 2016;130(3):571-9.
366. Lee Y, Kim KH, Kim DG, Cho HJ, Kim Y, Rhee Y, et al. FoxM1 Promotes Stemness and Radio-Resistance of Glioblastoma by Regulating the Master Stem Cell Regulator Sox2. *PLoS ONE*. 2015;10(10):e0137703.
367. Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo H-W. Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers (Basel)*. 15 févr 2016;8(2).
368. Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W, et al. Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells*. oct 2007;25(10):2524-33.
369. Bensalma S, Chadeneau C, Legigan T, Renoux B, Gaillard A, de Boisvilliers M, et al. Evaluation of cytotoxic properties of a cyclopamine glucuronide prodrug in rat glioblastoma cells and tumors. *J Mol Neurosci*. janv 2015;55(1):51-61.
370. Liu Y-J, Ma Y-C, Zhang W-J, Yang Z-Z, Liang D-S, Wu Z-F, et al. Combination therapy with micellarized cyclopamine and temozolomide attenuate glioblastoma growth through Gli1 down-regulation. *Oncotarget*. 27 juin 2017;8(26):42495-509.
371. Ming J, Sun B, Li Z, Lin L, Meng X, Han B, et al. Aspirin inhibits the SHH/GLI1 signaling pathway and sensitizes malignant glioma cells to temozolomide therapy. *Aging (Albany NY)*. avr 2017;9(4):1233-47.
372. Reguera-Nuñez E, Roca C, Hardy E, de la Fuente M, Csaba N, Garcia-Fuentes M. Implantable controlled release devices for BMP-7 delivery and suppression of glioblastoma initiating cells. *Biomaterials*. mars 2014;35(9):2859-67.

373. Rampazzo E, Dettin M, Maule F, Scabello A, Calvanese L, D'Auria G, et al. A synthetic BMP-2 mimicking peptide induces glioblastoma stem cell differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1861(9):2282-92.
374. Lee J, Son MJ, Woolard K, Donin NM, Li A, Cheng CH, et al. Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer Cell*. janv 2008;13(1):69-80.
375. Park NI, Guilhamon P, Desai K, McAdam RF, Langille E, O'Connor M, et al. ASCL1 Reorganizes Chromatin to Direct Neuronal Fate and Suppress Tumorigenicity of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 3 août 2017;21(2):209-224.e7.
376. Mazor T, Pankov A, Song JS, Costello JF. Intratumoral Heterogeneity of the Epigenome. *Cancer Cell*. 11 avr 2016;29(4):440-51.
377. Daniele S, Costa B, Zappelli E, Da Pozzo E, Sestito S, Nesi G, et al. Combined inhibition of AKT/mTOR and MDM2 enhances Glioblastoma Multiforme cell apoptosis and differentiation of cancer stem cells. *Scientific Reports* [Internet]. sept 2015 [cité 27 juin 2018];5(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/srep09956>
378. Masliantsev K, Pinel B, Balbous A, Guichet P-O, Tachon G, Milin S, et al. Impact of STAT3 phosphorylation in glioblastoma stem cells radiosensitization and patient outcome. *Oncotarget* [Internet]. 9 janv 2018 [cité 22 août 2018];9(3). Disponible sur: <http://www.oncotarget.com/fulltext/23374>
379. Stechishin OD, Luchman HA, Ruan Y, Blough MD, Nguyen SA, Kelly JJ, et al. On-target JAK2/STAT3 inhibition slows disease progression in orthotopic xenografts of human glioblastoma brain tumor stem cells. *Neuro-oncology*. févr 2013;15(2):198-207.
380. Pang LY, Saunders L, Argyle DJ. Epidermal growth factor receptor activity is elevated in glioma cancer stem cells and is required to maintain chemotherapy and radiation resistance. *Oncotarget*. 22 sept 2017;8(42):72494-512.
381. Stevens LE, Cheung WKC, Adua SJ, Arnal-Estapé A, Zhao M, Liu Z, et al. Extracellular Matrix Receptor Expression in Subtypes of Lung Adenocarcinoma Potentiates Outgrowth of Micrometastases. *Cancer Res*. 15 2017;77(8):1905-17.
382. Socovich AM, Naba A. The cancer matrisome: From comprehensive characterization to biomarker discovery. *Semin Cell Dev Biol*. 12 juill 2018;
383. Wang J, Du Q, Li C. Bioinformatics analysis of gene expression profiles to identify causal genes in luminal B2 breast cancer. *Oncol Lett*. déc 2017;14(6):7880-8.
384. Lim SB, Tan SJ, Lim W-T, Lim CT. An extracellular matrix-related prognostic and predictive indicator for early-stage non-small cell lung cancer. *Nat Commun*. 23 nov 2017;8(1):1734.
385. Madrazo E, Conde AC, Redondo-Muñoz J. Inside the Cell: Integrins as New Governors of Nuclear Alterations? *Cancers (Basel)*. 6 juill 2017;9(7).
386. Parekh A, Ruppender NS, Branch KM, Sewell-Loftin MK, Lin J, Boyer PD, et al. Sensing and modulation of invadopodia across a wide range of rigidities. *Biophys J*. 2 févr 2011;100(3):573-82.
387. Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 12 juill 2018;
388. Ju JA, Godet I, Ye IC, Byun J, Jayatilaka H, Lee SJ, et al. Hypoxia Selectively Enhances Integrin $\alpha 5\beta 1$ Receptor Expression in Breast Cancer to Promote Metastasis. *Mol Cancer Res*. juin 2017;15(6):723-34.
389. Rothwell PM, Wilson M, Price JF, Belch JFF, Meade TW, Mehta Z. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet*. 28 avr 2012;379(9826):1591-601.
390. Lavergne M, Janus-Bell E, Schaff M, Gachet C, Mangin PH. Platelet Integrins in Tumor Metastasis: Do They Represent a Therapeutic Target? *Cancers (Basel)*. 28 sept 2017;9(10).
391. Zhang W, Dang S, Hong T, Tang J, Fan J, Bu D, et al. A humanized single-chain antibody against beta 3 integrin inhibits pulmonary metastasis by preferentially fragmenting activated platelets in the tumor microenvironment. *Blood*. 4 oct 2012;120(14):2889-98.

392. Mammadova-Bach E, Zigrino P, Brucker C, Bourdon C, Freund M, De Arcangelis A, et al. Platelet integrin $\alpha 6\beta 1$ controls lung metastasis through direct binding to cancer cell-derived ADAM9. *JCI Insight*. 08 2016;1(14):e88245.
393. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol*. 2007;8(5):215.
394. Lu X, Lu D, Scully M, Kakkar V. The role of integrins in cancer and the development of anti-integrin therapeutic agents for cancer therapy. *Perspect Medicin Chem*. 10 avr 2008;2:57-73.
395. Tolomelli A, Galletti P, Baiula M, Giacomini D. Can Integrin Agonists Have Cards to Play against Cancer? A Literature Survey of Small Molecules Integrin Activators. *Cancers (Basel)*. 5 juill 2017;9(7).
396. Miyazaki N, Iwasaki K, Takagi J. A systematic survey of conformational states in $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins using negative-stain electron microscopy. *J Cell Sci*. 22 mai 2018;131(10).
397. Su Y, Xia W, Li J, Walz T, Humphries MJ, Vestweber D, et al. Relating conformation to function in integrin $\alpha 5\beta 1$. *Proc Natl Acad Sci USA*. 05 2016;113(27):E3872-3881.
398. Cox D, Brennan M, Moran N. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. oct 2010;9(10):804-20.
399. Li J, Su Y, Xia W, Qin Y, Humphries MJ, Vestweber D, et al. Conformational equilibria and intrinsic affinities define integrin activation. *EMBO J*. 01 2017;36(5):629-45.
400. Nieberler M, Reuning U, Reichart F, Notni J, Wester H-J, Schwaiger M, et al. Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer. *Cancers (Basel)*. 4 sept 2017;9(9).
401. Mas-Moruno C, Rechenmacher F, Kessler H. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anticancer Agents Med Chem*. déc 2010;10(10):753-68.
402. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. janv 2010;10(1):9-22.
403. Canel M, Serrels A, Frame MC, Brunton VG. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci*. 15 janv 2013;126(Pt 2):393-401.
404. Calderwood DA, Campbell ID, Critchley DR. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. août 2013;14(8):503-17.
405. Robertson J, Jacquemet G, Byron A, Jones MC, Warwood S, Selley JN, et al. Defining the phospho-adhesome through the phosphoproteomic analysis of integrin signalling. *Nat Commun*. 13 févr 2015;6:6265.
406. Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. déc 2003;22(4):337-58.
407. Yee KL, Weaver VM, Hammer DA. Integrin-mediated signalling through the MAP-kinase pathway. *IET Syst Biol*. janv 2008;2(1):8-15.
408. Horton ER, Byron A, Askari JA, Ng DHJ, Millon-Frémillon A, Robertson J, et al. Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat Cell Biol*. déc 2015;17(12):1577-87.
409. Wolfenson H, Lavelin I, Geiger B. Dynamic regulation of the structure and functions of integrin adhesions. *Dev Cell*. 11 mars 2013;24(5):447-58.
410. Ma Y-Q, Qin J, Wu C, Plow EF. Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of $\beta 3$ integrins. *J Cell Biol*. 5 mai 2008;181(3):439-46.
411. Seetharaman S, Etienne-Manneville S. Integrin diversity brings specificity in mechanotransduction. *Biol Cell*. mars 2018;110(3):49-64.
412. Theodosiou M, Widmaier M, Böttcher RT, Rognoni E, Veelders M, Bharadwaj M, et al. Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *Elife*. 27 janv 2016;5:e10130.
413. Missirlis D, Haraszti T, Scheele C v C, Wiegand T, Diaz C, Neubauer S, et al. Substrate engagement of integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ is necessary, but not sufficient, for high directional persistence in migration on fibronectin. *Sci Rep*. 18 mars 2016;6:23258.

414. Iskratsch T, Wolfenson H, Sheetz MP. Appreciating force and shape—the rise of mechanotransduction in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(12):825-33.
415. Sun Z, Guo SS, Fässler R. Integrin-mediated mechanotransduction. *The Journal of Cell Biology.* 21 nov 2016;215(4):445-56.
416. Vicente-Manzanares M, Sánchez-Madrid F. Targeting the integrin interactome in human disease. *Current Opinion in Cell Biology.* déc 2018;55:17-23.
417. Rahmouni S, Lindner A, Rechenmacher F, Neubauer S, Sobahi TRA, Kessler H, et al. Hydrogel micropillars with integrin selective peptidomimetic functionalized nanopatterned tops: a new tool for the measurement of cell traction forces transmitted through $\alpha\beta3$ - or $\alpha5\beta1$ -integrins. *Adv Mater Weinheim.* 6 nov 2013;25(41):5869-74.
418. Elosegui-Artola A, Oria R, Chen Y, Kosmalka A, Pérez-González C, Castro N, et al. Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity. *Nat Cell Biol.* 2016;18(5):540-8.
419. Atherton P, Stutchbury B, Jethwa D, Ballestrem C. Mechanosensitive components of integrin adhesions: Role of vinculin. *Exp Cell Res.* 10 2016;343(1):21-7.
420. Goodman SL, Picard M. Integrins as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci.* juill 2012;33(7):405-12.
421. Rocha LA, Learmonth DA, Sousa RA, Salgado AJ. $\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$ integrin-specific ligands: From tumor angiogenesis inhibitors to vascularization promoters in regenerative medicine? *Biotechnology Advances.* janv 2018;36(1):208-27.
422. Plow EF, Pierschbacher MD, Ruoslahti E, Marguerie GA, Ginsberg MH. The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proc Natl Acad Sci USA.* déc 1985;82(23):8057-61.
423. Gabriel HM, Oliveira EI. Role of abciximab in the treatment of coronary artery disease. *Expert Opin Biol Ther.* sept 2006;6(9):935-42.
424. Meyer A, Auernheimer J, Modlinger A, Kessler H. Targeting RGD recognizing integrins: drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting. *Curr Pharm Des.* 2006;12(22):2723-47.
425. Ley K, Rivera-Nieves J, Sandborn WJ, Shattil S. Integrin-based therapeutics: biological basis, clinical use and new drugs. *Nat Rev Drug Discov.* mars 2016;15(3):173-83.
426. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 20 sept 2002;110(6):673-87.
427. Blandin A-F, Renner G, Lehmann M, Lelong-Rebel I, Martin S, Dontenwill M. $\beta1$ Integrins as Therapeutic Targets to Disrupt Hallmarks of Cancer. *Front Pharmacol.* 2015;6:279.
428. Mitra AK, Sawada K, Tiwari P, Mui K, Gwin K, Lengyel E. Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and $\alpha(5)\beta(1)$ -integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene.* 31 mars 2011;30(13):1566-76.
429. Lössner D, Abou-Ajram C, Bengé A, Reuning U. Integrin $\alpha\beta3$ mediates upregulation of epidermal growth-factor receptor expression and activity in human ovarian cancer cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* janv 2008;40(12):2746-61.
430. Guo W, Pylayeva Y, Pepe A, Yoshioka T, Muller WJ, Inghirami G, et al. Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell.* 11 août 2006;126(3):489-502.
431. Fujita M, Takada YK, Takada Y. Insulin-like growth factor (IGF) signaling requires $\alpha\beta3$ -IGF1-IGF type 1 receptor (IGF1R) ternary complex formation in anchorage independence, and the complex formation does not require IGF1R and Src activation. *J Biol Chem.* 1 févr 2013;288(5):3059-69.
432. Novitskaya V, Romanska H, Kordek R, Potemski P, Kusińska R, Parsons M, et al. Integrin $\alpha3\beta1$ -CD151 complex regulates dimerization of ErbB2 via RhoA. *Oncogene.* 22 mai 2014;33(21):2779-89.
433. Morello V, Cabodi S, Sigismund S, Camacho-Leal MP, Repetto D, Volante M, et al. $\beta1$ integrin controls EGFR signaling and tumorigenic properties of lung cancer cells. *Oncogene.* 29 sept 2011;30(39):4087-96.

434. Carpenter BL, Chen M, Knifley T, Davis KA, Harrison SMW, Stewart RL, et al. Integrin $\alpha 6\beta 4$ Promotes Autocrine Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling to Stimulate Migration and Invasion toward Hepatocyte Growth Factor (HGF). *J Biol Chem.* 6 nov 2015;290(45):27228-38.
435. Huang C, Park CC, Hilsenbeck SG, Ward R, Rimawi MF, Wang Y-C, et al. $\beta 1$ integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast Cancer Res.* 31 août 2011;13(4):R84.
436. Bianconi D, Unseld M, Prager GW. Integrins in the Spotlight of Cancer. *Int J Mol Sci.* 6 déc 2016;17(12).
437. Bartolomé RA, Barderas R, Torres S, Fernandez-Aceñero MJ, Mendes M, García-Foncillas J, et al. Cadherin-17 interacts with $\alpha 2\beta 1$ integrin to regulate cell proliferation and adhesion in colorectal cancer cells causing liver metastasis. *Oncogene.* 27 mars 2014;33(13):1658-69.
438. Zhang X, Cook PC, Zindy E, Williams CJ, Jowitt TA, Streuli CH, et al. Integrin $\alpha 4\beta 1$ controls G9a activity that regulates epigenetic changes and nuclear properties required for lymphocyte migration. *Nucleic Acids Res.* 20 avr 2016;44(7):3031-44.
439. Lee B-H, Ruoslahti E. $\alpha 5\beta 1$ integrin stimulates Bcl-2 expression and cell survival through Akt, focal adhesion kinase, and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV. *J Cell Biochem.* 15 août 2005;95(6):1214-23.
440. Aoudjit F, Vuori K. Integrin signaling in cancer cell survival and chemoresistance. *Chemother Res Pract.* 2012;2012:283181.
441. de la Fuente MT, Casanova B, Garcia-Gila M, Silva A, Garcia-Pardo A. Fibronectin interaction with $\alpha 4\beta 1$ integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax. *Leukemia.* févr 1999;13(2):266-74.
442. Lim S-T, Chen XL, Lim Y, Hanson DA, Vo T-T, Howerton K, et al. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol Cell.* 18 janv 2008;29(1):9-22.
443. Ponnala S, Chetty C, Veeravalli KK, Dinh DH, Klopfenstein JD, Rao JS. MMP-9 silencing regulates hTERT expression via $\beta 1$ integrin-mediated FAK signaling and induces senescence in glioma xenograft cells. *Cell Signal.* déc 2011;23(12):2065-75.
444. Ilić D, Almeida EA, Schlaepfer DD, Dazin P, Aizawa S, Damsky CH. Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J Cell Biol.* 19 oct 1998;143(2):547-60.
445. Russo MA, Paolillo M, Sanchez-Hernandez Y, Curti D, Ciusani E, Serra M, et al. A small-molecule RGD-integrin antagonist inhibits cell adhesion, cell migration and induces anoikis in glioblastoma cells. *Int J Oncol.* janv 2013;42(1):83-92.
446. Buchheit CL, Weigel KJ, Schafer ZT. Cancer cell survival during detachment from the ECM: multiple barriers to tumour progression. *Nat Rev Cancer.* sept 2014;14(9):632-41.
447. Aslan B, Monroig P, Hsu M-C, Pena GA, Rodriguez-Aguayo C, Gonzalez-Villasana V, et al. The ZNF304-integrin axis protects against anoikis in cancer. *Nat Commun.* 17 juin 2015;6:7351.
448. Iwanicki MP, Chen H-Y, Iavarone C, Zervantonakis IK, Muranen T, Novak M, et al. Mutant p53 regulates ovarian cancer transformed phenotypes through autocrine matrix deposition. *JCI Insight.* 7 juill 2016;1(10).
449. Alanko J, Mai A, Jacquemet G, Schauer K, Kaukonen R, Saari M, et al. Integrin endosomal signalling suppresses anoikis. *Nat Cell Biol.* nov 2015;17(11):1412-21.
450. Puissant A, Dufies M, Fenouille N, Ben Sahra I, Jacquel A, Robert G, et al. Imatinib triggers mesenchymal-like conversion of CML cells associated with increased aggressiveness. *J Mol Cell Biol.* août 2012;4(4):207-20.
451. Lesniak D, Xu Y, Deschenes J, Lai R, Thoms J, Murray D, et al. Beta1-integrin circumvents the antiproliferative effects of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer. *Cancer Res.* 15 nov 2009;69(22):8620-8.

452. Janouskova H, Maglott A, Leger DY, Bossert C, Noulet F, Guerin E, et al. Integrin $\alpha 5\beta 1$ plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma. *Cancer Res.* 15 juill 2012;72(14):3463-70.
453. Renner G, Janouskova H, Noulet F, Koenig V, Guerin E, Bär S, et al. Integrin $\alpha 5\beta 1$ and p53 convergent pathways in the control of anti-apoptotic proteins PEA-15 and survivin in high-grade glioma. *Cell Death Differ.* avr 2016;23(4):640-53.
454. Carbonell WS, DeLay M, Jahangiri A, Park CC, Aghi MK. $\beta 1$ integrin targeting potentiates antiangiogenic therapy and inhibits the growth of bevacizumab-resistant glioblastoma. *Cancer Res.* 15 mai 2013;73(10):3145-54.
455. Park CC, Zhang HJ, Yao ES, Park CJ, Bissell MJ. Beta1 integrin inhibition dramatically enhances radiotherapy efficacy in human breast cancer xenografts. *Cancer Res.* 1 juin 2008;68(11):4398-405.
456. Eke I, Deuse Y, Hehlhans S, Gurtner K, Krause M, Baumann M, et al. $\beta 1$ Integrin/FAK/cortactin signaling is essential for human head and neck cancer resistance to radiotherapy. *J Clin Invest.* avr 2012;122(4):1529-40.
457. Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer.* août 2008;8(8):604-17.
458. Chung J, Bachelder RE, Lipscomb EA, Shaw LM, Mercurio AM. Integrin (alpha 6 beta 4) regulation of eIF-4E activity and VEGF translation: a survival mechanism for carcinoma cells. *J Cell Biol.* 8 juill 2002;158(1):165-74.
459. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresch DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science.* 1 déc 1995;270(5241):1500-2.
460. Lee HS, Oh SJ, Lee K-H, Lee Y-S, Ko E, Kim KE, et al. Gln-362 of angiopoietin-2 mediates migration of tumor and endothelial cells through association with $\alpha 5\beta 1$ integrin. *J Biol Chem.* 7 nov 2014;289(45):31330-40.
461. Reynolds LE, D'Amico G, Lechertier T, Papachristodoulou A, Muñoz-Félix JM, De Arcangelis A, et al. Dual role of pericyte $\alpha 6\beta 1$ -integrin in tumour blood vessels. *J Cell Sci.* 1 mai 2017;130(9):1583-95.
462. Roth P, Silginer M, Goodman SL, Hasenbach K, Thies S, Maurer G, et al. Integrin control of the transforming growth factor- β pathway in glioblastoma. *Brain.* févr 2013;136(Pt 2):564-76.
463. Jung AC, Ray A-M, Ramolu L, Macabre C, Simon F, Noulet F, et al. Caveolin-1-negative head and neck squamous cell carcinoma primary tumors display increased epithelial to mesenchymal transition and prometastatic properties. *Oncotarget.* 8 déc 2015;6(39):41884-901.
464. Renner G, Noulet F, Mercier M-C, Choulier L, Etienne-Selloum N, Gies J-P, et al. Expression/activation of $\alpha 5\beta 1$ integrin is linked to the β -catenin signaling pathway to drive migration in glioma cells. *Oncotarget.* 20 sept 2016;7(38):62194-207.
465. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 19 nov 2015;527(7578):329-35.
466. Yang G-Y, Xu K-S, Pan Z-Q, Zhang Z-Y, Mi Y-T, Wang J-S, et al. Integrin alpha v beta 6 mediates the potential for colon cancer cells to colonize in and metastasize to the liver. *Cancer Sci.* mai 2008;99(5):879-87.
467. Ahmed N, Pansino F, Clyde R, Murthi P, Quinn MA, Rice GE, et al. Overexpression of alpha(v)beta6 integrin in serous epithelial ovarian cancer regulates extracellular matrix degradation via the plasminogen activation cascade. *Carcinogenesis.* févr 2002;23(2):237-44.
468. Rolli M, Fransvea E, Pilch J, Saven A, Felding-Habermann B. Activated integrin alphavbeta3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 5 août 2003;100(16):9482-7.
469. Morini M, Mottolese M, Ferrari N, Ghiorzo F, Buglioni S, Mortarini R, et al. The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity. *Int J Cancer.* 1 août 2000;87(3):336-42.

470. Hu B, Jarzynka MJ, Guo P, Imanishi Y, Schlaepfer DD, Cheng S-Y. Angiopoietin 2 induces glioma cell invasion by stimulating matrix metalloprotease 2 expression through the α v β 1 integrin and focal adhesion kinase signaling pathway. *Cancer Res.* 15 janv 2006;66(2):775-83.
471. Barkan D, Chambers AF. β 1-integrin: a potential therapeutic target in the battle against cancer recurrence. *Clin Cancer Res.* 1 déc 2011;17(23):7219-23.
472. Goel HL, Gritsko T, Pursell B, Chang C, Shultz LD, Greiner DL, et al. Regulated splicing of the α 6 integrin cytoplasmic domain determines the fate of breast cancer stem cells. *Cell Rep.* 8 mai 2014;7(3):747-61.
473. Hoogland AM, Verhoef EI, Roobol MJ, Schröder FH, Wildhagen MF, van der Kwast TH, et al. Validation of stem cell markers in clinical prostate cancer: α 6-integrin is predictive for non-aggressive disease. *Prostate.* mai 2014;74(5):488-96.
474. Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Ohta K, Uemura M, Nishimura J, et al. CD49f-positive cell population efficiently enriches colon cancer-initiating cells. *Int J Oncol.* août 2013;43(2):425-30.
475. Martin TA, Jiang WG. Evaluation of the expression of stem cell markers in human breast cancer reveals a correlation with clinical progression and metastatic disease in ductal carcinoma. *Oncol Rep.* janv 2014;31(1):262-72.
476. Zheng Y, de la Cruz CC, Sayles LC, Alleyne-Chin C, Vaka D, Knaak TD, et al. A rare population of CD24(+)/ITGB4(+)/Notch(hi) cells drives tumor propagation in NSCLC and requires Notch3 for self-renewal. *Cancer Cell.* 8 juill 2013;24(1):59-74.
477. Desgrosellier JS, Lesperance J, Seguin L, Gozo M, Kato S, Franovic A, et al. Integrin α v β 3 drives slug activation and stemness in the pregnant and neoplastic mammary gland. *Dev Cell.* 11 août 2014;30(3):295-308.
478. Vaillant F, Asselin-Labat M-L, Shackleton M, Forrest NC, Lindeman GJ, Visvader JE. The mammary progenitor marker CD61/ β 3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* 1 oct 2008;68(19):7711-7.
479. Ming X-Y, Fu L, Zhang L-Y, Qin Y-R, Cao T-T, Chan KW, et al. Integrin α 7 is a functional cancer stem cell surface marker in oesophageal squamous cell carcinoma. *Nature Communications.* 7 déc 2016;7:13568.
480. Guerrero PA, Tchaicha JH, Chen Z, Morales JE, McCarty N, Wang Q, et al. Glioblastoma stem cells exploit the α v β 8 integrin-TGF β 1 signaling axis to drive tumor initiation and progression. *Oncogene.* 23 2017;36(47):6568-80.
481. Carrasco-Garcia E, Auzmendi-Iriarte J, Matheu A. Integrin α 7: a novel promising target in glioblastoma stem cells. *Stem Cell Investig.* 2018;5:2.
482. Haas TL, Sciuto MR, Brunetto L, Valvo C, Signore M, Fiori ME, et al. Integrin α 7 Is a Functional Marker and Potential Therapeutic Target in Glioblastoma. *Cell Stem Cell.* 06 2017;21(1):35-50.e9.
483. Nakada M, Nambu E, Furuyama N, Yoshida Y, Takino T, Hayashi Y, et al. Integrin α 3 is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. *Br J Cancer.* 25 juin 2013;108(12):2516-24.
484. Kobayashi M, Sawada K, Kimura T. Potential of Integrin Inhibitors for Treating Ovarian Cancer: A Literature Review. *Cancers (Basel).* 8 juill 2017;9(7).
485. Dingemans A-MC, van den Boogaart V, Vosse BA, van Suylen R-J, Griffioen AW, Thijssen VL. Integrin expression profiling identifies integrin α 5 and β 1 as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer. *Mol Cancer.* 17 juin 2010;9:152.
486. Breuksch I, Prosinger F, Baehr F, Engelhardt F-P, Bauer H-K, Thüroff JW, et al. Integrin α 5 triggers the metastatic potential in renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 8 déc 2017;8(64):107530-42.
487. Ren J, Xu S, Guo D, Zhang J, Liu S. Increased expression of α 5 β 1-integrin is a prognostic marker for patients with gastric cancer. *Clinical and Translational Oncology.* juill 2014;16(7):668-74.
488. Nam J-M, Onodera Y, Bissell MJ, Park CC. Breast cancer cells in three-dimensional culture display an enhanced radioresponse after coordinate targeting of integrin α 5 β 1 and fibronectin. *Cancer Res.* 1 juill 2010;70(13):5238-48.

489. Schaffner F, Ray AM, Dontenwill M. Integrin $\alpha 5\beta 1$, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors. *Cancers (Basel)*. 15 janv 2013;5(1):27-47.
490. Qian F, Zhang Z-C, Wu X-F, Li Y-P, Xu Q. Interaction between integrin alpha(5) and fibronectin is required for metastasis of B16F10 melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 12 août 2005;333(4):1269-75.
491. Roman J, Ritzenthaler JD, Roser-Page S, Sun X, Han S. alpha5beta1-integrin expression is essential for tumor progression in experimental lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*. déc 2010;43(6):684-91.
492. McKenzie JA, Liu T, Jung JY, Jones BB, Ekiz HA, Welm AL, et al. Survivin promotion of melanoma metastasis requires upregulation of $\alpha 5$ integrin. *Carcinogenesis*. sept 2013;34(9):2137-44.
493. Zhu H, Chen A, Li S, Tao X, Sheng B, Chetry M, et al. Predictive role of galectin-1 and integrin $\alpha 5\beta 1$ in cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy of bulky squamous cervical cancer. *Biosci Rep*. 31 oct 2017;37(5).
494. Xu T, Qin L, Zhu Z, Wang X, Liu Y, Fan Y, et al. MicroRNA-31 functions as a tumor suppressor and increases sensitivity to mitomycin-C in urothelial bladder cancer by targeting integrin $\alpha 5\beta 1$. *Oncotarget* [Internet]. 10 mai 2016 [cité 25 août 2018];7(19). Disponible sur: <http://www.oncotarget.com/fulltext/8479>
495. Yao H, Zeng Z-Z, Fay KS, Veine DM, Staszewski ED, Morgan M, et al. Role of $\alpha(5)\beta(1)$ Integrin Up-regulation in Radiation-Induced Invasion by Human Pancreatic Cancer Cells. *Transl Oncol*. oct 2011;4(5):282-92.
496. Unnikrishnan A, Papaemmanuil E, Beck D, Deshpande NP, Verma A, Kumari A, et al. Integrative Genomics Identifies the Molecular Basis of Resistance to Azacitidine Therapy in Myelodysplastic Syndromes. *Cell Reports*. juill 2017;20(3):572-85.
497. Qin L, Chen X, Wu Y, Feng Z, He T, Wang L, et al. Steroid receptor coactivator-1 upregulates integrin $\alpha 5$ expression to promote breast cancer cell adhesion and migration. *Cancer Res*. 1 mars 2011;71(5):1742-51.
498. Haber T, Jöckel E, Roos FC, Junker K, Prawitt D, Hampel C, et al. Bone Metastasis in Renal Cell Carcinoma is Preprogrammed in the Primary Tumor and Caused by AKT and Integrin $\alpha 5$ Signaling. *J Urol*. août 2015;194(2):539-46.
499. McFarlane S, McFarlane C, Montgomery N, Hill A, Waugh DJJ. CD44-mediated activation of $\alpha 5\beta 1$ -integrin, cortactin and paxillin signaling underpins adhesion of basal-like breast cancer cells to endothelium and fibronectin-enriched matrices. *Oncotarget*. 3 nov 2015;6(34):36762-73.
500. Huang C, Verhulst S, Shen Y, Bu Y, Cao Y, He Y, et al. AKR1B10 promotes breast cancer metastasis through integrin $\alpha 5/\delta$ -catenin mediated FAK/Src/Rac1 signaling pathway. *Oncotarget*. 12 juill 2016;7(28):43779-91.
501. Xie J-J, Guo J-C, Wu Z-Y, Xu X-E, Wu J-Y, Chen B, et al. Integrin $\alpha 5$ promotes tumor progression and is an independent unfavorable prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*. févr 2016;48:69-75.
502. Joshi R, Goihberg E, Ren W, Pilichowska M, Mathew P. Proteolytic fragments of fibronectin function as matrikines driving the chemotactic affinity of prostate cancer cells to human bone marrow mesenchymal stromal cells via the $\alpha 5\beta 1$ integrin. *Cell Adhesion & Migration*. 4 juill 2017;11(4):305-15.
503. Zutter MM, Santoro SA, Staatz WD, Tsung YL. Re-expression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1 août 1995;92(16):7411-5.
504. Schwartz MA, McRoberts K, Coyner M, Andarawewa KL, Frierson HF, Sanders JM, et al. Integrin agonists as adjuvants in chemotherapy for melanoma. *Clin Cancer Res*. 1 oct 2008;14(19):6193-7.
505. Trikha M, Zhou Z, Nemeth JA, Chen Q, Sharp C, Emmell E, et al. CNTO 95, a fully human monoclonal antibody that inhibits alphav integrins, has antitumor and antiangiogenic activity in vivo. *Int J Cancer*. 20 juin 2004;110(3):326-35.
506. Mullamitha SA, Ton NC, Parker GJM, Jackson A, Julyan PJ, Roberts C, et al. Phase I evaluation of a fully human anti-alphav integrin monoclonal antibody (CNTO 95) in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. 1 avr 2007;13(7):2128-35.
507. Chu FM, Picus J, Fracasso PM, Dreicer R, Lang Z, Foster B. A phase 1, multicenter, open-label study of the safety of two dose levels of a human monoclonal antibody to human $\alpha(v)$ integrins, intetumumab, in combination with

docetaxel and prednisone in patients with castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Invest New Drugs*. août 2011;29(4):674-9.

508. O'Day S, Pavlick A, Loquai C, Lawson D, Gutzmer R, Richards J, et al. A randomised, phase II study of intetumumab, an anti- α -integrin mAb, alone and with dacarbazine in stage IV melanoma. *Br J Cancer*. 26 juill 2011;105(3):346-52.

509. Heidenreich A, Rawal SK, Szkarlat K, Bogdanova N, Dirix L, Stenzl A, et al. A randomized, double-blind, multicenter, phase 2 study of a human monoclonal antibody to human α integrins (intetumumab) in combination with docetaxel and prednisone for the first-line treatment of patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol*. févr 2013;24(2):329-36.

510. Hersey P, Sosman J, O'Day S, Richards J, Bedikian A, Gonzalez R, et al. A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin α (v) β (3), + or - dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma. *Cancer*. 15 mars 2010;116(6):1526-34.

511. Hussain M, Le Moulec S, Gimmi C, Bruns R, Straub J, Miller K, et al. Differential Effect on Bone Lesions of Targeting Integrins: Randomized Phase II Trial of Abituzumab in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 1 juill 2016;22(13):3192-200.

512. Élez E, Kocáková I, Höhler T, Martens UM, Bokemeyer C, Van Cutsem E, et al. Abituzumab combined with cetuximab plus irinotecan versus cetuximab plus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: the randomised phase I/II POSEIDON trial. *Ann Oncol*. janv 2015;26(1):132-40.

513. Burke PA, DeNardo SJ, Miers LA, Lamborn KR, Matzku S, DeNardo GL. Cilengitide targeting of α (v) β (3) integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer Res*. 1 août 2002;62(15):4263-72.

514. Albert JM, Cao C, Geng L, Leavitt L, Hallahan DE, Lu B. Integrin α v β 3 antagonist Cilengitide enhances efficacy of radiotherapy in endothelial cell and non-small-cell lung cancer models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 août 2006;65(5):1536-43.

515. Gvozdenovic A, Boro A, Meier D, Bode-Lesniewska B, Born W, Muff R, et al. Targeting α β 3 and α β 5 integrins inhibits pulmonary metastasis in an intratibial xenograft osteosarcoma mouse model. *Oncotarget*. 23 août 2016;7(34):55141-54.

516. MacDonald TJ, Vezina G, Stewart CF, Turner D, Pierson CR, Chen L, et al. Phase II study of cilengitide in the treatment of refractory or relapsed high-grade gliomas in children: a report from the Children's Oncology Group. *Neuro-oncology*. oct 2013;15(10):1438-44.

517. Alva A, Slovin S, Daignault S, Carducci M, Dipaola R, Pienta K, et al. Phase II study of cilengitide (EMD 121974, NSC 707544) in patients with non-metastatic castration resistant prostate cancer, NCI-6735. A study by the DOD/PCF prostate cancer clinical trials consortium. *Invest New Drugs*. avr 2012;30(2):749-57.

518. Friess H, Langrehr JM, Oettle H, Raedle J, Niedergethmann M, Dittrich C, et al. A randomized multi-center phase II trial of the angiogenesis inhibitor Cilengitide (EMD 121974) and gemcitabine compared with gemcitabine alone in advanced unresectable pancreatic cancer. *BMC Cancer* [Internet]. déc 2006 [cité 27 août 2018];6(1). Disponible sur: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-6-285>

519. Kim KB, Prieto V, Joseph RW, Diwan AH, Gallick GE, Papadopoulos NE, et al. A randomized phase II study of cilengitide (EMD 121974) in patients with metastatic melanoma. *Melanoma Res*. août 2012;22(4):294-301.

520. Manegold C, Vansteenkiste J, Cardenal F, Schuette W, Woll PJ, Ulsperger E, et al. Randomized phase II study of three doses of the integrin inhibitor cilengitide versus docetaxel as second-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Invest New Drugs*. févr 2013;31(1):175-82.

521. Vansteenkiste J, Barlesi F, Waller CF, Bennouna J, Gridelli C, Goekkurt E, et al. Cilengitide combined with cetuximab and platinum-based chemotherapy as first-line treatment in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients: results of an open-label, randomized, controlled phase II study (CERTO). *Ann Oncol*. août 2015;26(8):1734-40.
522. Truong HH, Xiong J, Ghotra VPS, Nirmala E, Haazen L, Le Dévédec SE, et al. $\beta 1$ integrin inhibition elicits a prometastatic switch through the TGF β -miR-200-ZEB network in E-cadherin-positive triple-negative breast cancer. *Sci Signal*. 11 févr 2014;7(312):ra15.
523. Ji S, Zheng Y, Shao G, Zhou Y, Liu S. Integrin $\alpha(v)\beta_3$ -targeted radiotracer (99m)Tc-3P-RGD₂ useful for noninvasive monitoring of breast tumor response to antiangiogenic linifanib therapy but not anti-integrin $\alpha(v)\beta_3$ RGD₂ therapy. *Theranostics*. 2013;3(11):816-30.
524. Bello L, Francolini M, Marthyn P, Zhang J, Carroll RS, Nikas DC, et al. Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery. *Neurosurgery*. août 2001;49(2):380-9; discussion 390.
525. Schnell O, Krebs B, Wagner E, Romagna A, Beer AJ, Grau SJ, et al. Expression of integrin alphavbeta3 in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature. *Brain Pathol*. juill 2008;18(3):378-86.
526. Schittenhelm J, Schwab EI, Sperveslage J, Tatagiba M, Meyermann R, Fend F, et al. Longitudinal expression analysis of αv integrins in human gliomas reveals upregulation of integrin $\alpha v\beta 3$ as a negative prognostic factor. *J Neuropathol Exp Neurol*. mars 2013;72(3):194-210.
527. Monferran S, Skuli N, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Cohen-Jonathan-Moyal E, et al. Alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int J Cancer*. 15 juill 2008;123(2):357-64.
528. Kapp TG, Rechenmacher F, Neubauer S, Maltsev OV, Cavalcanti-Adam EA, Zarka R, et al. A Comprehensive Evaluation of the Activity and Selectivity Profile of Ligands for RGD-binding Integrins. *Sci Rep*. 11 2017;7:39805.
529. Heckmann D, Laufer B, Marinelli L, Limongelli V, Novellino E, Zahn G, et al. Breaking the dogma of the metal-coordinating carboxylate group in integrin ligands: introducing hydroxamic acids to the MIDAS to tune potency and selectivity. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009;48(24):4436-40.
530. Hruby VJ. Conformational restrictions of biologically active peptides via amino acid side chain groups. *Life Sciences*. juill 1982;31(3):189-99.
531. Dechantsreiter MA, Planker E, Mathä B, Lohof E, Hölzemann G, Jonczyk A, et al. N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(V)beta(3) integrin antagonists. *J Med Chem*. 12 août 1999;42(16):3033-40.
532. Mas-Moruno C, Beck JG, Doedens L, Frank AO, Marinelli L, Cosconati S, et al. Increasing $\alpha v\beta 3$ selectivity of the anti-angiogenic drug cilengitide by N-methylation. *Angew Chem Int Ed Engl*. 26 sept 2011;50(40):9496-500.
533. Neubauer S, Rechenmacher F, Brimioulle R, Di Leva FS, Bochen A, Sobahi TR, et al. Pharmacophoric Modifications Lead to Superpotent $\alpha v\beta 3$ Integrin Ligands with Suppressed $\alpha 5\beta 1$ Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 24 avr 2014;57(8):3410-7.
534. Smith JW. Cilengitide Merck. *Curr Opin Investig Drugs*. juin 2003;4(6):741-5.
535. Taga T, Suzuki A, Gonzalez-Gomez I, Gilles FH, Stins M, Shimada H, et al. alpha v-Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *Int J Cancer*. 10 avr 2002;98(5):690-7.
536. Maurer GD, Tritschler I, Adams B, Tabatabai G, Wick W, Stupp R, et al. Cilengitide modulates attachment and viability of human glioma cells, but not sensitivity to irradiation or temozolomide in vitro. *Neuro-oncology*. déc 2009;11(6):747-56.
537. MacDonald TJ, Taga T, Shimada H, Tabrizi P, Zlokovic BV, Cheresch DA, et al. Preferential susceptibility of brain tumors to the antiangiogenic effects of an alpha(v) integrin antagonist. *Neurosurgery*. janv 2001;48(1):151-7.
538. Yamada S, Bu X-Y, Khankaldyyan V, Gonzales-Gomez I, McComb JG, Laug WE. Effect of the angiogenesis inhibitor Cilengitide (EMD 121974) on glioblastoma growth in nude mice. *Neurosurgery*. déc 2006;59(6):1304-12; discussion 1312.

539. Mikkelsen T, Brodie C, Finniss S, Berens ME, Rennert JL, Nelson K, et al. Radiation sensitization of glioblastoma by cilengitide has unanticipated schedule-dependency. *Int J Cancer*. 1 juin 2009;124(11):2719-27.
540. Ishida J, Onishi M, Kurozumi K, Ichikawa T, Fujii K, Shimazu Y, et al. AI-14 * THE ANTI ANGIOGENIC AND INVASIVE EFFECTS OF AN INTEGRIN INHIBITOR AGAINST BEVACIZUMAB-INDUCED INVASIVE GLIOMA. *Neuro-Oncology*. 1 nov 2014;16(suppl 5):v4-v4.
541. Nabors LB, Mikkelsen T, Rosenfeld SS, Hochberg F, Akella NS, Fisher JD, et al. Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol*. 1 mai 2007;25(13):1651-7.
542. Gerstner ER, Ye X, Duda DG, Levine MA, Mikkelsen T, Kaley TJ, et al. A phase I study of cediranib in combination with cilengitide in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology*. oct 2015;17(10):1386-92.
543. Reardon DA, Fink KL, Mikkelsen T, Cloughesy TF, O'Neill A, Plotkin S, et al. Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*. 1 déc 2008;26(34):5610-7.
544. Stupp R, Hegi ME, Neyns B, Goldbrunner R, Schlegel U, Clement PMJ, et al. Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol*. 1 juin 2010;28(16):2712-8.
545. Legler DF, Wiedle G, Ross FP, Imhof BA. Superactivation of integrin $\alpha v \beta 3$ by low antagonist concentrations. *J Cell Sci*. avr 2001;114(Pt 8):1545-53.
546. Reynolds AR, Hart IR, Watson AR, Welte JC, Silva RG, Robinson SD, et al. Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. *Nat Med*. avr 2009;15(4):392-400.
547. Wong P-P, Demircioglu F, Ghazaly E, Alrawashdeh W, Stratford MRL, Scudamore CL, et al. Dual-action combination therapy enhances angiogenesis while reducing tumor growth and spread. *Cancer Cell*. 12 janv 2015;27(1):123-37.
548. Christmann M, Diesler K, Majhen D, Steigerwald C, Berte N, Freund H, et al. Integrin $\alpha v \beta 3$ silencing sensitizes malignant glioma cells to temozolomide by suppression of homologous recombination repair. *Oncotarget*. 25 avr 2017;8(17):27754-71.
549. Cosset É, Ilmjärv S, Dutoit V, Elliott K, von Schalscha T, Camargo MF, et al. Glut3 Addiction Is a Druggable Vulnerability for a Molecularly Defined Subpopulation of Glioblastoma. *Cancer Cell*. 11 déc 2017;32(6):856-868.e5.
550. Zhou P, Erfani S, Liu Z, Jia C, Chen Y, Xu B, et al. CD151- $\alpha 3 \beta 1$ integrin complexes are prognostic markers of glioblastoma and cooperate with EGFR to drive tumor cell motility and invasion. *Oncotarget*. 6 oct 2015;6(30):29675-93.
551. Reyes SB, Narayanan AS, Lee HS, Tchaicha JH, Aldape KD, Lang FF, et al. $\alpha v \beta 8$ integrin interacts with RhoGDI1 to regulate Rac1 and Cdc42 activation and drive glioblastoma cell invasion. *Mol Biol Cell*. févr 2013;24(4):474-82.
552. Tchaicha JH, Reyes SB, Shin J, Hossain MG, Lang FF, McCarty JH. Glioblastoma angiogenesis and tumor cell invasiveness are differentially regulated by $\beta 8$ integrin. *Cancer Res*. 15 oct 2011;71(20):6371-81.
553. Malric L, Monferran S, Gilhodes J, Boyrie S, Dahan P, Skuli N, et al. Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: an update. *Oncotarget*. 17 oct 2017;8(49):86947-68.
554. Marinelli L, Meyer A, Heckmann D, Lavecchia A, Novellino E, Kessler H. Ligand Binding Analysis for Human $\alpha 5 \beta 1$ Integrin: Strategies for Designing New $\alpha 5 \beta 1$ Integrin Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*. juin 2005;48(13):4204-7.
555. Bader BL, Rayburn H, Crowley D, Hynes RO. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell*. 13 nov 1998;95(4):507-19.
556. Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, et al. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med*. janv 2002;8(1):27-34.
557. Hynes RO, Hodivala-Dilke KM. Insights and questions arising from studies of a mouse model of Glanzmann thrombasthenia. *Thromb Haemost*. août 1999;82(2):481-5.

558. Reynolds AR, Reynolds LE, Nagel TE, Lively JC, Robinson SD, Hicklin DJ, et al. Elevated Flk1 (vascular endothelial growth factor receptor 2) signaling mediates enhanced angiogenesis in beta3-integrin-deficient mice. *Cancer Res.* 1 déc 2004;64(23):8643-50.
559. Atkinson SJ, Ellison TS, Steri V, Gould E, Robinson SD. Redefining the role(s) of endothelial $\alpha\beta 3$ -integrin in angiogenesis. *Biochem Soc Trans.* déc 2014;42(6):1590-5.
560. Francis SE, Goh KL, Hodivala-Dilke K, Bader BL, Stark M, Davidson D, et al. Central roles of alpha5beta1 integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 juin 2002;22(6):927-33.
561. Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol.* avr 2000;156(4):1345-62.
562. Tanjore H, Zeisberg EM, Gerami-Naini B, Kalluri R. Beta1 integrin expression on endothelial cells is required for angiogenesis but not for vasculogenesis. *Dev Dyn.* janv 2008;237(1):75-82.
563. Notni J, Steiger K, Hoffmann F, Reich D, Kapp TG, Rechenmacher F, et al. Complementary, Selective PET Imaging of Integrin Subtypes $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha\beta 3$ Using ^{68}Ga -AQUIBEPRIN and ^{68}Ga -AVEBETRIN. *J Nucl Med.* mars 2016;57(3):460-6.
564. Parsons-Wingerter P, Kasman IM, Norberg S, Magnussen A, Zanivan S, Rissone A, et al. Uniform overexpression and rapid accessibility of alpha5beta1 integrin on blood vessels in tumors. *Am J Pathol.* juill 2005;167(1):193-211.
565. Lal A, Lash AE, Altschul SF, Velculescu V, Zhang L, McLendon RE, et al. A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res.* 1 nov 1999;59(21):5403-7.
566. Castellani P, Borsi L, Carnemolla B, Birò A, Dorcaratto A, Viale GL, et al. Differentiation between high- and low-grade astrocytoma using a human recombinant antibody to the extra domain-B of fibronectin. *Am J Pathol.* nov 2002;161(5):1695-700.
567. Serres E, Debarbieux F, Stanchi F, Maggiorella L, Grall D, Turchi L, et al. Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane in vitro and orthotopic tumor growth in mice. *Oncogene.* 26 juin 2014;33(26):3451-62.
568. Stragies R, Osterkamp F, Zischinsky G, Vossmeier D, Kalkhof H, Reimer U, et al. Design and Synthesis of a New Class of Selective Integrin $\alpha 5\beta 1$ Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry.* août 2007;50(16):3786-94.
569. Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, Fan F, Parry GC, Parikh AA, et al. Inhibition of integrin alpha5beta1 function with a small peptide (ATN-161) plus continuous 5-FU infusion reduces colorectal liver metastases and improves survival in mice. *Int J Cancer.* 20 avr 2003;104(4):496-503.
570. Ricart AD, Tolcher AW, Liu G, Holen K, Schwartz G, Albertini M, et al. Volociximab, a chimeric monoclonal antibody that specifically binds alpha5beta1 integrin: a phase I, pharmacokinetic, and biological correlative study. *Clin Cancer Res.* 1 déc 2008;14(23):7924-9.
571. Bell-McGuinn KM, Matthews CM, Ho SN, Barve M, Gilbert L, Penson RT, et al. A phase II, single-arm study of the anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibody volociximab as monotherapy in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer. *Gynecol Oncol.* 1 mai 2011;121(2):273-9.
572. Wang W, Wang F, Lu F, Xu S, Hu W, Huang J, et al. The antiangiogenic effects of integrin alpha5beta1 inhibitor (ATN-161) in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 14 sept 2011;52(10):7213-20.
573. Doñate F, Parry GC, Shaked Y, Hensley H, Guan X, Beck I, et al. Pharmacology of the novel antiangiogenic peptide ATN-161 (Ac-PHSCN-NH2): observation of a U-shaped dose-response curve in several preclinical models of angiogenesis and tumor growth. *Clin Cancer Res.* 1 avr 2008;14(7):2137-44.
574. Khalili P, Arakelian A, Chen G, Plunkett ML, Beck I, Parry GC, et al. A non-RGD-based integrin binding peptide (ATN-161) blocks breast cancer growth and metastasis in vivo. *Mol Cancer Ther.* sept 2006;5(9):2271-80.

575. Zhang N, Xia Y, Zou Y, Yang W, Zhang J, Zhong Z, et al. ATN-161 Peptide Functionalized Reversibly Cross-Linked Polymersomes Mediate Targeted Doxorubicin Delivery into Melanoma-Bearing C57BL/6 Mice. *Molecular Pharmaceutics*. 7 août 2017;14(8):2538-47.
576. Heckmann D, Meyer A, Marinelli L, Zahn G, Stragies R, Kessler H. Probing Integrin Selectivity: Rational Design of Highly Active and Selective Ligands for the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha \nu\beta 3$ Integrin Receptor. *Angewandte Chemie International Edition*. 4 mai 2007;46(19):3571-4.
577. Heckmann D, Meyer A, Laufer B, Zahn G, Stragies R, Kessler H. Rational design of highly active and selective ligands for the $\alpha 5\beta 1$ integrin receptor. *Chembiochem*. 16 juin 2008;9(9):1397-407.
578. Ray A-M, Schaffner F, Janouskova H, Noulet F, Rognan D, Lelong-Rebel I, et al. Single cell tracking assay reveals an opposite effect of selective small non-peptidic $\alpha 5\beta 1$ or $\alpha \nu\beta 3/\beta 5$ integrin antagonists in U87MG glioma cells. *Biochim Biophys Acta*. sept 2014;1840(9):2978-87.
579. Blandin A-F, Noulet F, Renner G, Mercier M-C, Choulier L, Vauchelles R, et al. Glioma cell dispersion is driven by $\alpha 5$ integrin-mediated cell-matrix and cell-cell interactions. *Cancer Lett*. 01 2016;376(2):328-38.
580. Martinkova E, Maglott A, Leger DY, Bonnet D, Stiborova M, Takeda K, et al. $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells. *Int J Cancer*. 1 sept 2010;127(5):1240-8.
581. Holmes RS, Rout UK. Comparative studies of vertebrate Beta integrin genes and proteins: ancient genes in vertebrate evolution. *Biomolecules*. 23 août 2011;1(1):3-31.
582. Lathia JD, Li M, Sinyuk M, Alvarado AG, Flavahan WA, Stoltz K, et al. High-throughput flow cytometry screening reveals a role for junctional adhesion molecule a as a cancer stem cell maintenance factor. *Cell Rep*. 16 janv 2014;6(1):117-29.
583. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. janv 2010;17(1):98-110.
584. Louis SA, Rietze RL, Deleyrolle L, Wagey RE, Thomas TE, Eaves AC, et al. Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. *Stem Cells*. avr 2008;26(4):988-96.
585. Nunes AM, Barraza-Flores P, Smith CR, Burkin DJ. Integrin $\alpha 7$: a major driver and therapeutic target for glioblastoma malignancy. *Stem Cell Investig*. 2017;4:97.
586. Inda M -d.-M, Bonavia R, Mukasa A, Narita Y, Sah DWY, Vandenberg S, et al. Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes & Development*. 15 août 2010;24(16):1731-45.
587. Wang X, Prager BC, Wu Q, Kim LJY, Gimple RC, Shi Y, et al. Reciprocal Signaling between Glioblastoma Stem Cells and Differentiated Tumor Cells Promotes Malignant Progression. *Cell Stem Cell*. 5 avr 2018;22(4):514-528.e5.
588. Colin C, Baeza N, Bartoli C, Fina F, Eudes N, Nanni I, et al. Identification of genes differentially expressed in glioblastoma versus pilocytic astrocytoma using Suppression Subtractive Hybridization. *Oncogene*. 4 mai 2006;25(19):2818-26.
589. Naeini KM, Pope WB, Cloughesy TF, Harris RJ, Lai A, Eskin A, et al. Identifying the mesenchymal molecular subtype of glioblastoma using quantitative volumetric analysis of anatomic magnetic resonance images. *Neuro-Oncology*. 1 mai 2013;15(5):626-34.
590. Cooper LAD, Gutman DA, Chisolm C, Appin C, Kong J, Rong Y, et al. The tumor microenvironment strongly impacts master transcriptional regulators and gene expression class of glioblastoma. *Am J Pathol*. mai 2012;180(5):2108-19.
591. Conroy S, Wagemakers M, Walenkamp AME, Kruyt FAE, den Dunnen WFA. Novel insights into vascularization patterns and angiogenic factors in glioblastoma subclasses. *J Neurooncol*. 2017;131(1):11-20.

592. Prabhu A, Kesarwani P, Kant S, Graham SF, Chinnaiyan P. Histologically defined intratumoral sequencing uncovers evolutionary cues into conserved molecular events driving gliomagenesis. *Neuro-oncology*. 29 nov 2017;19(12):1599-606.
593. Riffle S, Pandey RN, Albert M, Hegde RS. Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. *BMC Cancer*. 18 2017;17(1):338.
594. Weller M, Nabors LB, Gorlia T, Leske H, Rushing E, Bady P, et al. Cilengitide in newly diagnosed glioblastoma: biomarker expression and outcome. *Oncotarget*. 22 mars 2016;7(12):15018-32.
595. Wang H-Y, Chen Z, Wang Z-H, Wang H, Huang L-M. Prognostic significance of $\alpha 5\beta 1$ -integrin expression in cervical cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(6):3891-5.
596. Franco EL, Schlecht NF, Saslow D. The epidemiology of cervical cancer. *Cancer J*. oct 2003;9(5):348-59.
597. Li H, Wu X, Cheng X. Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer. *J Gynecol Oncol*. juill 2016;27(4):e43.
598. Fetcko K, Gondim D, Bonnin J, Dey M. Cervical cancer metastasis to the brain: A case report and review of literature. *Surgical Neurology International*. 2017;8(1):181.
599. Chen S-F, Chang Y-C, Nieh S, Liu C-L, Yang C-Y, Lin Y-S. Nonadhesive culture system as a model of rapid sphere formation with cancer stem cell properties. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e31864.
600. López J, Poitevin A, Mendoza-Martínez V, Pérez-Plasencia C, García-Carrancá A. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer*. 28 janv 2012;12:48.
601. Wang L, Guo H, Lin C, Yang L, Wang X. Enrichment and characterization of cancer stem-like cells from a cervical cancer cell line. *Mol Med Rep*. juin 2014;9(6):2117-23.
602. Rofstad EK, Simonsen TG, Huang R, Andersen LMK, Galappathi K, Ellingsen C, et al. Patient-derived xenograft models of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Lett*. 10 avr 2016;373(2):147-55.
603. Huang R, Rofstad EK. Cancer stem cells (CSCs), cervical CSCs and targeted therapies. *Oncotarget*. 23 mai 2017;8(21):35351-67.
604. Bailey JM, Singh PK, Hollingsworth MA. Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins. *J Cell Biochem*. 1 nov 2007;102(4):829-39.
605. Marquardt S, Solanki M, Spitschak A, Vera J, Pützer BM. Emerging functional markers for cancer stem cell-based therapies: Understanding signaling networks for targeting metastasis. *Semin Cancer Biol*. 30 juin 2018;
606. Barkeer S, Chugh S, Batra SK, Ponnusamy MP. Glycosylation of Cancer Stem Cells: Function in Stemness, Tumorigenesis, and Metastasis. *Neoplasia*. août 2018;20(8):813-25.
607. Gong P, Hu C, Zhou X, Wang R, Duan Z. TAT-mediated si-hWAPL inhibits the invasion and metastasis of cervical cancer stem cells. *Exp Ther Med*. déc 2017;14(6):5452-8.
608. Wu L, Han L, Zhou C, Wei W, Chen X, Yi H, et al. TGF- $\beta 1$ -induced CK17 enhances cancer stem cell-like properties rather than EMT in promoting cervical cancer metastasis via the ERK1/2-MZF1 signaling pathway. *FEBS J*. 2017;284(18):3000-17.
609. Xiao Y, Li Y, Tao H, Humphries B, Li A, Jiang Y, et al. Integrin $\alpha 5$ down-regulation by miR-205 suppresses triple negative breast cancer stemness and metastasis by inhibiting the Src/Vav2/Rac1 pathway. *Cancer Lett*. 1 oct 2018;433:199-209.
610. Li X-Q, Lu J-T, Tan C-C, Wang Q-S, Feng Y-M. RUNX2 promotes breast cancer bone metastasis by increasing integrin $\alpha 5$ -mediated colonization. *Cancer Lett*. 28 2016;380(1):78-86.
611. Liu X-Z, Li C-J, Wu S-J, Shi X, Zhao J-N. Involvement of $\alpha 5$ integrin in survivin-mediated osteosarcoma metastasis. *Asian Pac J Trop Med*. mai 2016;9(5):478-83.

612. Zhang X-B, Song L, Wen H-J, Bai X-X, Li Z-J, Ma L-J. Upregulation of microRNA-31 targeting integrin α 5 suppresses tumor cell invasion and metastasis by indirectly regulating PI3K/AKT pathway in human gastric cancer SGC7901 cells. *Tumour Biol.* juin 2016;37(6):8317-25.
613. Larzabal L, de Aberasturi AL, Redrado M, Rueda P, Rodriguez MJ, Bodegas ME, et al. TMPRSS4 regulates levels of integrin α 5 in NSCLC through miR-205 activity to promote metastasis. *Br J Cancer.* 4 févr 2014;110(3):764-74.
614. Zhijun X, Shulan Z, Zhuo Z. Expression and significance of the protein and mRNA of metastasis suppressor gene ME491/CD63 and integrin alpha5 in ovarian cancer tissues. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2007;28(3):179-83.
615. Wang Y, Shenouda S, Baranwal S, Rathinam R, Jain P, Bao L, et al. Integrin subunits alpha5 and alpha6 regulate cell cycle by modulating the chk1 and Rb/E2F pathways to affect breast cancer metastasis. *Mol Cancer.* 13 juill 2011;10:84.
616. Zhang J, Zheng G, Zhou L, Li P, Yun M, Shi Q, et al. Notch signalling induces epithelial-mesenchymal transition to promote metastasis in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Molecular Medicine [Internet].* 12 juill 2018 [cité 4 sept 2018]; Disponible sur: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2018.3769>
617. Sawada K, Mitra AK, Radjabi AR, Bhaskar V, Kistner EO, Tretiakova M, et al. Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target. *Cancer Res.* 1 avr 2008;68(7):2329-39.
618. Nam E-H, Lee Y, Park Y-K, Lee JW, Kim S. ZEB2 upregulates integrin α 5 expression through cooperation with Sp1 to induce invasion during epithelial-mesenchymal transition of human cancer cells. *Carcinogenesis.* mars 2012;33(3):563-71.

Résumé

Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale la plus agressive. L'échec thérapeutique s'explique par son caractère hétérogène. Nous étudions l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, le récepteur de la fibronectine, dont les travaux du laboratoire ont montré l'implication dans l'agressivité du GBM. Il a été observé que l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ est hétérogène entre patients et au sein d'une même tumeur. Nous avons émis l'hypothèse que cette hétérogénéité peut être expliquée par l'existence de différentes cellules souches de GBM (CSGs). Nos travaux montrent que certaines CSGs expriment l'intégrine après différenciation, démontrant une hétérogénéité intertumorale. Une expression hétérogène a également été mise en évidence au sein d'une même lignée, indiquant une hétérogénéité intratumorale. Nos résultats démontrent que les CSGs programmées à exprimer l'intégrine forment des cellules différenciées agressives. Nos données montrent que l'intégrine $\alpha 5$ est impliquée dans l'expansion tumorale mais aussi dans la survie et la migration en présence de fibronectine. Ce travail permet de mieux comprendre l'origine de foyers plus agressifs et souligne l'intérêt de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ comme cible thérapeutique pour une sous-population de patients.

Mots-clés : Glioblastomes, cellules souches de glioblastome, intégrine

Résumé en anglais

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive primary brain tumor. Treatment failure is explained by inter and intratumoral heterogeneity. Our previous results showed that the $\alpha 5 \beta 1$ integrin, the fibronectin receptor, is implicated in GBM aggressiveness. We observed that its expression was heterogeneous between patients' tumors but also between different areas in a given tumor. We hypothesized that this heterogeneity may be linked to different glioma stem cells (GSC). We confirmed that $\alpha 5$ expression is induced after differentiation in about half of the cell lines supporting the notion of inter-tumoral heterogeneity. We also observed with single cell-derived clone analysis that intra-tumoral GICs heterogeneity exists. We noticed that when GICs are programmed to express $\alpha 5$ integrin, differentiated cells become more aggressive. Our data support that differentiated cells expressing the integrin have an increased capacity of proliferation and acquire a fibronectin-dependent motility and a resistance phenotype. This work provides a better understanding of the origin of more aggressive foci and highlights the interest of $\alpha 5 \beta 1$ integrin as a therapeutic target for a subpopulation of patients.

Keywords: Glioblastoma, glioblastoma stem cells, integrin